

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO” (UNESP) – CAMPUS JABOTICABAL FACULDADE DE
CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS (FCAV)**

**RESPOSTA IMUNE A SALMONELA PARATÍFICA POR AVES
INFECTADAS PELA ESTIRPE SELVAGEM EM RELAÇÃO À
INFECÇÃO PELA ESTIRPE MUTANTE (*ttrA* E *pduA*)**

Túlio Spina de Lima

Bacharel em Ciências Biológicas

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO” (UNESP) – CAMPUS JABOTICABAL FACULDADE DE
CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS (FCAV)**

**RESPOSTA IMUNE A SALMONELA PARATÍFICA POR AVES
INFECTADAS PELA ESTIRPE SELVAGEM EM RELAÇÃO À
INFECÇÃO PELA ESTIRPE MUTANTE (*ttrA* E *pduA*)**

Túlio Spina de Lima

Orientador: Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior

Coorientador: Dr. Mauro de Mesquita Souza Saraiva

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

2024

L732r

Lima, Túlio Spina de

Resposta imune a salmonela paratífica por aves infectadas pela estirpe selvagem em relação à infecção pela estirpe mutante (ttrA E pduA) / Túlio Spina de Lima. -- Jaboticabal, 2024

67 p. : il., tabs.

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

Orientador: Angelo Berchieri Junior

Coorientador: Mauro de Mesquita Souza Saraiva

1. Salmonella. 2. Expressão gênica. 3. Aves domésticas Doenças. 4.
Resposta imune. 5. Intestinos Inflamação. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: RESPOSTA IMUNE A SALMONELA PARATÍFICA POR AVES INFECTADAS PELA ESTIRPE SELVAGEM EM RELAÇÃO À INFECÇÃO PELA ESTIRPE MUTANTE (*ttrA E pduA*)

AUTOR: TÚLIO SPINA DE LIMA

ORIENTADOR: ANGELO BERCHIERI JUNIOR

COORIENTADOR: MAURO DE MESQUITA SOUZA SARAIVA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Microbiologia Agropecuária, pela Comissão Examinadora:



Documento assinado digitalmente
MAURO DE MESQUITA SOUZA SARAIVA
Data: 30/07/2024 10:51:42-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Pesquisador Dr. MAURO DE MESQUITA SOUZA SARAIVA (Participação Virtual)
Departamento de Patologia Reproducao e Saude Unica / FCAV UNESP Jaboticabal

Dra. JACQUELINE BOLDRIN DE PAIVA (Participação Virtual)
Empresa BioCamp Laboratórios Ltda / Campinas/SP



Documento assinado digitalmente
JACQUELINE BOLDRIN DE PAIVA
Data: 31/07/2024 11:11:21-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. MARITA VEDOVELLI CARDOZO (Participação Virtual)
Departamento de Patologia, Reproducao e Saude Unica / FCAV UNESP Jaboticabal



Documento assinado digitalmente
MARITA VEDOVELLI CARDOZO
Data: 07/08/2024 15:47:15-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Jaboticabal, 30 de julho de 2024

Dados curriculares do autor

Túlio Spina de Lima – Nascido em 1 de abril de 1999 na cidade de Franca, São Paulo, filho de Andreza Spina e Ricardo Augusto de Lima. Em 2017, ingressou em Ciências Biológicas na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – UNESP/Jaboticabal, obtendo o título de Bacharel em Ciências Biológicas em 2023. Durante a graduação, foi bolsista de iniciação científica na área de microbiologia, sob orientação do Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior. Em junho de 2022, ingressou no mestrado da FCAV - UNESP/Jaboticabal pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária com estudo sobre a resposta imune de aves infectadas com *Salmonella Enteritidis* mutante contendo deleção nos genes *ttrA* e *pduA* sob orientação do Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior e coorientação do Dr. Mauro de Mesquita Souza Saraiva.

Dedicatória

Dedico

Aos meus avós, Paulo (*in memoriam*) e Maria, aos meus pais Andreza e Ricardo, ao meu padrasto Carlos, ao meu irmão Daniel e à minha namorada Isabella

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus avós Paulo (*in memoriam*) e Maria, por todo o apoio, educação e amor que tive a honra de receber em todos esses anos, sem vocês nada disso seria possível. Vocês são meus maiores exemplos.

Agradeço aos meus pais Andreza e Ricardo, ao meu padrasto Carlos e ao meu irmão Daniel, obrigado pelo apoio, carinho e amor em todos os momentos difíceis.

À minha namorada, Isabella, por todo o apoio, amor e companheirismo. Obrigado pela paciência e estar sempre ao meu lado. Você é minha inspiração.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior, uma referência na área, por todos os ensinamentos, oportunidades e pela paciência. Serei eternamente grato por investir todos estes anos em meu desenvolvimento.

Ao meu coorientador, Dr. Mauro de Mesquita Souza Saraiva, pela amizade, ensinamentos e paciência. Obrigado pela sua orientação durante a graduação e mestrado. Tenho grande admiração por você.

A todos do laboratório de Ornitopatologia da FCAV. Sem vocês nada disso seria possível. Obrigado pela amizade, conversas durante o café e todo o apoio constante. Sou grato a cada um de vocês.

À faculdade de ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP), sou eternamente grato pela estrutura e suporte durante minha graduação e mestrado.

À fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; Processos nº 22/16336-7 [Mestrado regular – Lima, TS], nº 2018/03189-0 [Berchieri Junior, A], nº 2018/21301-2 [Saraiva, MMS], à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Programa de Excelência Acadêmica – PROEX: nº 88887.817743/2023-00; CAPES – Programa de Demanda Social – DS: nº 88887.711233/2022-00) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Cujo o apoio possibilitou a realização desta dissertação.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

Sumário

Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais	iii
Certificado da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio)	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais	1
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DE LITERATURA	2
1. Produção avícola	2
2. <i>Salmonella</i> spp.	2
3. Colonização intestinal.....	4
4. Operon <i>ttr</i>	5
5. Operon <i>pdu</i>	7
6. Imunologia da infecção	10
7. Métodos de detecção de citocinas e interleucinas	11
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	12
CAPÍTULO 2 - Deletion of <i>ttrA</i> and <i>pduA</i> genes in <i>Salmonella enterica</i> serovars induces a comparable immune response to wild-type infection in different chicken lineages	21
ABSTRACT	22
1. Introduction	23
2. Material and Methods.....	24
2.1. Local and Conduction of Experiment.....	24

2.2.	Bacterial Strain and Mutant Construction	24
2.3.	In Vivo experiments	25
2.4.	Gene expression analysis.....	26
2.5.	RNA Extraction and cDNA synthesis	26
2.6.	Quantitative real-time PCR (RT-qPCR) analyze	26
2.7.	Statistical analysis.....	27
3.	Results	27
4.	Discussion	30
REFERENCES		34

Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais



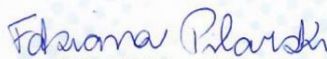
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado “**Avaliação da infecção de aves (*Gallus gallus domesticus*) por *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Heidelberg contendo deleção dos genes *ttrA* e *pduA***”, protocolo nº 006621/18, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 10 de maio de 2018.

Vigência do Projeto	01/07/2018 a 01/05/2023
Espécie / Linhagem	<i>Gallus gallus domesticus</i> / Hy-line Brown (postura comercial)
Nº de animais	1.080
Peso / Idade	35 gramas com um dia de vida
Sexo	Fêmeas
Origem	Hy-Line do Brasil LTDA

Jaboticabal, 10 de maio de 2018.


Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

Certificado da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio)

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO - Seção 1

ISSN 1677-7042

Nº 174, quinta-feira, 10 de setembro de 2020

Sorriso-MT e de Rio Verde-GO, da empresa Nidera Seeds Brasil Ltda, bem como o requerimento da empresa Syngenta Seeds Ltda, para incorporar a Unidade Operativa de Douradinho, em Uberlândia-MG, pertencente ao CQB da Nidera Seeds Brasil Ltda. O requerimento poderia ter sido desmembrado em dois (exclusão e requerimento de CQB), mas entende-se que deve representar aquisição ou fusão de empresas. O requerimento de CQB da Syngenta Seeds está completo, com a descrição da infraestrutura e área que ficarão sob sua responsabilidade e que serão incorporadas ao CQB 001/96. Foi apresentado um relatório de atividades dessa Unidade no último ano. A Nidera Seeds Brasil Ltda, por sua vez, apresenta também os relatórios de atividades das duas Unidades que serão excluídas de seu CQB. Portanto, recomenda-se à CTNBio a aprovação do requerimento para exclusão do CQB 226/06 das Unidades Operativas de Sorriso-MT e Rio Verde-GO da Nidera Seeds Brasil Ltda, com cancelamento do CQB 226/06, bem como a inclusão da Unidade Operativa de Douradinho, em Uberlândia-MG, ao CQB 001/96 da Syngenta Seeds Ltda.

No âmbito das competências dispostas na Lei 11.105/05 e seu decreto 5.591/05, a CTNBio concluiu que o presente pedido atende às normas e legislação pertinentes que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal.

A CTNBio esclarece que este extrato não exime a requerente do cumprimento das demais legislações vigentes no país, aplicáveis ao objeto do requerimento.

Este é um extrato do Parecer Técnico da CTNBio. Sua íntegra, assim como todos os documentos referentes à solicitação, constam do processo armazenado na CTNBio. Informações complementares poderão ser solicitadas através do Serviço de Informação ao Cidadão - SIC, pelo site eletrônico <https://esic.cgu.gov.br/>.

PAULO AUGUSTO VIANNA BARROSO
Presidente da Comissão

EXTRATO DE PARECER TÉCNICO Nº 7.110/2020

O Presidente da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, no uso de suas atribuições e de acordo com o artigo 14, inciso XIX, da Lei 11.105/05; do Artigo 5º, inciso XIX do Decreto 5.591/05 e do Artigo 5º, inciso IV da Resolução Normativa Nº 1, de 20 de Junho de 2006 analisou a alteração da CIBio da instituição abaixo discriminada e concluiu que o presente pedido atende às normas da CTNBio e à legislação pertinente que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal.

Requerente: Embrapa Trigo.

CQB: 058/98

Processo SEI nº: 01245.002919/2020-80

Assunto: Alteração da Comissão Interna de Biossegurança - CIBio

Extrato Prévio: 7210/2020 publicado em 05/08/2020

Decisão: DEFERIDO

EMENTA: A requerente solicitou à Presidente da CTNBio parecer técnico referente à nova composição da Comissão Interna de Biossegurança. Para tanto, o responsável legal da instituição emitiu ato formal de alteração da CIBio, a saber: Ordem de Serviço Embrapa Trigo nº 6 de 22 de Julho de 2020, nomeando Ana Lídia Variani Bonato (Presidente), Ricardo Lima de Castro, Jordalan Buffet Muniz, Aloisio Alcantara Vilarinho, Elene Yamazaki Iau e Ricardo Costa Leão, para comporem a CIBio local.

Atendidas as recomendações e as medidas de biossegurança contidas no processo, esta comissão interna de biossegurança é apta a gerir os riscos associados às atividades desenvolvidas na instituição.

A CTNBio esclarece que este extrato de parecer não exime a requerente do cumprimento das demais legislações vigentes no país, aplicáveis às atividades em questão.

Maiores informações deverão ser solicitadas via SIC (Serviço de Informação ao Cidadão), disponível no site do MCTIC (www.mctic.gov.br).

PAULO AUGUSTO VIANNA BARROSO

EXTRATO DE PARECER TÉCNICO Nº 7.111/2020

O Presidente da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, no uso de suas atribuições e de acordo com o artigo 14, inciso XIX, da Lei 11.105/05; do Artigo 5º, inciso XIX do Decreto 5.591/05 e do Artigo 5º, inciso IV da Resolução Normativa Nº 1, de 20 de Junho de 2006 analisou a alteração da CIBio da instituição abaixo discriminada e concluiu que o presente pedido atende às normas da CTNBio e à legislação pertinente que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal.

Requerente: Embrapa Agroenergia.

CQB: 345/12

Processo SEI nº: 01245.002796/2020-87

Assunto: Alteração da Comissão Interna de Biossegurança - CIBio

Extrato Prévio: 7207/2020 publicado em 04/08/2020

Decisão: DEFERIDO

EMENTA: A requerente solicitou à Presidente da CTNBio parecer técnico referente à nova composição da Comissão Interna de Biossegurança. Para tanto, o responsável legal da instituição emitiu ato formal de alteração da CIBio, a saber: Carta Nº 5/2020-CNPAAE/CIBio de 30 de Julho de 2020, nomeando Carolina Madalozzo Poletto, para compor a CIBio local.

Atendidas as recomendações e as medidas de biossegurança contidas no processo, esta comissão interna de biossegurança é apta a gerir os riscos associados às atividades desenvolvidas na instituição.

A CTNBio esclarece que este extrato de parecer não exime a requerente do cumprimento das demais legislações vigentes no país, aplicáveis às atividades em questão.

Maiores informações deverão ser solicitadas via SIC (Serviço de Informação ao Cidadão), disponível no site do MCTIC (www.mctic.gov.br).

PAULO AUGUSTO VIANNA BARROSO

EXTRATO DE PARECER TÉCNICO Nº 7.112/2020

A Presidência da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, no uso de suas atribuições e de acordo com o artigo 14, inciso XIX, da Lei 11.105/05 e do Art. 5º, inciso XIX do Decreto 5.591/05, torna público que na 234ª Reunião Ordinária da CTNBio, realizada em 03 de setembro de 2020, a CTNBio apreciou e emitiu parecer técnico para o seguinte processo:

Processo: 01245.001138/2020-78

Requerente: Syngenta Seeds Ltda

CQB: 001/96

Assunto: Extensão de CQB.

A CTNBio, após análise do pedido de extensão de CQB, deliberou pelo DEFERIMENTO conforme esse parecer técnico. A requerente solicita extensão de CQB para inclusão da Área Experimental (71,72 hectares) e Área de Descarte de OGM (15 x 30 m) localizadas na Unidade de Syngenta Seeds Ltda, na cidade de Rio Verde-GO. As atividades a serem desenvolvidas serão: liberação planejada no meio ambiente, transporte, avaliação de produto, detecção e identificação de OGM, descarte, armazenamento e pesquisa e desenvolvimento de produtos com plantas, fungos e derivados geneticamente modificados pertencentes à Classe de risco 01.

No âmbito das competências dispostas na Lei 11.105/05 e seu decreto 5.591/05, a CTNBio concluiu que o presente pedido atende às normas e legislação pertinentes que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal.

A CTNBio esclarece que este extrato não exime a requerente do cumprimento das demais legislações vigentes no país, aplicáveis ao objeto do requerimento.

Este é um extrato do Parecer Técnico da CTNBio. Sua íntegra, assim como todos os documentos referentes à solicitação, constam do processo armazenado na CTNBio. Informações complementares poderão ser solicitadas através do Serviço de Informação ao Cidadão - SIC, pelo site eletrônico <https://esic.cgu.gov.br/>.

PAULO AUGUSTO VIANNA BARROSO
Presidente da Comissão

EXTRATO DE PARECER TÉCNICO Nº 7.115/2020

A Presidência da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, no uso de suas atribuições e de acordo com o artigo 14, inciso XIX, da Lei 11.105/05 e do Art. 5º, inciso XIX do Decreto 5.591/05, torna público que na 234ª Reunião Ordinária da CTNBio, realizada em 03 de setembro de 2020, a CTNBio apreciou e emitiu parecer técnico para o seguinte processo:

Processo: 01245.002473/2020-93

Requerente: DuPont do Brasil - Divisão Pioneer Sementes S.A

CQB: 013/97

Assunto: Extensão de CQB.

A CTNBio, após análise do pedido de extensão de CQB, deliberou pelo DEFERIMENTO conforme esse parecer técnico. A requerente solicita revisão para atualização do Escritório, Sala de Manipulação de Sementes, Sala de Tratamento de Sementes e Área de Secadores e extensão de CQB para inclusão da Câmara fria, Galpão de máquinas, Sala de expurgo, Área de Campo (23,8 ha). As atividades a serem desenvolvidas serão: pesquisa em regime de contenção, liberação planejada no meio ambiente, transporte, avaliação de produto, detecção e identificação de OGM, descarte e armazenamento de plantas geneticamente modificadas pertencentes à Classe de Risco 01.

No âmbito das competências dispostas na Lei 11.105/05 e seu decreto 5.591/05, a CTNBio concluiu que o presente pedido atende às normas e legislação pertinentes que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal.

A CTNBio esclarece que este extrato não exime a requerente do cumprimento das demais legislações vigentes no país, aplicáveis ao objeto do requerimento.

Este é um extrato do Parecer Técnico da CTNBio. Sua íntegra, assim como todos os documentos referentes à solicitação, constam do processo armazenado na CTNBio. Informações complementares poderão ser solicitadas através do Serviço de Informação ao Cidadão - SIC, pelo site eletrônico <https://esic.cgu.gov.br/>.

PAULO AUGUSTO VIANNA BARROSO
Presidente da Comissão

EXTRATO DE PARECER TÉCNICO Nº 7.117/2020

O Presidente substituto da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, no uso de suas atribuições e de acordo com o artigo 14, inciso XIX, da Lei 11.105/05 e do Art. 5º, inciso XIX do Decreto 5.591/05, torna público que na 234ª Reunião Ordinária da CTNBio, realizada em 03 de setembro de 2020, a Comissão apreciou e emitiu parecer técnico para o seguinte processo:

Processo SEI nº: 01250.010132/2020-12

Requerente: Universidade Estadual Paulista - UNESP - Campus Jaboticabal

Endereço: Via de Acesso Professor Paulo Donato Castellane, s/n - Jaboticabal-SP.

CEP: 14884-900

CQB: 088/98

Assunto: Solicitação de parecer para projeto de pesquisa - Nível de Biossegurança 2

Extrato Prévio: 6969/2020, publicado no Diário Oficial da União em 13/03/2020

Decisão: DEFERIDO

A requerente, por meio de seu representante legal, solicitou parecer técnico da CTNBio referente ao Projeto: "Avaliação da deleção de genes sobre a patogenicidade de estirpes de *Salmonella* spp. em aves comerciais". Título do Subprojeto 01: "Efeito da deleção do gene *mgtC* sobre a patogenicidade de *Salmonella* gallinarum em aves susceptíveis". Título do Subprojeto 2: "Avaliação da infecção de aves (*Gallus galli domesticus*) por *Salmonella* enteritidis, *Salmonella typhimurium* e *Salmonella heidelberg* contendo deleção dos genes *ttrA* e *pduA*". No âmbito das competências dispostas na Lei 11.105/05 e seu decreto 5.591/05, a Comissão concluiu que o presente pedido atende às normas da CTNBio e à legislação pertinente que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal.

A CTNBio esclarece que este extrato não exime a requerente do cumprimento das demais legislações vigentes no país, aplicáveis ao objeto do requerimento.

A íntegra deste Parecer Técnico consta do processo arquivado na CTNBio. Informações complementares ou solicitações de maiores informações sobre o processo acima listado deverão ser encaminhadas por escrito à Secretaria Executiva da CTNBio.

PAULO AUGUSTO VIANNA BARROSO

EXTRATO DE PARECER TÉCNICO Nº 7.129/2020

A Presidência da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio, no uso de suas atribuições e de acordo com o artigo 14, inciso XIX, da Lei 11.105/05 e do Art. 5º, inciso XIX do Decreto 5.591/05, torna público que na 234ª Reunião Ordinária da CTNBio, realizada em 03 de setembro de 2020, a CTNBio apreciou e emitiu parecer técnico para o seguinte processo:

Processo: 01245.002329/2020-57

Requerente: Monsanto do Brasil Ltda.

CQB: 003/96

Assunto: Revisão e Extensão do CQB.

A CTNBio, após análise do pedido de revisão e extensão do CQB, deliberou pelo DEFERIMENTO conforme esse parecer técnico. A requerente solicita revisão de CQB para a Área de Secagem de Sementes (Atualização da planta baixa e revisão de nomenclatura); Unidade de Beneficiamento de Sementes (UBS) (Atualização da planta baixa, exclusão de local de manipulação de OGM e revisão de nomenclatura); Revisão e Extensão para os Laboratório 02 e 03 (Atualização da planta baixa, revisão de nomenclatura e ampliação da instalação) e Extensão para inclusão de instalação do Laboratório 1 localizados na Estação Experimental Petrolina 1, Petrolina/PE. As atividades a serem desenvolvidas serão: pesquisa em regime de contenção, uso comercial, liberação planejada no meio ambiente, transporte, avaliação de produto, detecção e identificação de OGM, descarte, armazenamento e produção industrial de plantas, micro organismos e derivados geneticamente modificados pertencentes à Classe de Risco 01.

No âmbito das competências dispostas na Lei 11.105/05 e seu decreto 5.591/05, a CTNBio concluiu que o presente pedido atende às normas e legislação pertinentes que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal.

A CTNBio esclarece que este extrato não exime a requerente do cumprimento das demais legislações vigentes no país, aplicáveis ao objeto do requerimento.

Este é um extrato do Parecer Técnico da CTNBio. Sua íntegra, assim como todos os documentos referentes à solicitação, constam do processo armazenado na CTNBio. Informações complementares poderão ser solicitadas através do Serviço de Informação ao Cidadão - SIC, pelo site eletrônico <https://esic.cgu.gov.br/>.

PAULO AUGUSTO VIANNA BARROSO
Presidente da Comissão



Este documento pode ser verificado no endereço eletrônico
<http://www.in.gov.br/autenticidade.html>, pelo código 0515202009100008



RESPOSTA IMUNE A SALMONELA PARATÍFICA POR AVES INFECTADAS PELA ESTIRPE SELVAGEM EM RELAÇÃO À INFECÇÃO PELA ESTIRPE MUTANTE ($\Delta ttrA$ E $\Delta pduA$)

RESUMO – Salmonelas paratíficas são eficientes em executar o processo de inflamação intestinal e usufruem desta para ganhar a competição com outros microrganismos no microbioma intestinal. Este processo está associado ao uso do tetracionato e propanodiol como fonte de energia pela bactéria. Portanto, *Salmonella* se beneficia do processo inflamatório em meio a um ambiente intestinal complexo, composto por microrganismos diversos, permitindo ao patógeno efetuar o processo de colonização intestinal, bem como sua disseminação para o ambiente externo. Este projeto propõe analisar as respostas imunológicas de aves comerciais experimentalmente desafiadas por *S. Enteritidis* com modificações nos genes responsáveis pelos processos metabólicos de utilização do tetracionato (*ttrA*) e 1,2-propanodiol (*pduA*), por meio da expressão de genes relativos à resposta imune. Diante disto, uma estirpe mutante de *Salmonella* Enteritidis foi construída contendo a deleção dos genes *ttrA* e *pduA* (*SE $\Delta pduA ttrA$*). Posteriormente foi conduzida a infecção de aves de diferentes linhagens comerciais pela estirpe *SE $\Delta pduA ttrA$* e pela estirpe selvagem para avaliar a colonização intestinal e infecção sistêmica por meio da mensuração de mRNA das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-18, IL-22, CCL4 e CXCLi2, pela técnica de RT-qPCR. Foi observado que as expressões das citocinas analisadas em aves infectadas pela bactéria contendo a deleção dupla responsável por estas vias metabólicas não apresentou diferença estatística quando comparado com as infectadas pela estirpe selvagem, provocando uma resposta imune similar. Entretanto, quando se compara a infecção entre as linhagens, em frangos de corte, a intensidade da resposta imunológica é maior que em aves de postura. Em conclusão, a deleção de ambos os genes em *Salmonella* Enteritidis não afeta na resposta imune que a ave apresenta contra o patógeno, indicando que outras vias são mais importantes para o desenvolvimento do processo infeccioso.

Palavras-chave: Mutação sítio dirigida, propanodiol, reações imunológicas, salmonelose aviária, tetracionato

IMMUNE RESPONSE TO *SALMONELLA ENTERICA* SEROVARS IN CHICKENS INFECTED BY THE WILD-TYPE STRAIN COMPARED TO THE MUTANT STRAIN ($\Delta ttrA$ E $\Delta pduA$)

ABSTRACT – *Salmonella enterica* serovars are efficient at carrying out the process of intestinal inflammation and taking advantage of this to win competition with other microorganisms in the gut microbiome. This process is associated with the use of tetrathionate and propanediol as an energy source by the bacteria. Therefore, the inflammatory process benefits *Salmonella* during a complex intestinal environment, composed of multiple microorganisms, allowing the pathogen to carry out the intestinal colonization process, as well as its dissemination to the environment. This project aimed to analyze the immune responses of commercial birds experimentally challenged by *S. Enteritidis* with deletions in the genes responsible for the metabolic processes of tetrathionate (*ttrA*) and 1,2-propanediol (*pduA*) utilization through the expression of genes related to the immune response. Therefore, the *Salmonella* Enteritidis mutant strain was constructed with both gene deletion, *ttrA* and *pduA* ($SE\Delta pduAttrA$). Posteriorly, different lineages of chicken were challenged with $SE\Delta pduAttrA$ and wild-type strains, respectively, to evaluate intestinal colonization and systemic infection through mRNA measurement of cytokines IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-18, IL-22, CCL4 e CXCLi2, by the RT-qPCR technique. The double deletion responsible for metabolic pathways does not show statistical differences with the wild-type strain, eliciting similar immune responses. However, when comparing infections between strains, broilers showed a more immune response than laying hens. In conclusion, the deletion of both genes in *Salmonella* Enteritidis does not significantly impact the immune response of the birds to the pathogen. This suggests that other pathways play a more crucial role in the development of the infectious process.

Keywords: Avian salmonellosis, immunological reactions, propanediol, site-directed mutagenesis, tetrathionate

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

INTRODUÇÃO

Salmonella enterica é um dos maiores causadores de infecções alimentares em todo o mundo (Jung et al., 2022). De acordo com o “Centers for Diseases Control and Prevention” (CDC), no Estados Unidos, ocorrem mais de 1,2 milhão de infecções e 450 mortes anualmente, sendo que, dentre os sorovares mais isolados, *S. Enteritidis* aparece em primeiro lugar com 16,8%, seguido por *S. Newport* (10,1%) e *S. Typhimurium* (9,8%) (CDC, 2011; CDC, 2018).

Após a chegada ao intestino, *Salmonella* spp. desencadeia um processo inflamatório intenso ao entrar em contato com células de defesa do sistema imune, especificamente, macrófagos e células dendríticas, restringindo a disponibilidade de nutrientes (SHAJI et al., 2023; WINTER et al., 2010). Entretanto, estas bactérias, possuem vias metabólicas capazes de utilizar subprodutos da inflamação, como por exemplo, o tetrionato ($S_4O_6^{2-}$) (através do *operon ttr*) como aceceptor de elétrons e 1,2-propanodiol (*operon pdu*) como fonte de carbono que, em condições anaeróbicas, oferecem vantagens para o ganho de energia (WINTER et al., 2010; STAIB & FUCHS, 2015).

Com o avanço da patogenia, para que mais células de defesa cheguem até o local da inflamação, citocinas são secretadas no lúmen intestinal fazendo com que ocorra quimiotaxia (HUANG et al., 2020). Citocinas pró-inflamatórias regulam a inflamação intestinal durante a infecção, entretanto, quando muito intensa podem causar danos aos tecidos, necessitando da secreção de citocinas anti-inflamatórias para controle (MAGAÑA et al., 2024).

Em um estudo anterior utilizando camundongos infectados por *Salmonella Typhimurium* (STM), demonstrou que a depleção do gene *ttrA* provoca a atenuação do patógeno (WINTER et al., 2010). Porém, Saraiva et al. (2020), observaram que a infecção por STM com os genes *ttrA* e *pduA* deletados em galinhas foi mais intensa. Portanto, presente estudo tem como objetivo avaliar a expressão de genes relativos à

resposta imune de aves de linhagem comercial pela estirpe de *S. Enteritidis* contendo deleções nos genes relacionados com a metabolização do tetracionato (*ttrA*) e do 1,2-propanodiol (*pduA*) em comparação com a estirpe selvagem.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Produção avícola

A cadeia produtiva avícola dentre a produção de proteína animal é a de maior crescimento. Segundo a “Food and Agriculture Organization – OECD/FAO” (2023) a projeção para 2024 é de 141 milhões de toneladas, representando a maior fatia da produtividade de carne mundial. Em âmbito nacional, segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal – ABPA (2024), a produção de carne de frango no ano de 2023 totalizou 14,833 milhões de toneladas, alcançando o segundo lugar no ranking mundial de produção, permanecendo atrás apenas dos Estados Unidos da América, porém o país segue como maior exportador.

A procura de produtos de origem avícola aumentou nos últimos anos, alcançando o primeiro lugar no ranking dentre as proteínas de origem animal mais consumidas no mundo (OECD/FAO, 2022). O crescimento da demanda deste alimento é principalmente pelo baixo custo, valor nutritivo balanceado, questões religiosas, consistência e adaptabilidade (OECD/FAO, 2022; Cao et al., 2020). Portanto, é um alimento que tem proeminência de seu consumo em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (OECD/FAO, 2022). No entanto, para atender à demanda do mercado consumidor, as aves são criadas em sistemas de confinamento, o que aumenta a densidade animal por galpão e favorece a presença e disseminação de patógenos dentro do lote (EFSA, 2019). Devido a esse processo de produção, produtos avícolas estão frequentemente associados a surtos de *Salmonella* spp. em seres humanos (O'REGAN et al., 2008).

2. *Salmonella* spp.

Organismos pertencentes ao gênero *Salmonella* são bactérias Gram-negativas, em formato de bastonetes e anaeróbicas facultativas, pertencentes à família Enterobacteriaceae (Jajere, 2019). Este gênero é formado por apenas duas espécies, sendo elas, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*, que abrigam mais de 2600 sorovares (Issenhuth-Jeanjean et al., 2014).

Na avicultura, podem ser observadas três principais doenças. A Pulorose, causada por *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Gallinarum biovar Pullorum; o tifo aviário, causada por *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Gallinarum biovar Gallinarum e o paratifo aviário, que pode ser acometido por todos os outros sorovares presentes na espécie *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (Poppe, 2000; Freitas Neto et., 2020).

A presença do patógeno resulta em uma significativa queda na produtividade e aumento na mortalidade dos animais de produção, causando prejuízos à indústria e colocando em alerta instituições responsáveis por monitorar sua surgimento. Além disso, pode ocorrer a disseminação do patógeno para outras espécies e localidades (WOAH, 2018). Considerando as doenças de transmissão hídrica e alimentar (DTHA), os animais associados a esses surtos representam um risco maior para a propagação da doença. Levantamentos epidemiológicos mostram que países em desenvolvimento geralmente apresentam altas taxas de DTHA causadas por bactérias do gênero *Salmonella* (MA et al., 2014).

Surtos de DTHAs causados por salmoneloses paratíficas geram danos significativos à saúde humana e animal, resultando em grandes prejuízos, não só aos setores de produção, como aos sistemas de saúde pública em todo o mundo (CHEN et al. 2010). Atualmente tem-se estimado que ao menos 93,8 milhões de casos de salmoneloses ocorram em todo mundo (dos quais 80,3 milhões de casos são transmitidos por alimentos), causando 155 mil mortes ao ano (Majowicz et al., 2010).

Nos Estados Unidos da América (EUA), casos de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* em humanos alcançam o segundo lugar no ranking de infecções bacterianas classificadas como DTHAs, superado apenas por *Campylobacter* spp. (CDC, 2011; Fleckenstein et al., 2021). É reportado mais de 1,2 milhões de infecções, levando à aproximadamente 23.000 hospitalizações e 450 mortes em decorrência dos surtos

alimentares causados por *Salmonella* spp. anualmente (CDC, 2011). Em uma visão mais detalhada sobre a incidência dos sorovares isolados, de acordo com o “Centers for Diseases Control and Prevention – CDC”, *S. Enteritidis* aparece em primeiro lugar com 16,8%, seguido por *S. Newport* (10,1%) e *S. Typhimurium* (9,8%) (CDC, 2018).

Na União Europeia (UE), *Salmonella* spp. também ocupa o segundo lugar em DTHAs, assim como nos EUA. Em 2020 foram relatados 65,2 mil casos de salmonelose em humanos em um total de 1014 surtos alimentares, o que confere uma razão de 15,3 casos confirmados a cada 100 mil habitantes, e os sorovares mais isolados de *Salmonella* spp. foram *S. Enteritidis* (67,3%), *S. Typhimurium* (13,1%) e *S. Typhimurium* monofásica (4,3%) (EFSA, 2023).

No Brasil durante os anos de 2000 a 2021 foram notificados 39.314 casos de *Salmonella* spp. em DTHAs, sendo o agente mais comumente isolado com 14,77% dos casos e um total de óbitos de 34 (16,04%). Entretanto, o país enfrenta problemas de subnotificação da doença, o que atrapalha a real dimensão dos danos causados por esses patógenos. Estima-se que casos não identificados e ignorados ultrapassam os 115.000, ocupando uma parcela de 43,25% de todos os casos (Marques; Trindade, 2022).

Infecções por *Salmonella* ocasionam perdas econômicas. Nos EUA e países que compõem a União Europeia, por exemplo, o gasto anual pode chegar as cifras de 3,3 bilhões de dólares e 3 bilhões de euros, respectivamente (EFSA, 2014; HOFFMANN et al., 2012).

3. Colonização intestinal

O desenvolvimento da patogenia de bactérias do gênero *Salmonella* spp. é dependente de fatores como a interação do patógeno com o hospedeiro, elevada capacidade de invasão, a sobrevivência intracelular em macrófagos, a resposta imune e a integridade do epitélio intestinal (SORIA et al., 2013). Diante disso, barreiras se tornam necessárias para impedir a colonização de patógenos, visando restringir os danos causados pela inflamação e proteger a integridade epitelial (PATEL; MCCORMICK, 2014). O aparato de ataque e sobrevivência de salmonelas paratíficas

possibilitam com que a bactéria induza a resposta imune, resultando na inflamação intestinal, e ocasionando a superação das barreiras impostas pelo hospedeiro e garantindo a colonização do epitélio. (CHIRULLO et al., 2016).

O sucesso da sobrevivência bacteriana no ambiente inflamado e a superação em relação à competição com a microbiota só é possível graças a utilização do tetrionato durante processo de respiração anaeróbica para obtenção de nutrientes essenciais (WINTER, 2010). Diante disso, após a entrada da bactéria no hospedeiro, ela se encontra em um meio denso e diversificado formado pela microbiota intestinal. Tendo em vista a alta competitividade, faz-se necessário sua adaptação ao meio anaeróbico, a partir de atividades metabólicas essenciais partindo de um aparato de genes possibilitando sua sobrevivência (ERNST et al., 1990).

4. Operon *ttr*

Em ambientes anaeróbios inflamados, um sistema alternativo é adotado por *Salmonella enterica* para a respiração celular, caracterizado por um processo metabólico com um balanço energético mais rentável, utilizando-se de aceptores de elétrons que favorecem o patógeno. Dos genes responsáveis por esta via alternativa, existem alguns que oferecem a capacidade de metabolização do tetrionato (operon *ttr*), desta forma proporciona uma multiplicação mais acentuada para *Salmonella* spp. devido a presença de novas fontes de carbono utilizadas na respiração anaeróbica, quando comparada com outras bactérias presentes no lúmen intestinal que em sua maioria não possuem mecanismos para utilização de tal substrato (WINTER et al., 2010).

A capacidade da metabolização do tetrionato é apenas vista em algumas espécies de bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae, dentre elas estão *Salmonella* spp., *Yersinia* spp., *Enterobacter* spp. e *Citrobacter* spp. (WINTER; BAUMLER, 2011). Outrora, acreditava-se que o uso do tetrionato como fonte energética somente referia à patógenos que preservavam sua sobrevivência em vida livre apenas em ambientes onde este ânion estaria presente como em carcaças em decomposição ou alguns tipos de solo (HENSEL et al., 1999). Porém, estudos

posteriores demonstram que as salmonelas paratíficas evoluíram, para que quando iniciassem o processo de invasão epitelial em seu hospedeiro tornassem o local da inflamação favorável e com grande disponibilidade de fontes de carbono para sua sobrevivência em decorrência da competição e de aumentar sua taxa de multiplicação (STECHER et al., 2007; THIENNIMITR et al., 2011). Observando outros integrantes do gênero *Salmonella* spp., os sorovares *Salmonella* Gallinarum e *Salmonella* Pullorum não possuem o domínio desta habilidade, dispensando a inflamação intestinal e evoluindo para uma infecção sistêmica crítica nas aves (GAL-MOR et al., 2014). Winter et al. (2010) em um estudo, demonstraram que *Salmonella* Typhimurium quando utiliza os subprodutos oriundos da inflamação intestinal, obtém uma melhora de sua multiplicação no lúmen intestinal, auxiliando a invasão do hospedeiro, colonização e por fim a transmissão horizontal.

Quando em condição de anaerobiose, ocorre a ativação de uma proteína chamada de tetrionato redutase, enzima constituída por 3 subunidades (TtrA, TtrB e TtrC) e 5 genes no operon. A TtrA, possui o domínio de ligação ferro-enxofre, pertencente a superfamília molibdopterina (MPT), onde estão classificados outros membros determinados pela função oxidoreductase, sendo eles, nitrato reductases bacterianas, sulfóxidos reductases dimetilsulfóticas, tiosulfato reductase e arsenite oxidase. Por mais que enzimas com a presença do cofator molibdopterina geralmente catalisam reações partindo de um átomo de oxigênio ou de ligações C-H. Este cofator incorpora o centro ativo da TtrA atuando como chave principal na redução do tetrionato presente. Já a subunidade TtrB possui o domínio de ligação ferro-enxofre (FeS), atuando na redução do tetrionato fazendo o carregamento de elétrons entre as subunidades TtrA e TtrC. Ademais a subunidade TtrC tem em sua constituição 9 hélices transmembranares e é pertencente à família NrfD e é provável que esteja envolvido com a transferência de elétrons do “pool” de quinona S (Q) direcionando para outros componentes do complexo redutase, e em ação adjunta, oferta prótons (H⁺) para o periplasma (HINSLEY; BERKS, 2002; WINTER; BAUMLER, 2011).

O comportamento do gênero *Salmonella* spp. pela ação tetrionato redutase no ambiente inflamado, infere em vantagens metabólicas sobrepujando a competição com a microbiota presente no intestino e, faz-se possível em decorrência da presença dos determinantes genéticos nas Ilhas de Patogenicidade 1 e 2 (SPI-1 e SPI-2),

proporcionando a invasão ao hospedeiro de forma eficaz. Quando no interior do trato digestivo, proteínas liberadas por essas bactérias a partir deste sistema de secreção, vão de encontro às células hospedeiras, iniciando a produção de citocinas pró-inflamatórias dando início à inflamação (KHAN, 2014).

Estudos realizados em mamíferos sobre este processo, demonstrou que a mucosa intestinal efetua a conversão de sulfeto de hidrogênio (H_2S) oriundo naturalmente dos organismos presentes na microbiota em tiosulfato ($S_2O_3^{2-}$), nocivo aos mesmos afetando o equilíbrio da microbiota intestinal (FURNE et al., 2001). Após a invasão, possibilitando a inflamação a partir dos determinantes genéticos presentes nas SPI-1 e SPI-2 de STM, células imunes produzem espécies reativas de oxigênio (ROS), e o tiosulfato é oxidado a tetrionato (WINTER et al., 2010). O ânion produzido é utilizado como aceptor de elétrons por bactérias, como *S. enterica*, possibilitando a respiração em ambientes de níveis escassos de oxigênio e coloca um passo a frente da microbiota intestinal do hospedeiro. Como o tetrionato, a produção de ROS por células hospedeiras é nociva para a microbiota, mas inofensiva para o patógeno, pode-se destacar novamente que além da diminuição da competição por metabolitos nocivos produzidos pela ave, o uso do tetrionato como aceptor de elétrons é praticamente exclusivo destas bactérias, e conferindo em vantagem (WINTER et al., 2010).

5. Operon *pdu*

Quando bactérias do gênero *Salmonella* estão submetidas à respiração anaeróbica o substrato 1,2-propanodiol é utilizado como fonte de energia, impulsionado pelo tetrionato como aceptor de elétrons, porém para a microbiota fermentadora este substrato é inacessível (THIENNIMITR et al., 2011). Para embasar ainda mais este fato, estudos *in vitro* comprovam que para meios em anaerobiose é necessário a adição de tetrionato para que a utilização de 1,2- propanodiol seja possível (PRICE-CARTER et al., 2001).

A utilização de 1,2-propanodiol por *S. enterica* é feita em questão de sua fonte de carbono e energia para a bactéria por uma via que necessita da coenzima B12.

Quando analisado o trato intestinal é possível observar apenas duas fontes de carbono abundante, a rhamnose e a fucose, que durante o processo de multiplicação bacteriana são fermentadas, obtendo como produto final o 1,2-propanodiol (STAIB; FUCKS, 2015). É necessário que 1,2-propanodiol seja convertido em propionaldeído. Para tal, é utilizado uma via de degradação com uma enzima dependente da vitamina B12, a propanodiol-desidratase, que converte o em propanol e propionato. Estes subprodutos geram um ATP por fosforilação equivalente ao substrato, também um gradiente de elétrons (1-propanol) necessário para a regeneração do NAD, e por fim um intermediário (propionil-CoA) sendo utilizado como fonte de carbono e energia para a via do metilcitrato (HORSWILL; ESCALANTE-SEMERENA, 1997).

No caso da etanolamina é produzida devido a inflamação causada juntamente com a descamação intestinal, sendo um substrato de produção contínua nas aves quando o trato intestinal está inflamado (GART et al., 2016). Esta molécula possui um precursor chamado de fosfatidiletanolamina, de ocorrência abundante presente nas membranas celulares de bactérias e mamíferos, que quando degradado se converte em glicerol e etanolamina por fosfodilesterases. Diante disso, a etanolamina passa por um processo de conversão em acetaldeído e amônia pela enzima etanolamina amônia liase (GARSIN et al., 2010). A amônia gerada no processo de conversão é utilizada pelo microrganismo como fonte de nitrogênio e o acetaldeído convertido em acetil-CoA, se adequando a vários processos metabólicos que necessitam do mesmo (JONES; TURNER, 1984). Seguindo estes processos, a utilização de tetracionato como aceptor de elétrons pode realizar uma função importante para a sobrevivência do patógeno em ambientes anaeróbicos, utilizando a etanolamina e o 1,2-propanodiol (PRICE-CARTER et al., 2001).

Quando a enfermidade acomete aves mais jovens, alguns sorovares paratíficos ocasionam colonização intestinal intensa, inflamação e excreção fecal do patógeno. Quando falado sobre o motivo do sucesso da infecção nestas aves, pode estar relacionado com a utilização da etanolamina pela bactéria, que proporciona a multiplicação bacteriana resultando a longo prazo na eliminação via fecal e a infecção de novos hospedeiros (LAWLEY et al., 2008). Riviera-Chavez et al. (2013) demonstram em camundongos que uma estirpe mutante, que não possui capacidade de metabolizar o tetracionato (*STMΔttrA*), tem sua multiplicação reduzida quando

comparada com uma estirpe selvagem por até 28 dias pós-infecção; postergando este período, a recuperação da estirpe mutante em conteúdo cecal não foi possível.

Microcompartimentos (MCP) bacterianos são proteínas que estão predispostas em formato de concha, alojando enzimas responsáveis por alguns processos específicos. MCP que faz o uso do 1,2-propanodiol, é formado por 7 proteínas diferentes, sendo que, a PduA que está entre as proteínas que formam a estrutura é o principal componente estrutural da base da concha (STAIB et al., 2015). Essas organelas exercem o papel de orientar os caminhos metabólicos e captar toxinas e voláteis intermediários que são liberados na produção do tetrionato (SAMPSON; BOBIK, 2008). As principais funções exercidas pelo MCP é a formação de uma barreira que impede o acúmulo de substâncias nocivas como o propanol e, que também abriga a catálise das fontes de carbono e energia (CROWLEY et al., 2010). Quando apontado a degradação de 1,2-propanodiol as duas etapas iniciais ocorrem no interior do lúmen do MCP-Pdu, que é convertido em propionaldeído e logo após em propionil-coenzima A, em função da diol-desidratase que depende da vitamina B12 (PduCDE) e propionaldeído desidrogenase (PduP) (CHENG et al., 2011). CHOWDHURY (2016), relata que o compartimento PduA é o intermediário do transporte de 1,2- propanodiol para os MCPs.

Estudo de estirpes mutantes de *Salmonella* com o operon *pdu* inativado demonstrou que houve redução na recuperação intestinal e na excreção quando comparada com a estirpe selvagem (HARVEY et al, 2011). Em suma, o potencial de colonização intestinal destas duas deleções presentes nas estirpes pode ser atenuado, causado pela diminuição da taxa de multiplicação no lúmen intestinal. Por fim, quando analisadas as funções dos genes *pdu* responsáveis pela utilização do 1,2-propanodiol induzidos em macrófagos de camundongos e células epiteliais de humanos, a sua deleção implica na baixa multiplicação no interior de macrófagos (HEITHOFF et al., 1999; KLUMPP; FUCHS, 2007). Baseado nas informações acima, a análise imunológica de aves infectadas por estirpes paratíficas contendo deleções nos genes citados é de grande importância para o entendimento do grau de atenuação destes patógenos.

6. Imunologia da infecção

Após a chegada ao intestino, *Salmonella* spp. coloniza o epitélio intestinal por meio do sistema de secreção do tipo III (T3SS) que é expresso por genes localizados nas SPI-1 e SPI-2 (LOU et al., 2019). O primeiro contato com o epitélio, desencadeia um processo inflamatório intenso com a liberação de sinalizadores que promovem quimiotaxia de células imunes até o local da inflamação (HUANG et al., 2020).

Citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como por exemplo, IL-1 β , IL-18, CXCLi2 e CCL4, são secretadas para o recrutamento de macrófagos, heterófilos, células dendríticas e células “natural killer” (NK), que compõem as células de defesa do sistema imune inato (HUANG et al., 2020). Simultaneamente, durante o processo de colonização bacteriana, ocorre também a secreção de sulfeto de hidrogênio (H₂S) em grande quantidade pelo patógeno no lúmen intestinal, causando grandes prejuízos à mucosa e, conseqüentemente, aumentando o processo de inflamação (LEVITT et al., 1999).

Para a proteção do organismo contra os danos causados por este composto, H₂S é convertido à tiosulfato para sua neutralização. Entretanto, a conversão do tiosulfato pode oferecer vantagem a bactéria que, com a intensificação da inflamação e a migração das células imunes, ocorre a produção de óxido nítrico (NO) a partir da chegada de heterófilos, oxidando o tiosulfato em tetrationato que é utilizado como aceptor de elétrons (FURNE et al., 2001; REINDERS et al., 2007).

O contato com as células M no início da colonização facilita a entrada do patógeno na mucosa intestinal, sendo que, estas células especializadas na amostragem de antígenos, que captam e entregam aos macrófagos e células dendríticas (SHAJI et al., 2023). Macrófagos são células imunes especializadas em fagocitar outros microrganismos e provocar a morte celular; porém, ao realizar a internalização da bactéria, mecanismos de defesa são expressos por genes localizados na ilha de patogenicidade em *Salmonella* 2 (SPI-2) (SHAJI et al., 2023). Uma estrutura denominada de Vacúolo Contendo *Salmonella* (*Salmonella* Containing-Vacuole - SVC) é formada, garantido sua sobrevivência intracelular que, posteriormente, migra para a corrente sanguínea até outros órgãos, como por

exemplo, fígado e baço possibilitando que ocorra a infecção sistêmica (BUCHMEIER & HEFFRON, 1991).

A inflamação local é aumentada conforme o avanço da infecção para o controle do patógeno. Entretanto, se exacerbado pode danificar os tecidos a partir do grande recrutamento de células imunes e seus metabólitos gerados, como por exemplo, moléculas antimicrobianas (MAGAÑA et al., 2024). Sendo assim, o organismo necessita diminuir a inflamação como uma medida para controle de danos, secretando citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β), especializadas em regular a expressão de mediadores imunológicos pró-inflamatórios (Opal & Depalo, 2000; REED, 1999). Neste contexto, é possível acompanhar o desenvolvimento da patogenia e inflamação a partir da mensuração da expressão destes sinalizadores com o auxílio de técnicas laboratoriais, proporcionando o entendimento da interação patógeno-hospedeiro.

7. Métodos de detecção de citocinas e interleucinas

Citocinas são proteínas que possuem um papel fundamental na comunicação celular e na regulação da resposta imune (ZHANG & NA, 2007). A quantidade e o tipo dessas moléculas secretadas são dependentes do estado em que a infecção se encontra, por exemplo, no primeiro contato de um patógeno com as células imunes do hospedeiro uma resposta inflamatória é desencadeada com a liberação de citocinas pró-inflamatórias e, ao alcançar níveis elevados, citocinas anti-inflamatórias são secretadas, regulando a resposta imune (SHAJI et al., 2023; Opal & Depalo, 2000). Portanto, a detecção e quantificação destas moléculas permitem uma análise detalhada do processo infeccioso, auxiliando no entendimento da relação patógeno-hospedeiro.

Atualmente, existem diversas técnicas para a detecção e quantificação dos níveis de citocinas, entre as mais conhecidas, o ensaio imunoenzimático (ELISA), que utiliza anticorpos para a detecção das citocinas presentes em amostras biológicas (CHISWICK et al., 2012); “Microarray” de RNA, através da hibridização de cDNA e análise por fluorescência (CHENG et al., 2020); Sequenciamento de mRNA (RNA-Seq), que analisa o conjunto de transcritos de uma biblioteca de cDNA previamente

construída (STARK; GRZELAK; HADFIELD, 2019); Reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-qPCR), quantificando o material genético por PCR por meio de fluorescência (WONG & MEDRANO, 2005).

Diante disto, a escolha da técnica para a análise da expressão destas proteínas durante um processo infeccioso é estabelecida de acordo com cada delineamento experimental. No caso da avaliação de alvos específicos, como interleucinas pró-inflamatórias, a técnica de RT-qPCR torna-se uma escolha interessante, por apresentar grande especificidade e precisão.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA). **Relatório anual: 2021**. Brasil: São Paulo, 2022.

BARROW, P. A. The paratyphoid salmonellae. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 19, n. 2, p. 351-375, 2000.

CAO, C.; XIAO, Z.; GE, C.; WU, Y. Application and research progress of proteomics in chicken meat quality and identification: a review. **Food reviews international**, v. 38, n. 3, p. 313-334, 2022.

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

BUCHMEIER, NANCY A.; HEFFRON, F. R. E. D. Inhibition of macrophage phagosome-lysosome fusion by *Salmonella typhimurium*. *Infection and immunity*, v. 59, n. 7, p. 2232-2238, 1991.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **National Salmonella Surveillance Overview**. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2011. Disponível em:

<<https://www.cdc.gov/nationalsurveillance/salmonella-surveillance.html>> Acesso em: 03 jun. 2024.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **National Enteric Disease Surveillance: Salmonella Annual Report, 2016**. Georgia: US Department of Health and Human Services; 2018.

CHEN, J.; ZHANG, L.; PAOLI, G.C.; SHI, C.; TU S.; SHI, X. A real-time PCR method for the detection of *Salmonella enterica* from food using a target sequence identified by comparative genomic analysis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, p.168- 174, 2010.

CHENG, S.; SINHA, S.; FAN, C.; LIU, Y.; BOBIK, T.M. Genetic analysis of the protein shell of the microcompartments involved in coenzyme B12-dependent 1,2-propanediol degradation by *Salmonella*. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 6, p.1385-1392, 2011.

CHENG, X.Q.; LIANG, X.Z.; WEI, S.; DING, X.; HAN, G.H.; LIU, P.; SUN, X.; QUAN, Q.; TANG, H.; ZHAO, Q.; SHANG, A.J.; PENG, J. Protein microarray analysis of cytokine expression changes in distal stumps after sciatic nerve transection. **Neural Regeneration Research**, v. 15, n. 3, p. 503-511, 2020.

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.

CHISWICK, E.L.; DUFFY, E.; JAPP, B.; REMICK D. Detection and quantification of cytokines and other biomarkers. **Leucocytes: Methods and Protocols**, p. 15-30, 2012.

CHOWDHURY, C.; CHUN, S.; SAWAYA, M.R.; YEATES, T.O.; BOBIK, T.A. The function of the PduJ microcompartment shell protein is determined by the genomic position of its encoding gene. **Molecular Microbiology**, v. 101, n. 5, p.770-783, 2011.

CROWLEY, C.S.; CASCIO, D.; SAWAYA, M.R.; KOPSTEIN, J.S.; BOBIK, T.A.; YEATES, T.O. Structural insights into the mechanisms of transport across the

Salmonella enterica Pdu microcompartment shell. **The Journal of Biological Chemistry, Bethesda**, p.1- 20, 2010.

CRHANOVA, M.; HRADECKA, H.; FALDYNOVA, M.; MATULOVA, M.; HAVLICKOVA, H.; SISAK, F.; RYCHLIK, I. Immune response of chicken gut to natural colonization by gut microflora and to *Salmonella enterica* serovar enteritidis infection. **Infection and immunity**, v. 79, n. 7, p. 2755-2763, 2011.

DUFF, N.; STEELE, A.D.; GARRETT, D. Global action for local impact: the 11th international conference on typhoid and other invasive Salmonellosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. Supplement_2, p. S59-S63, 2020.

EFSA Panel on Biological Hazards (EFSA BIOHAZ Panel); KOUTSOUMANIS, K.; ALLENDE, A.; ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A.; BOLTON, D.; BOVER-CID, S.; CHEMALY, M.; DE CESARE, A.; HERMAN, L.; HILBERT, F.; LINDQVIST, R.; NAUTA, M.; PEIXE, L.; RU, G.; SIMMONS, M.; SKANDAMIS, P.; SUFFREDINI, E.; DEWULF, J.; HALD, T.; MICHEL, V.; NISKANEN, T.; RICCI, A.; SNARY, E.; BOELAERT, F.; MESSENS, W.; DAVIES, R. *Salmonella* control in poultry flocks and its public health impact. **Efsa Journal**, v. 17, n. 2, p. e05596, 2019.

European Food Safety Authority (EFSA); European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. **EFSA Journal, European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC)**, v. 19, n. 12, p. 38-84, 2021.

European Food Safety Authority (EFSA). EFSA explains zoonotic diseases – Salmonella, **European Food Safety Authority**, 2014.

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.

FLECKENSTEIN, J.M.; MATTHEW KUHLMANN, F.; SHEIKH, A. Acute bacterial gastroenteritis. **Gastroenterology Clinics**, v. 50, n. 2, p. 283-304, 2021.

FREITAS NETO, O.C.; PENHA FILHO, R.A.C.; BERCHIERI JUNIOR, A. **Salmoneloses aviárias**. In: Andreatti Filho RL, Berchieri Junior A, Silva EN, Back A,

Di Fabio J, Zuanaze MAF (Eds.) Doenças das aves. Campinas: FACTA, p. 495-518, 2020.

FURNE, J. SPRINGFIELD, J.; KOENIG, T.; DEMASTER, E.; LEVITT, M.D. Oxydation of hydrogensulfide and methanethiol to thiosulfate by ratt issues: a specialized function of the colonic mucosa. **Biochemical Pharmacology**. v. 62, p.255-259, 2001.

GAL-MOR, O., BOYLE, E.C., GRASSI, G.A. Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ. **Frontier of Microbiology**, v.5, n. 391, p.1-10, 2014.

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.

HARVEY, P.C.; WATSON, M.; HULME, S.; LOVELL, M.; BERCHIERI, A. Jr; YOUNG, J.; BUMSTEAD, N.; BARROW, P. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colonizing the lumen of the chicken intestine grows slowly and upregulates a unique set of virulence and metabolism genes. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 10, p.4105-4121, 2011.

Havenstein, G.B.; Crittenden, L.B.; Petite, J.N.; Qureshi, H.A.; Foster D.N. Application of biotechnology in the poultry industry. **Animal Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 15-36, 1992.

HEITHOFF, D.M.; CONNER, C.P.; HENTSCHEL, U.; GOVANTES, F.; HANNA, P.C.; MAHAN, M. J. Coordinate intracellular expression of *Salmonella* genes induced during infection. **Journal Bacteriology**, v. 181, p.799-807, 1999.

HENSEL M.; HINSLEY, A.P.; NIKOLAUS, T.; SAWERS, G.; BERKS, B.C. The genetic basis of tetrathionate respiration in *Salmonella* Typhimurium. *Molecular Microbiology*, v. 32, n. 2, p.275-287, 1999.

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.

HOFFMANN, S.; BATZ, M.B.; MORRIS Jr, J.G.. Annual cost of illness and quality-adjusted life year losses in the United States due to 14 foodborne pathogens. **Journal of food protection**, v. 75, n. 7, p. 1292-1302, 2012.

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.

HUANG, K.; FRESNO, A.H.; SKOV, S.; OLSEN, J.E. Dynamics and outcome of macrophage interaction between *Salmonella* Gallinarum, *Salmonella* Typhimurium, and *Salmonella* Dublin and macrophages from chicken and cattle. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 9, p. 420, 2020.

ISSENHUTH-JEANJEAN, S.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; GUIBOURDENCHE, M.; DE PINNA, E.; NAIR, S.; FIELDS, P.I.; WEILL, F.X. Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in microbiology**, v.165, n. 7, p.526-30, 2014.

JAJERE, S.M. A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. **Veterinary world**, v. 12, n. 4, p. 504, 2019.

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.

JUNG, B.; PARK, S.; KIM, E.; YOON, H.; HAHN, T. W. *Salmonella* Typhimurium lacking *phoBR* as a live vaccine candidate against poultry infection. **Veterinary Microbiology**, v. 266, p. 109342, 2022.

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.

KLUMPP, J.; FUCHS, T. M. Identification of novel genes in genomic islands that contribute to *Salmonella* typhimurium replication in macrophages. **Microbiology**, v. 153, p.1207-1220, 2007.

LAWLEY, T.D.; BOULEY, D.M.; HOY, Y.E.; RELMAN, D.A.; MONACK, D.M. Host transmission of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is controlled by virulence factors and indigenous intestinal microbiota. **Infection and Immunology**, v. 76, n. 1, p.403-416, 2008.

LEVITT, M.D.; FURNE, J.; SPRINGFIELD, J.; SUAREZ, F.; DEMASTER, E. Detoxification of hydrogen sulfide and methanethiol in the cecal mucosa. **The Journal of clinical investigation**, v. 104, n. 8, p. 1107-1114, 1999.

LOU, L.; ZHANG, P.; PIAO, R.; WANG, Y. *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI-1) and its complex regulatory network. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 9, p. 270, 2019.

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.

MAGAÑA, G.; HARVEY, C.; TAGGART, C.C.; RODGERS, A.M. Bacterial Outer Membrane Vesicles: Role in Pathogenesis and Host-Cell Interactions. **Antibiotics**, v. 13, n. 1, p. 32, 2023.

MAJOWICZ, S.E.; MUSTO, J.; SCALLAN, E.; ANGULO, F.J.; KIRK, M.; O'BRIEN, S.J.; JONES, T.F.; FAZIL, A.; HOEKSTRA, R.M.; International Collaboration on Enteric Disease 'Burden of Illness' Studies. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. **Clinical infectious diseases**, v. 50, n. 6, p. 882-889, 2010.

MARQUES, P. R. C.; TRINDADE, R. V. R. Panorama Epidemiológico Dos Surtos De Doenças Transmitidas Por Alimentos Entre 2000 E 2021 No Brasil. **Revista Multidisciplinar em Saúde**, v. 3, n. 3, 2022.

Organization for Economic Co-operation and Development (OECD); Food and Agriculture Organization (FAO). OECD-FAO agricultural outlook 2022-2031, OECD Publishing, Paris, 2022.

Poppe C. *Salmonella* infections in the domestic fowl. In: Wray C, Wray A, eds. *Salmonella in Domestic Animals*. **Wallingford: CAB International**, pp. 107–132, 2000.

World Organization for Animal Health (WOAH). Fowl typhoid and Pullorum disease, Capítulo 3.3.11. In: OIE (Ed.). **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals**, p.914-930, 2018.

World Organization for Animal Health (WOAH). Diseases, infections and infestation listed by the OIE, Capítulo 1.3. In: OIE (Ed. 29). **Terrestrial Animal Health Code**, p.4-6, 2022.

OPAL, S.M.; DEPALO, V. A. Anti-inflammatory cytokines. **Chest**, v. 117, n. 4, p. 1162-1172, 2000.

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.

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.

REED, S.G. TGF- β in infections and infectious diseases. **Microbes and Infection**, v. 1, n. 15, p. 1313-1325, 1999.

REINDERS, C.A.; JONKERS, D.; JANSON, E.A.; STOCKBRÜGGER, R.W.; STOBBERINGH, E.E.; HELLSTRÖM, P. M.; LUNDBERG, J. O. Rectal nitric oxide and fecal calprotectin in inflammatory bowel disease. **Scandinavian journal of gastroenterology**, v. 42, n. 10, p. 1151-1157, 2007.

RIVIERA-CHAVEZ, F.; WINTER, S.E.; LOPEZ, C.A.; XAVIER, M.N.; WINTER, M.G.; NUCCIO, S.; RUSSELL, J.M.; LAUGHLIN, R.C.; LAWHON, S.D.; STERZENBACH, T.; BEVINS, C.L.; TSOLIS, R.M.; HARSHEY, R.; ADAMS, L.G.; BAUMLER, A.J. *Salmonella* uses energy taxis to benefit from intestinal inflammation. **Plos Pathogens**, v. 9, n. 4, p.1-13, 2013.

SAMPSON, E.M.; BOBIK, T.A. Microcompartments for B12-dependent 1,2-propanediol degradation provide protection from DNA and cellular damage by a reactive metabolic intermediate. **Journal of Bacteriology**, p.2966-2971, 2008.

SARAIVA, M.M.S.; RODRIGUES ALVES, L.B.; MONTE, D.F.M.; FERREIRA, T.S.; BENEVIDES, V.P.; BARBOSA, F.O.; FREITAS NETO, O.C.; ALMEIDA, A.M.; BARROW, P.A.; BERCHIERI Jr A. Deciphering the role of *ttrA* and *pduA* genes for *Salmonella enterica* serovars in a chicken infection model. **Avian Pathology**, v. 50, n. 3, p. 257-268, 2021.

SETTA, A.; BARROW, P.A.; KAISER, P.; JONES, M.A. Immune dynamics following infection of avian macrophages and epithelial cells with typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars; bacterial invasion and persistence, nitric oxide and oxygen production, differential host gene expression, NF-κB signalling and cell cytotoxicity. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 146, n. 3-4, p. 212-224, 2012.

SHAJI, S.; SELVARAJ, R.K.; SHANMUGASUNDARAM, R. *Salmonella* infection in poultry: a review on the pathogen and control strategies. **Microorganisms**, v. 11, n. 11, p. 2814, 2023.

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.

STARK, R.; GRZELAK, M.; HADFIELD, J. RNA sequencing: the teenage years. **Nature Reviews Genetics**, v. 20, n. 11, p. 631-656, 2019.

STECHER, B.; ROBBIANI, R.; WALKER, W.A.; WESTENDORF, A.M.; BARTHEL, M.; KREMER, M.; CHAFFRON, S.; MACPHERSON, A.J.; BAUR, J.; PARKILL, J.; DOUGAN, G.; MERING, C.; HARDT, W. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Exploits Inflammation to Compete with the Intestinal Microbiota. **Plos Biology**, v. 5, n. 10, p.2177-2189, 2007.

RICKE, S.C. Insights and challenges of *Salmonella* infection of laying hens. **Current Opinion in Food Science**, v. 18, p. 43-49, 2017.

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.

WONG, M.L.; MEDRANO, J.F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **Biotechniques**, v.39, n.1, p.75-85, 2005.

WINTER, S.E.; THIENNIMITR, P.; WINTER, M.G.; BUTLER, B.P.; HUSEBY, D.L.; CRAWFORD, R.W.; RUSELL, J. M.; BEVINS, C.L.; ADAMS, L.G.; TSOLIS, 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.

ZHANG, J.M.; AN, J. Cytokines, inflammation, and pain. **International anesthesiology clinics**, v. 45, n. 2, p. 27-37, 2007.

ZHANG, L.; FU, Y.; XIONG, Z.; MA, Y.; WEI, Y.; QU, X.; ZHANG, H.; ZHANG, J.; LIAO M. Highly prevalent multidrug-resistant *Salmonella* from chicken and pork meat at retail markets in Guangdong, China. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 2104, 2018.

CAPÍTULO 2 - Deletion of *ttrA* and *pduA* genes in *Salmonella enterica* serovars induces a comparable immune response to wild-type infection in different chicken lineages

Original Research Article

Deletion of *ttrA* and *pduA* genes in *Salmonella enterica* serovars induces a comparable immune response to wild-type infection in different chicken lineages.

Túlio S. Lima^{1†}, Mauro M. S. Saraiva^{1,2†*}, Adriana Maria de Almeida¹, Taisa S. Ferreira¹, Lucas B. Rodrigues Alves^{1,2}, Viviane A. Ferreira¹, Oliveira C. de Freitas Neto³, Paul A. Barrow⁴, Angelo Berchieri Junior^{1*}

¹São Paulo State University (UNESP), School of Agricultural and Veterinary Sciences, Jaboticabal, SP, 14884-900, Brazil.

²Department of Veterinary and Animal Sciences, University of Copenhagen (UK), Frederiksberg C., 1870, Denmark.

³Department of Preventive Veterinary Medicine, Veterinary School, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, 31279-901, Brazil.

⁴School of Veterinary Medicine and Science, Daphne Jackson Road, University of Surrey, Guildford GU2 7AL, UK.

[†]Túlio Spina de Lima and Mauro M. S. Saraiva contributed equally to this article.

*Corresponding author: Dr. Mauro de Mesquita Souza Saraiva (saraiva_ufba@hotmail.com; mauro.saraiva@unesp.br), or Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior (angelo.berchieri@unesp.br).

ABSTRACT

One of the major causes of foodborne infections is *Salmonella enterica*. In the initial stages of infection, the bacterium causes acute intestinal inflammation and generates nutrients like tetrathionate and 1,2-propanediol, which the pathogen uses for overgrowth and outcompete the gut microbiota. The inflammation triggers an immune response through immune cells and signals other cells through the production of cytokines. This study aimed to evaluate the immune response of different lineages of chicks infected by *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis with *ttrA* and *pduA* gene deletions. Our work was separated into two experiments, one for each strain, utilizing 108 chicks to collect spleen and caecal tonsils for measuring immune response through RT-qPCR. From the immune response analysis, *Salmonella* Enteritidis mutant and wild-type strains elicited upregulated pro-inflammatory cytokines on the first-day post-infection, most intense when compared to *Salmonella* Typhimurium strains (mutant and wild-type). However, the deletions do not interfere with the immune response elicited between mutant and wild-type strains in the caecal tonsil and spleen. Also, broilers presented a more prominent immune response than other lineages. In conclusion, *Salmonella enterica* serovars containing *ttrA* and *pduA* gene deletion provoke an immune response with the same intensity as respective wild-type strains.

Keywords: 1,2-propanediol; Cytokines; Immune response; *Salmonella* Enteritidis; *Salmonella* Typhimurium; Tetrathionate.

Research highlights

- *ttrA* and *pduA* deletion in *Salmonella* do not provoke a more intense immune response.
- The *SEΔttrApduA* elicited more intense immune responses than *STMΔttrApduA*.
- The immune response in the broiler was more intense than in other lineages.

- Tetrathionate cannot be the principal metabolic pathway in an anaerobic environment.

1. Introduction

Salmonella enterica subsp. *enterica* is one of the major causes of foodborne infections worldwide, currently associated with the consumption of poultry products (Jung, et al., 2022). In Europe, in 2022, *Salmonella* Enteritidis (SE) and *Salmonella* Typhimurium (STM) were the serovars most frequently isolated from chickens and their products, accounting for 67,3% and 13,1% of human infections, respectively (EFSA, 2023). These infections can cause a range of unpleasant symptoms, such as diarrhea, vomiting, and fever, and can evolve into serious consequences, including sepsis and endocarditis (Jung et al., 2022).

During *Salmonella* spp. infection, acute intestinal inflammation favours the colonization of the epithelial cells under anaerobic conditions, which restrict the availability of nutrients (Winter et al., 2010). Therefore, the ability to use exclusive nutrients from the inflammation offers a significant advantage for pathogens: for instance, tetrathionate ($S_4O_6^{2-}$) as an electron acceptor (through *ttr* operon expression); 1,2 propanediol as an energy source under anaerobic conditions, in the presence of $S_4O_6^{2-}$, through bacterial microcompartments (*pdu* operon) (Winter et al., 2010; Staib & Fuchs, 2015).

Faced with this mechanism of surviving in the intestinal environment, fast host defence is essential to overcome infection. In the early infection stages, the innate immune response is the first line of defence of the host. Pathogen Recognition Receptors (PRRs) perform pathogen identification and are present in a large number of immune cells, such as dendritic cells, phagocytes, and barrier epithelial cells (Shaji et al., 2023). After the first interaction with the bacteria, the innate immune response is activated, and cytokines responsible for inflammation are secreted, for example, IL-1 β (Magaña et al. 2024). Afterward, monocytes and macrophages are activated, leading to inflammatory cell death and tissue damage. Therefore, this may facilitate immune system evasion (Magaña et al., 2024).

Previous studies have shown mixed results regarding the role of these genes. Winter et al. (2010) demonstrated attenuation of STM with *ttrA* gene knockout during murine infection. On the other hand, Saraiva et al. (2021) observed that STM with both *ttrA* and *pduA* gene deletion provoked more intense infections in chickens. However, the information focuses on comprehending how the absence of *ttrA* and *pduA* genes impair immune response in chickens remains scarce. Here, we aimed to comprehend an immune response in chickens by analysing the cytokines expression in different commercial lineages of birds, during the challenge by *Salmonella* serovars containing deletions on genes related to the metabolization of tetrathionate (*ttrA*) and 1,2-propanediol (*pduA*).

2. Material and Methods

2.1. Local and Conduction of Experiment

The experiment was carried out in two steps, according to *Salmonella enterica* serovar used, both in the Avian Pathology Laboratory from the Department of Pathology, Reproduction, and One Health from the School of Agricultural and Veterinary Sciences, Sao Paulo State University. All procedures were approved by the Ethical Committee on the Use of Animals of Sao Paulo State University (CEUA/UNESP Process: 006621/18; on May 10th, 2018).

2.2. Bacterial Strain and Mutant Construction

The bacterial strains used in this study are *Salmonella* Typhimurium str. 98 (Barrow et al., 1990) and *Salmonella* Enteritidis P125109 (accession number: AM933172), which served as genetic background for the mutant construction. Before the beginning of the experiment, they were stored in Lysogeny Broth (LB, Becton Dickinson, MD, USA) supplemented with 30% glycerol for cryoprotection in an ultra-freezer at -80 °C. The bacteria used in this experiment (mutants and wild-types) were the same previously used by Saraiva et al. (2021): the wild-type strains were spontaneously induced in vitro for resistance to nalidixic acid and spectinomycin (Nal^RSpec^R), and the deletion of genes for mutant construction according to Lambda-Red technique (Datsenko &

Wanner, 2000). The resulting mutant strains were named STM Δ *ttrApduA* (*Salmonella* Typhimurium containing a deletion of both *ttrA* and *pduA*) and SE Δ *ttrApduA* (*Salmonella* Enteritidis containing a deletion of both *ttrA* and *pduA*).

2.3. In Vivo experiments

2.3.1. Experiment 1 – *Salmonella* Typhimurium

One-hundred-eight of 1-day-old chicks, whereby thirty-six for each of three lineages (broiler, semi-heavy laying hens, and light laying hens), were obtained from commercial hatcheries. Upon your arrival, swabs of the bottom of the card box were performed to verify the *Salmonella*-free status of the animals (Zancan et al., 2000). The birds were accommodated in acclimated rooms within metal cages and received antibiotic-free feed and water ad libitum. A programmed light was utilized on the first day, 24-light for optimal food and water ingestion, and 12h-light from the first week, decaying to 8h-light until the experiment finished.

Inoculums were prepared from a frozen culture, inoculated in LB, and incubated for 18h at 37 °C under 150 rpm. The next day, the culture is transferred to a fresh LB broth at 37 °C under 150 rpm overnight. Each inoculum was orally administered directly to the birds' crop with 0,2 mL from the culture containing approximately 10⁸ colony-forming units per mL (CFU/mL) (Berchieri Junior et al., 2001). Upon the challenge, were divided into nine groups (A to I) randomly formed according to each lineage and respective strain (Table 1).

For biological sample collection, in one-, three-, seven-, and 14-days post-infection (dpi), three animals per group were euthanized by cervical dislocation for each day. A diminutive segment of caecal tonsils and spleen was harvested and submerged in 300 μ L of RNALater® (Sigma-Aldrich, USA) for 24h. The following day, the reagent was retired, and samples were stored at -80 °C until RT-qPCR analysis.

2.3.2. Experiment 2 – *Salmonella* Enteritidis

In experiment 2, the exact characteristics of the previous experiment were utilized, except for bacterial serovar used. Lineages and group divisions are also presented in Table 1.

2.4. Gene expression analysis

The following sections (RNA extraction, cDNA synthesis, RT-qPCR, and statistical analysis) were carried out in the exact same conditions for both experiments.

2.5. RNA Extraction and cDNA synthesis

For RT-qPCR analysis, total RNA was extracted from tissues collected using RNeasy Mini Kit (Qiagen, GE) following the manufacturer's instructions. The RNA integrity was evaluated by agarose gel, and the quantity test was performed by spectrophotometer (DeNovix DS11+, USA) and stored at -80 °C until the next step. cDNA synthesis was performed using RNA total extract (0,8 µg per sample) with Quantitect Reverse Transcription Kit (Qiagen, GE) according to manufacturer's instructions and at storage at -20 °C before utilizing RT-qPCR analysis.

2.6. Quantitative real-time PCR (RT-qPCR) analyze

To quantify cytokines expression, RT-qPCR reactions were undertaken according to Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) principles (Bustin et al., 2009). The primer sequence of cytokines and housekeeping genes are shown in Supplementary Table 1. The PCR assays have been executed in triplicate with 6,25 µL of SYBR Green JumpStart Taq Ready Mix (Sigma-Aldrich, USA), 0,5 µM to housekeeping genes, or 0,6 µM for cytokines, 0,2 µg of cDNA template, and ultra-pure water (Sigma-Aldrich, USA) to complete 12,5 µL final volume reaction. The cycles were performed at 94 °C for 2 min, 40 cycles at 94 °C for 15 s, and 58 °C for 30 s. Final the cycles, the temperature progressively rose from 65 to 95 °C, emitting signals at each 0.5 °C to construct melting curves.

To the normalization curve, were employed five housekeeper genes: 28S rRNA (28S), Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH), Ubiquitin (UBQ), and β -actin (B-ACT) and the results of cycles of quantification (Cq) was assessed by BestKeeper (Pfaffl et al., 2004) to select of the most stable reference gene. The primer efficiency curves were performed by a two-fold serial dilution of pooled samples, which used the same volume of each cDNA sample, including negative controls. The fold change of cytokine expression was already calculated in association with the housekeeping gene using the Pfaffl method (Pfaffl, 2001). All sample reactions were carried out in triplicate.

2.7. Statistical analysis

The statistical analysis for gene expression through RT-qPCR was assessed using two-way ANOVA with Tukey's post hoc test for multiple comparisons, and statistical significance was performed when the P-value was lower than 5% ($P < 0.05$). Data analysis and graphic construction were executed in GraphPad Prism 10.0.0 for Mac OS (GraphPad Software, La Jolla California, USA).

3. Results

The parameters for the RT-qPCR analysis have been described in Supplementary Tables 2 and 3. According to our results, the reference gene selected as the most stable gene by BestKeeper was the 28S, for both experiments.

Shortly, the relative expression levels of cytokines were recovered from the caecal tonsils and the spleen. According to cytokine expression, the mutant strains presented a similar pattern during infection when compared to the wild-type strains. Relating to serovar differences, SE showed a greater immune response at the beginning of infection, with the up-regulation of pro-inflammatory cytokines in 1-dpi and down-regulation in 3-dpi, differing from STM, which demonstrated an inverse pattern. Finally, broilers had the most intense response when compared to laying hens. Detailed results will be presented below.

3.1.1. Experiment 1 – *Salmonella* Typhimurium

3.1.1.1. Broiler immune response

In caecal tonsils, the mRNA expression levels were similar. On the other hand, 1-dpi challenged birds showed down-regulation of IL-1 β , IL-18, CCL4, and CXCLi2 compared with the negative control group (NC); additionally, CCL4, CXCLi2, and IL-6 were up-regulation at 3-dpi (Figure 1). Ultimately, in the 14-dpi, only IL1- β was down-regulates in STM-WT and STM Δ *ttrApduA* concerning the NC group. The spleen analysis is detailed in Figure 2. At 1-dpi, there was a down-regulation of IL-1 β , CCL4, and CXCLi2 (Figure 2), differentiating the infected groups from the NC group. At 14 days post-infection, CXCLi2 was down-regulates in STM Δ *ttrApduA*, showing statistically significant differences (Figure 2).

3.1.1.2. Immune response of Light-laying hens

The expression levels at 1-dpi from caecal tonsils of light-laying hens showed down-regulation of IL-1 β and IL-22 in the treated groups compared to the NC group (Figure 3). At 3-dpi, IL-6, IL-22, and CCL4 were up-regulated (Figure 3), differing STM Δ *ttrApduA* from the NC group. However, in the spleen, the STM-WT group showed up-regulation of IL-1 β and CXCLi2 at 1 dpi. At other collection times and, in interleukins and cytokines studies, no differences were found in spleen immune response expression levels. Detailed results from the spleen immune response are shown in Figure 4.

3.1.1.3. Immune response of Semi-heavy laying hens

Immune expression of caecal tonsils at 1-dpi was down-regulated for IL-1 β and IL-18 between the infected groups and the NC group and, posteriorly, up-regulated in CXCLi2 on the 3-dpi (Figure 5). Furthermore, on the 7-dpi, CCL4 and CXCLi2 were up-regulated with the mutant strain (Figure 5). The spleen expression levels showed a down-regulation in a one-day post-infection CCL4 and up-regulation in a third-day post-infection among infected and NC groups (Figure 6).

3.1.2. Experiment 2 – *Salmonella* Enteritidis

3.1.2.1. Immune response of Broiler

Similar to those carried out for *Salmonella* Typhimurium, the relative expression levels of cytokines were recovered from the caecal tonsils and the spleen; the immune response in challenged broilers is shown in Figures 7 and 8. The relative expression of broilers in caecal tonsils the IL-18 in the challenge group birds concerning the NC groups, and the CXCLi2 in the mutant strain concerning the NC group were up-regulated at 1-dpi. At 3-dpi down-regulation in all cytokines from the mutant strain group: the IL-1 β , IL-6, IL-18, CCL4, and CXCLi2 were less expressed in SE Δ *ttrApduA*, while IL-17 and IL-22 were less expressed in both challenge groups (Figure 7). The expression of immune response in the spleen showed a statistical difference when broilers were challenged by SE Δ *ttrApduA* in comparison with the NC group with an up-regulation IL-6 (1-dpi); at 14-dpi SE-WT was down-regulated while SE Δ *ttrApduA* held an up-regulation of IL-1 β , IL-6, CCL4, and CXCLi2. However, IL-1 β and CCL4 in SE-WT did differ from the NC group (Figure 8).

3.1.2.2. Immune response of Light laying hens

From caecal tonsils one day after the infection, the mutant strain group had IL-18 up-regulated compared to the other groups (Figure 9). At 3-dpi, only IL-22 was up-regulation in the challenged groups (Figure 9). However, on the seventh day, the SE Δ *ttrApduA* group showed a down-regulation stand out from other groups, and to the opposite, at 14-dpi, the same group up-regulated IL-1 β and IL-6 (Figure 9). In the spleen, on the first day after the infection, the SE Δ *ttrApduA* group up-regulated IL-6 and CXCLi2, with IL-6 continuing to be up-regulated until the 3-dpi. For CXCLi2, the challenged groups showed similar levels (Figure 10).

3.1.2.3. Immune response of Semi-heavy laying hens

From immune response recovery in caecal tonsils of semi-heavy laying hens, challenged groups up-regulated in CXCLi2 and IL-18, while just SE Δ *ttrApduA* group IL-1 β and SE-WT in IL-22 at 1-dpi (Figure 11). On the third day, the up-regulation remained in challenged groups on IL-22; however, IL-17, only SE-WT remained up-regulated. Posteriorly, on the seventh day after infection, the challenged groups were down-regulated concerning NC for IL-18 and CXCLi2 (Figure 11). In 14-dpi, the SE-WT group was up-regulated compared to the NC group for IL-1 β and CXCLi2 (Figure 11). On the other hand, the spleen immune response only presented a statistical

difference for CXCLi2 (up-regulated) within the challenge groups and IL-6 (up-regulated) within the mutant strain group compared to NC (Figure 12).

4. Discussion

The host-pathogen interaction is an event multifactorial with various activation mechanisms, resulting in the establishment of the infectious process, with cell invasion, local inflammation, and immune cell recruitment. In this context, cytokines are peptides responsible for communication between host cells during infection, stimulating and regulating the immune responses (Ray et al., 2016). Our study observed a significant variation in levels of cytokines expression, with up-regulation of IL-1 β , CXCLi2, and IL-22 in the caecal tonsils and spleen, indicating the role of the innate and adaptative immune responses.

On the other hand, pathogens such as those from the Enterobacteriaceae family utilize specific metabolic pathways, in anaerobic conditions, providing an advantage for energy gain (Winter et al., 2010; Staib & Fuchs, 2015) to try to overcome host defence barriers. This benefit causes overgrowth and consequently facilitates epithelial colonization. However, it hyperstimulates the immune response, causing intense inflammation (Stecher et al., 2007), as identified in the SE Δ *ttrApduA* response, with IL-18 and IL-6 regulation.

M cells and epithelial are invaded by *Salmonella* through the type III secretion system (T3SS) codified by genes within the *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI-1) (Lou et al., 2019). Upon the first interaction, the host immune response is activated and pro-inflammatory cytokines and chemokines such as IL-1 β and CXCLi are secreted in the environment to initiate the intense inflammatory process signalling for more immune cells (Huang et al., 2020). Moreover, the bacteria can survive into macrophages utilizing genes present in a *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI-2), forming a structure called a *Salmonella*-containing vacuole (SCV) (Buchmeiert & Heffront, 1991). The immune cell with the SCV is translocated to the bloodstream and colonizes other organs, initializing a systemic infection. This ability leads to the most intense immune

response and provokes more inflammation, the host organism tries to control it with anti-inflammatory cytokines such as IL-10 (Opal & Depalo, 2000).

At the beginning of the infection (1 and 3-dpi), SE and STM exhibited an inverse pattern with up-regulation and down-regulation of pro-inflammatory cytokines, respectively. During the SE infection, the host response is characterized by the up-regulation of genes associated with inflammation (Li et al., 2017), and an increase of chemokines and macrophages to the local of the infection (Chappell et al., 2009). Furthermore, a study using macrophage-like cells (HD-11) showed that pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β , IFN- γ , and CXCLi chemokines contribute to the initial stages of infection (Huang et al., 2020). Nevertheless, STM infection in the initial newly hatched chickens showed down-regulation of genes associated with bacterial recognition (Harvey et al., 2011). Furthermore, the upregulation of IL-6, such as we identified in this study, could be related to the development, activation, or regulation of lymphocytes and macrophages instead of the rapid initiation of the inflammatory response (Withanage et al., 2005), which may be associated with the initial down-regulation of pro-inflammatory cytokines, followed by their increase between 3-dpi and 7-dpi as observed in our study.

Since the start of bacterial colonization, metabolites produced by *Salmonella enterica* like hydrogen sulphide (H₂S) and, consequently, thiosulphate (S₂O₃²⁻) are involved in the host immune response (Levitt et al., 1999; Furne et al., 2001). For instance, thiosulphate can be oxidated to tetrathionate by neutrophil transmigration and the production of nitric oxide (NO) radicals (Reinders et al., 2007). Furthermore, NO radicals are induced in inflamed tissues, monocytes, and macrophages during *Salmonella* infection (Matulova et al., 2013). The detection of LPS by monocytes through toll-like receptor 4 (TLR4), signals the production of cytokines and NO radicals (Rychlik et al., 2014); these mechanisms are mediated through *ttr* and *pdu* metabolic pathways.

Previous studies carried out by our research group reported the influence of *ttrA* and *pduA* genes regarding systemic infection, fecal excretion, and cell immune response in chicken lineages challenged by *Salmonella* Typhimurium or *Salmonella* Enteritidis (Saraiva et al., 2021; Cabrera et al., 2023). Although the behaviour of these bacteria-

containing gene deletions had been reported previously (Winter et al., 2010; Staib & Fuchs, 2015) little is known about how the absence of *ttrA* and *pduA* impact the immune response expression.

STM with deletion of the *ttrA* gene in the murine model was attenuated (Winter et al., 2010), and the *pdu* operon contributed to *Salmonella* colonization (Faber et al., 2017). However, in commercial birds, strains containing both gene deletions showed more pronounced systemic infection and high immune cell infiltration (Saraiva et al., 2021; Cabrera et al., 2023). In the present study, pro-inflammatory cytokines and chemokines in tonsils infected with SE mutant strain presented an up-regulation in 1-dpi with IL-18 and down-regulation in 3-dpi with IL-1 β , IL-17, IL-18, IL-22, CXCLi2, and CCL4, possibly to control early inflammation. These findings corroborate studies performed with a double mutant in birds. A previous report focusing on chicken immune response revealed an up-regulation of IL-1 β , IL-6, and CCL4 in the tonsils, and IL-1 β , CXCLi2, and CCL4 in the spleen at 14-dpi, suggesting an immune adaptive response (Gibson et al., 2014). In addition, the mutant strains present in this study did not differ from the respective wild-type strains. From the pattern observed, both strains have a similar immune response, indicating that other metabolic pathways can be more important for overcoming competition and obtaining colonization success during *Salmonella enterica* infection.

Regarding the difference between *Salmonella enterica* mutant serovars in these studies, SE mutant strain seems to provoke a more pronounced up-regulation at 1-dpi followed by down-regulation in 3- and 7-dpi, while STM mutant strain response is late with up-regulation only at 3-dpi and can be continued up 7-dpi. However, the intense down-regulation for a longer period in SE, could indicate more inflammation, needing a regulation from inflammation control with the up-regulation of IL-17 at 3 dpi, which may corroborate the more area with CD8⁺ cells in caecal tonsils of SE mutant strain than the STM mutant strain (Cabrera et al., 2023). Furthermore, broilers had a more intense immune response in both bacterium strains, presenting regulations more significant than laying hens ($P < 0.0001$), corroborating the results of a previous study that analysed inflammatory cells in caecal tonsils, liver, caecum, and ileum (Cabrera et al., 2023). Therefore, Cabrera et al (2023) results corroborate our findings where

broiler infections by mutant *Salmonella* serovars demonstrated a more intense immune response expression than in other commercial bird lineages.

Finally, our study demonstrated the double deletion in both serovars, generally does not differ in the inflammatory response, although, in SE, there was an increase in the participation of innate and adaptive immune responses compared to STM infections. This allows us to understand that *ttrA* and *pduA* are not determinants of *Salmonella* infection. Therefore, we hypothesize that the success of infection can be related to other mechanisms, such as bacterial LPS for pathogen recognition, SPI for invasion and survival, and other metabolic pathways.

The analysis of immune response contributed significantly to our understanding of the pathogenesis of *Salmonella* spp. However, more information remains necessary to completely comprehend the host-pathogen interaction. Specifically, the metabolites characterization produced during the infection process could elucidate if other metabolic pathways are activated.

Acknowledgment

None reported.

Disclosure statement

The Authors declare no conflict of interest.

Funding

This work was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP) under grant numbers 2018/03189-0, 2018/21301-2, 2022/16336-7, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq under grant number 303725/2022-2 and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brazil (CAPES) under grant number Finance Code 001.

ORCID

T. S. Lima - <https://orcid.org/0000-0001-8867-6344>

M. M. S. Saraiva - <http://orcid.org/0000-0003-1875-4495>

A. M. Almeida - <http://orcid.org/0000-0002-7264-1734>

T. S. Ferreira - <http://orcid.org/0000-0003-1178-5870>

L. B. Rodrigues Alves - <http://orcid.org/0000-0001-5788-5514>

V. A. Ferreira - <https://orcid.org/0000-0002-9547-9821>

O. C. Freitas Neto - <https://orcid.org/0000-0002-1437-069X>

P. A. Barrow - <http://orcid.org/0000-0002-5607-0599>

A. Berchieri Jr - <http://orcid.org/0000-0003-2522-6500>

REFERENCES

- Barrow, P.A., Hassan, J. O & Berchieri Jr, A. (1990). Reduction in faecal excretion of *Salmonella* typhimurium strain F98 in chickens vaccinated with live and killed *S. typhimurium* organisms. *Epidemiol. Infect* (Vol. 104).
- Berchieri A., J., Murphy, C.K., Marston, K. & Barrow, P.A. (2001). 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*, 30, 221–231.
- Buchmeiert, N.A. & Heffront, F. (1991). Inhibition of Macrophage Phagosome-Lysosome Fusion by *Salmonella* typhimurium. *Infection and immunity* (Vol. 59).
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J. & Wittwer, C.T. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55, 611–622.

Cabrera, J.M., Saraiva, M.M.S., Rodrigues Alves, L.B., Monte, D.F.M., Vasconcelos, R.O., Freitas Neto, O.C. & Berchieri Junior, A. (2023). *Salmonella enterica* serovars in absence of *ttrA* and *pduA* genes enhance the cell immune response during chick infections. Scientific Reports, 13. Nature Research.

Chappell, L., Kaiser, P., Barrow, P., Jones, M.A., Johnston, C. & Wigley, P. (2009). The immunobiology of avian systemic salmonellosis. Veterinary Immunology and Immunopathology, 128, 53–59.

Crhanova, M., Hradecka, H., Faldynova, M., Matulova, M., Havlickova, H., Sisak, F. & Rychlik, I. (2011). Immune response of chicken gut to natural colonization by gut microflora and to *Salmonella enterica* serovar enteritidis infection. Infection and Immunity, 79, 2755–2763.

Datsenko, K.A. & Wanner, B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97, 6640–6645.

De Boever, S., Vangestel, C., De Backer, P., Croubels, S. & Sys, S.U. (2008). Identification and validation of housekeeping genes as internal control for gene expression in an intravenous LPS inflammation model in chickens. Veterinary Immunology and Immunopathology, 122, 312–317.

EFSA, E.F.S.A. (2023). The European Union One Health 2022 Zoonoses Report. EFSA Journal, 21. John Wiley and Sons Inc.

Faber, F., Thiennimitr, P., Spiga, L., Byndloss, M.X., Litvak, Y., Lawhon, S., Andrews-Polymenis, H.L., Winter, S.E. & Bäumler, A.J. (2017). Respiration of Microbiota-Derived 1,2-propanediol Drives *Salmonella* Expansion during Colitis. PLoS Pathogens, 13. Public Library of Science.

Fan, W.Q., Wang, H.N., Zhang, Y., Guan, Z. Bin, Wang, T., Xu, C.W., Zhang, A.Y. & Yang, X. (2012). Comparative dynamic distribution of avian infectious bronchitis virus M41, H120, and saibk strains by quantitative real-time RT-PCR in SPF chickens. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 76, 2255–2260. Japan Society for Bioscience Biotechnology and Agrochemistry.

- Furne, J., Springfield, J., Koenig, T., DeMaster, E. & Levitt, M.D. (2001). Oxidation of hydrogen sulfide and methanethiol to thiosulfate by rat tissues: a specialized function of the colonic mucosa. *Biochemical Pharmacology*, 62, 255–259.
- Gibson, M.S., Kaiser, P. & Fife, M. (2014). The chicken IL-1 family: Evolution in the context of the studied vertebrate lineage. *Immunogenetics*. Springer Verlag.
- Harvey, P.C., Watson, M., Hulme, S., Jones, M.A., Lovell, M., Berchieri, J., Young, J., Bumstead, N. & Barrow, P. (2011). *Salmonella enterica* serovar typhimurium colonizing the lumen of the chicken intestine grows slowly and upregulates a unique set of virulence and metabolism genes. *Infection and Immunity*, 79, 4105–4121.
- Huang, K., Fresno, A.H., Skov, S. & Olsen, J.E. (2020). Dynamics and Outcome of Macrophage Interaction Between *Salmonella* Gallinarum, *Salmonella* Typhimurium, and *Salmonella* Dublin and Macrophages From Chicken and Cattle. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9. Frontiers Media S.A.
- Jung, B., Park, S., Kim, E., Yoon, H. & Hahn, T.W. (2022). *Salmonella* Typhimurium lacking *phoBR* as a live vaccine candidate against poultry infection. *Veterinary Microbiology*, 266. Elsevier B.V.
- Levitt, M.D., Furne, J., Springfield, J., Suarez, F. & Demaster, E. (1999). Introduction Detoxification of hydrogen sulfide and methanethiol in the cecal mucosa. *J. Clin. Invest* (Vol. 104).
- Li, X., Zhang, P., Jiang, X., Du, H., Yang, C., Zhang, Z., Men, S., Zhang, Z., Jiang, W. & Wang, H. (2017). Differences in expression of genes in the MyD88 and TRIF signalling pathways and methylation of TLR4 and TRIF in Tibetan chickens and DaHeng S03 chickens infected with *Salmonella enterica* serovar enteritidis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 189, 28–35. Elsevier B.V.
- Lou, L., Zhang, P., Piao, R. & Wang, Y. (2019, July 31). *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI-1) and Its Complex Regulatory Network. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers Media S.A.

Magaña, G., Harvey, C., Taggart, C.C. & Rodgers, A.M. (2024, January 1). Bacterial Outer Membrane Vesicles: Role in Pathogenesis and Host-Cell Interactions. Antibiotics. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).

Matulova, M., Varmuzova, K., Sisak, F., Havlickova, H., Babak, V., Stejskal, K., Zdrahal, Z. & Rychlik, I. (2013). Chicken innate immune response to oral infection with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. Veterinary Research, 44.

Opal, S.M. & Depalo, V.A. (2000). Anti-Inflammatory Cytokines*. Chest (Vol. 117).

Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Research (Vol. 29).

Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C. & Neuvians, T.P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. Biotechnology Letters (Vol. 26).

Ray, A. (2016). Cytokines and their Role in Health and Disease: A Brief Overview. MOJ Immunology, 4. MedCrave Group, LLC.

Reinders, C.I., Jonkers, D., Jansson, E.Å., Stockbrügger, R.W., Stobberingh, E.E., Hellström, P.M. & Lundberg, J.O. (2007). Rectal nitric oxide and fecal calprotectin in inflammatory bowel disease. Scandinavian Journal of Gastroenterology, 42, 1151–1157.

Rychlik, I., Elsheimer-Matulova, M. & Kyrova, K. (2014, December 5). Gene expression in the chicken caecum in response to infections with non-typhoid *Salmonella*. Veterinary Research. BioMed Central Ltd.

Saraiva, M.M.S., Rodrigues Alves, L.B., Monte, D.F.M., Ferreira, T.S., Benevides, V.P., Barbosa, F.O., Freitas Neto, O.C., Almeida, A.M., Barrow, P.A. & Berchieri Junior, A. (2021). Deciphering the role of *ttrA* and *pduA* genes for *Salmonella enterica* serovars in a chicken infection model. Avian Pathology, 50, 257–268. Taylor and Francis Ltd.

Setta, A., Barrow, P.A., Kaiser, P. & Jones, M.A. (2012). Immune dynamics following infection of avian macrophages and epithelial cells with typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars; bacterial invasion and persistence, nitric oxide and

oxygen production, differential host gene expression, NF- κ B signalling and cell cytotoxicity. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 146, 212–224.

Shaji, S., Selvaraj, R.K. & Shanmugasundaram, R. (2023, November 1). *Salmonella* Infection in Poultry: A Review on the Pathogen and Control Strategies. *Microorganisms*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).

Staib, L. & Fuchs, T.M. (2015). Regulation of fucose and 1,2-propanediol utilization by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Frontiers in Microbiology*, 6. Frontiers Media S.A.

Stecher, B., Robbiani, R., Walker, A.W., Westendorf, A.M., Barthel, M., Kremer, M., Chaffron, S., Macpherson, A.J., Buer, J., Parkhill, J., Dougan, G., Von Mering, C. & Hardt, W.D. (2007). *Salmonella enterica* serovar typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. *PLoS Biology*, 5, 2177–2189.

Truong, A.D., Park, B., Ban, J. & Hong, Y.H. (2016). The novel chicken interleukin 26 protein is overexpressed in T cells and induces proinflammatory cytokines. *Veterinary Research*, 47. BioMed Central Ltd.

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., Tsolis, R.M., Roth, J.R. & Bäuml, A.J. (2010). Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. *Nature*, 467, 426–429. Nature Publishing Group.

Withanage, G.S.K., Wigley, P., Kaiser, P., Mastroeni, P., Brooks, H., Powers, C., Beal, R., Barrow, P., Maskell, D. & McConnell, I. (2005). Cytokine and chemokine responses associated with clearance of a primary *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection in the chicken and in protective immunity to rechallenge. *Infection and Immunity*, 73, 5173–5182.

Zancan, F.B.A., J.F.S.G.N. (2000). *Salmonella* spp investigation in transport boxes of day-old birds. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31, 230–232.

Tables:

Table 1. Groups designed for experiments 1 and 2 with bacterial strains (STM Δ ttrApduA, SE Δ ttrApduA, WT-STM, and WT-SE) and lineages (Broiler, Semi-heavy laying hens, and Light laying hens).

Group	Strain	Lineage
A	STM Δ ttrApduA or SE Δ ttrApduA	Broiler
C		Semi-heavy laying hens
E		Light laying hens
B	WT-STM or WT-SE	Broiler
D		Semi-heavy laying hens
F		Light laying hens
G	Negative Control Group	Broiler
H		Semi-heavy laying hens
I		Light laying hens

Figures:

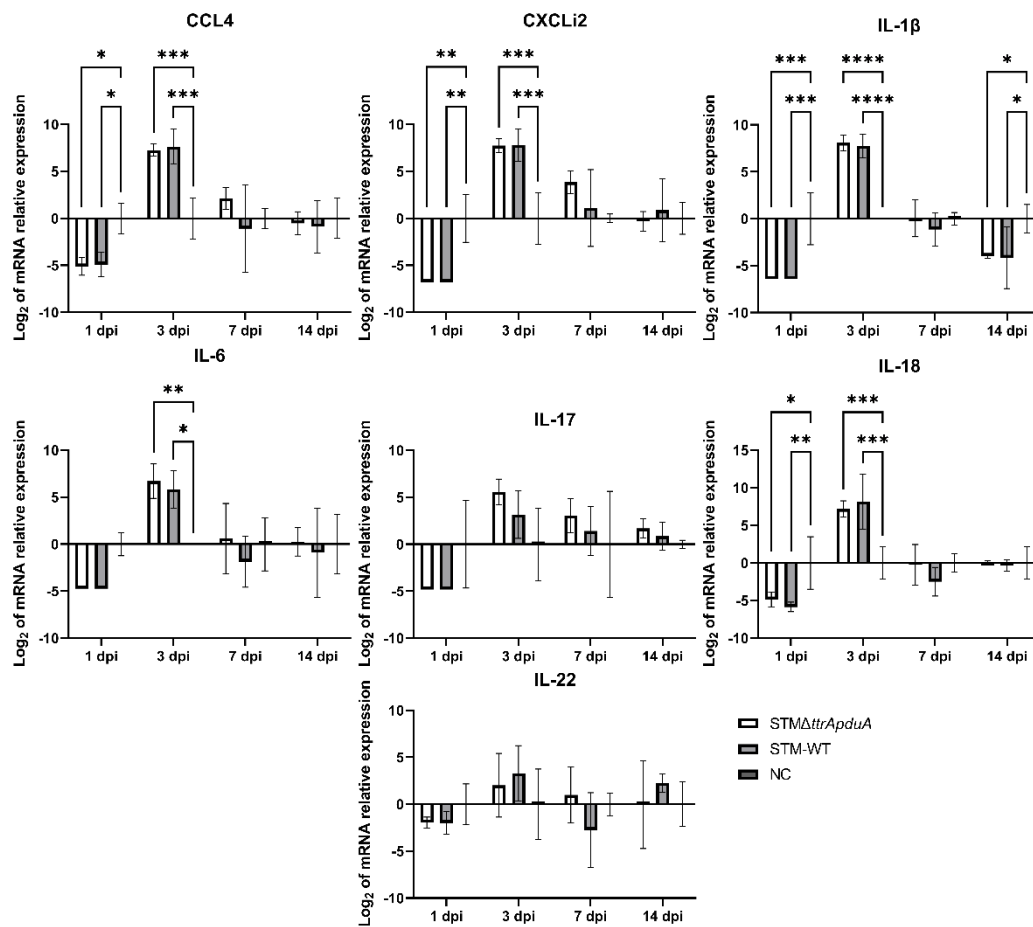


Figure 1. The expression relative of mRNA CCL4, CXCLi2, IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-18, and IL-22 gene expression in caecal tonsils of uninfected and orally infected broilers with STM Δ *ttrA**pduA* and STM-WT. Data are presented as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001.

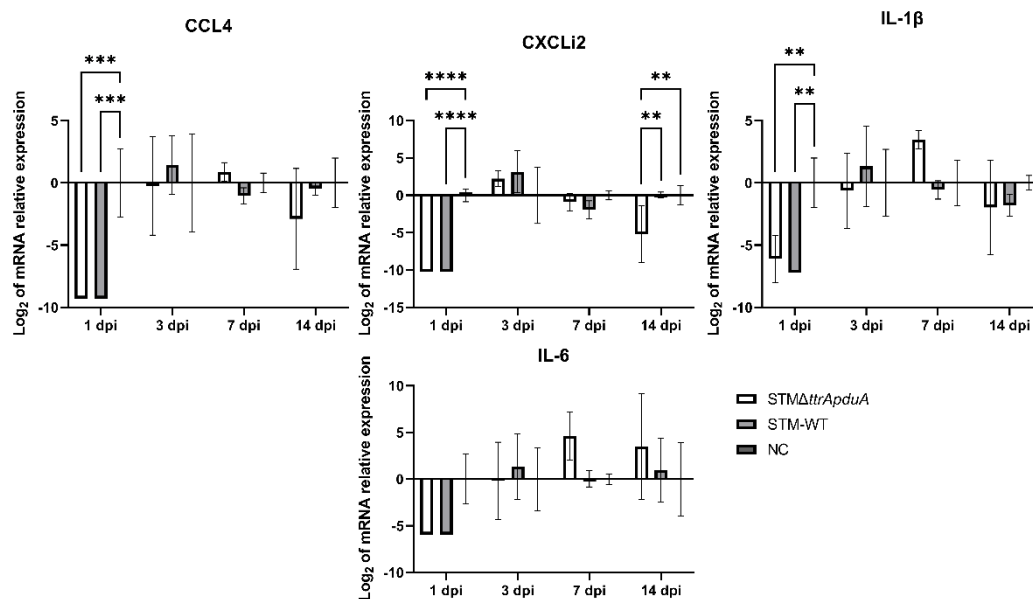


Figure 2. The expression relative of mRNA CCL4, CXCLi2, IL-1 β , and IL-6 gene expression in the spleen of uninfected and orally infected broilers with STM Δ *ttrA**pduA* and STM-WT. Data are presented as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001.

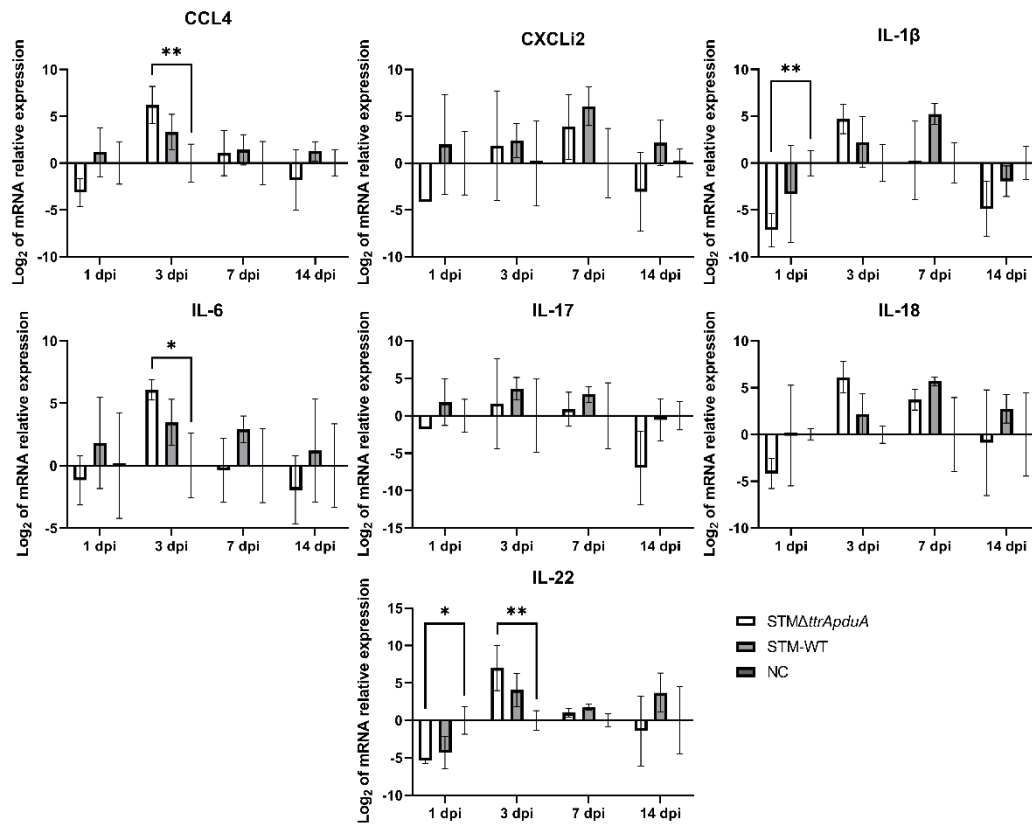


Figure 3. The expression relative of mRNA CCL4, CXCLi2, IL-1β, IL-6, IL-17, IL-18, and IL-22 gene expression in caecal tonsils of uninfected and orally infected light laying hens with STMΔttrApuA and STM-WT. Data are presented as mean ± standard error of the mean (SEM). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001.

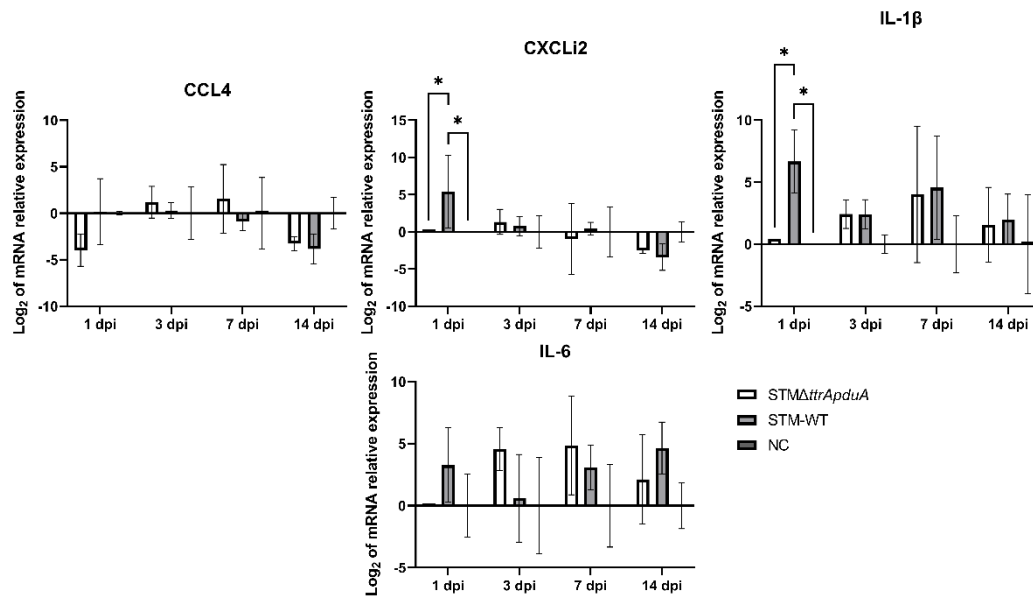


Figure 4. The expression relative of mRNA CCL4, CXCLi2, IL-1β, and IL-6 gene expression in the spleen of uninfected and orally infected light laying hens with STMΔttrAduA and STM-WT. Data are presented as mean ± standard error of the mean (SEM). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001.

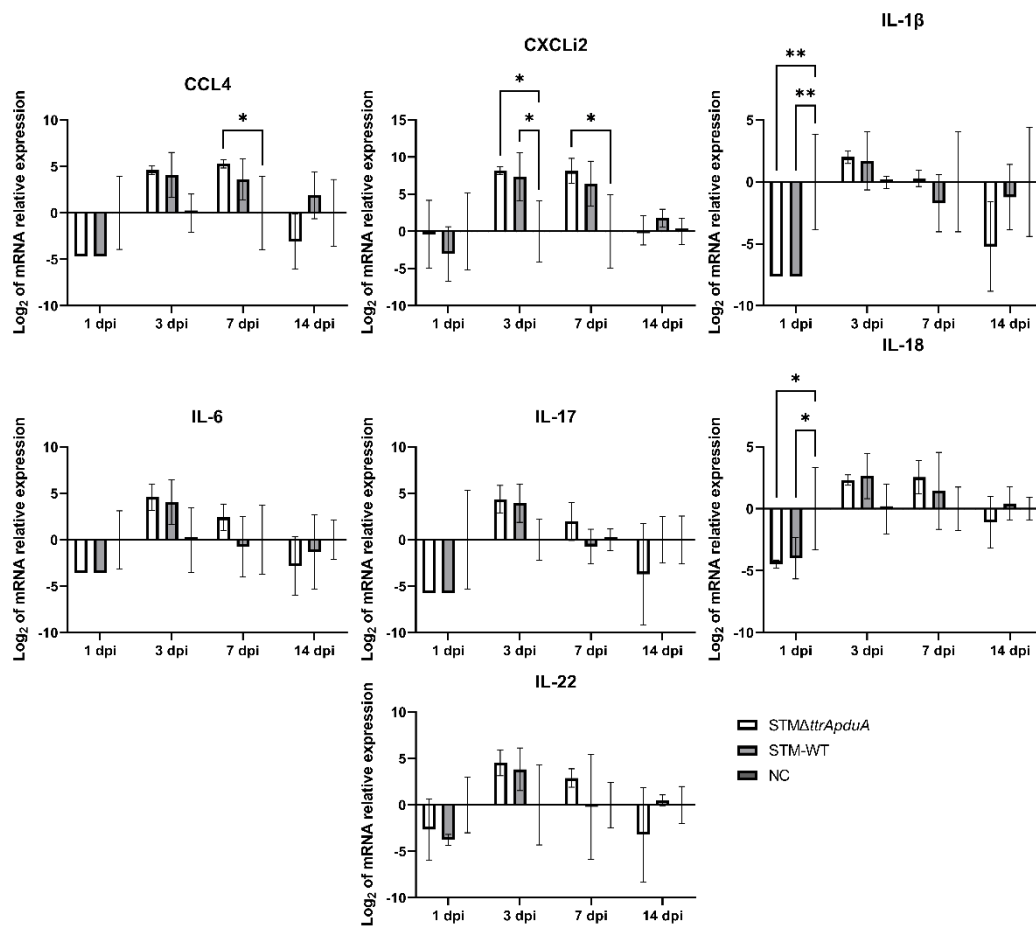


Figure 5. The expression relative of mRNA CCL4, CXCLi2, IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-18, and IL-22 gene expression in caecal tonsils of uninfected and orally infected semi-heavy laying hens with STMΔttrApuA and STM-WT. Data are presented as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001.

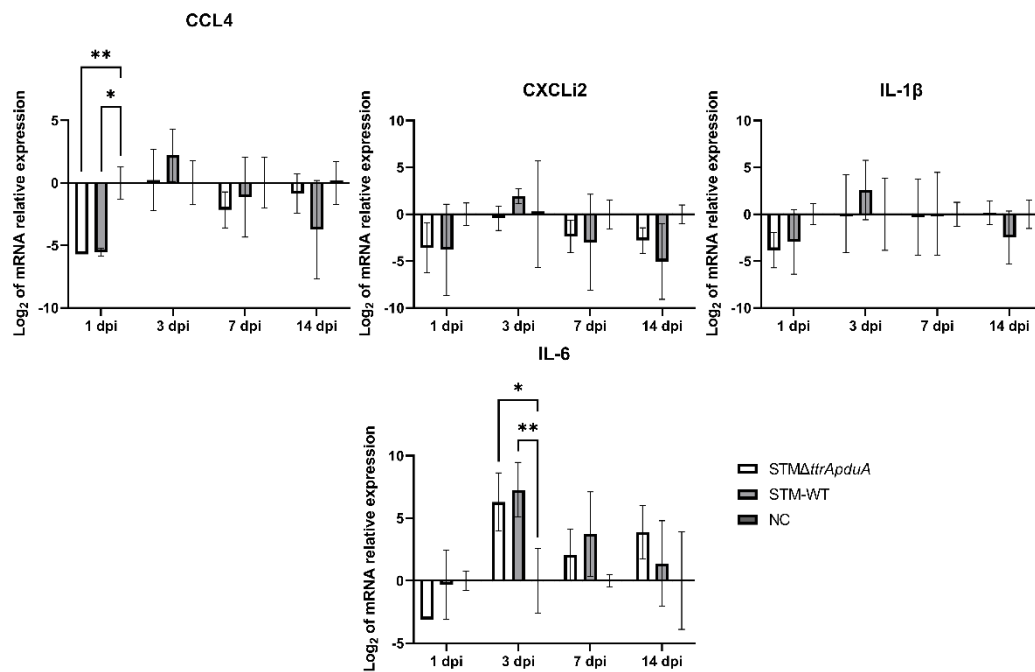


Figure 6. The expression relative of mRNA CCL4, CXCLi2, IL-1 β , and IL-6 gene expression in the spleen of uninfected and orally infected semi-heavy laying hens with STM Δ ttrAduA and STM-WT. Data are presented as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001.

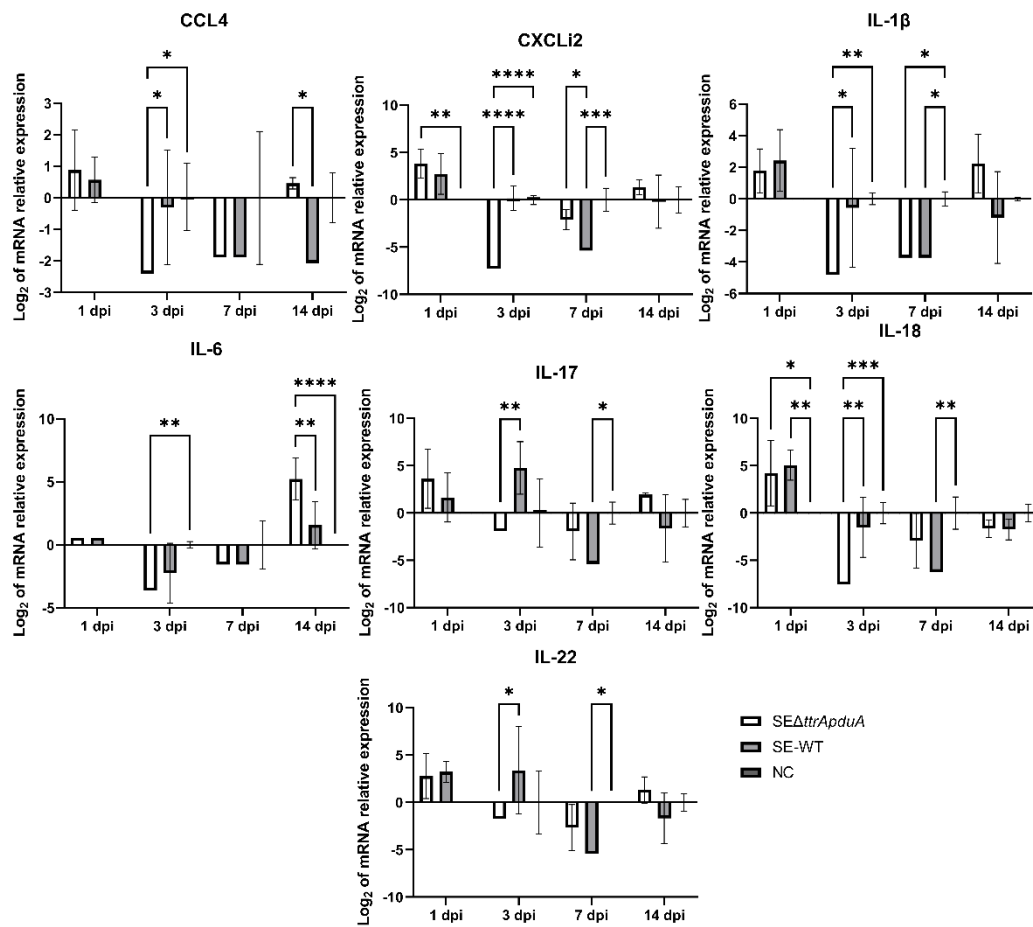


Figure 7. The expression relative of mRNA CCL4, CXCLi2, IL-1 β , IL-6, IL-17, IL-18, and IL-22 gene expression in caecal tonsils of uninfected and orally infected broilers with SE Δ trApuA and SE-WT. Data are presented as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001.

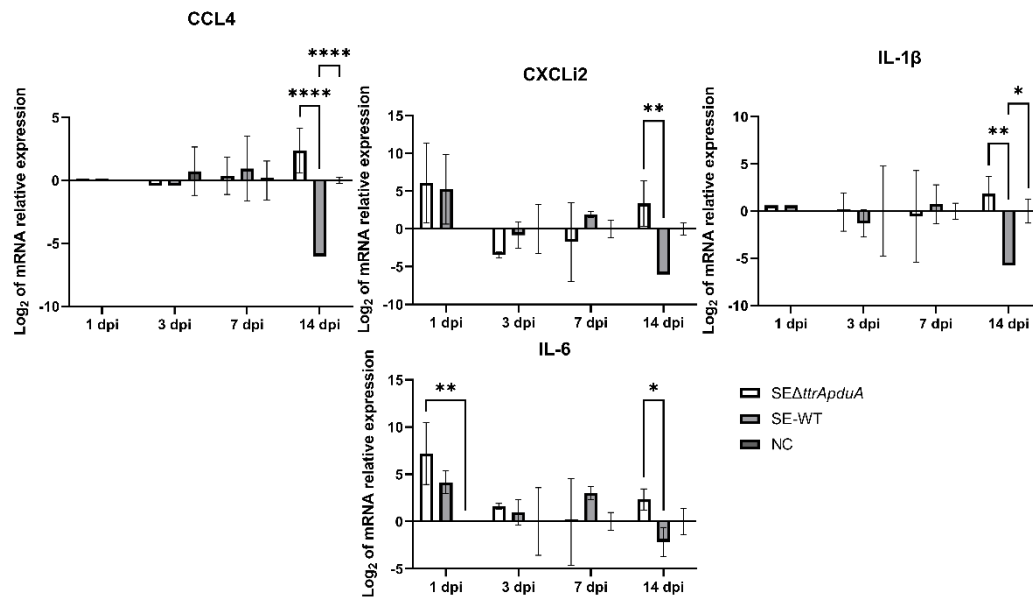


Figure 8. Figure 12. The expression relative of mRNA CCL4, CXCLi2, IL-1β, and IL-6 gene expression in the spleen of uninfected and orally infected broilers with SEΔtrApuA and SE-WT. Data are presented as mean ± standard error of the mean (SEM). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001.

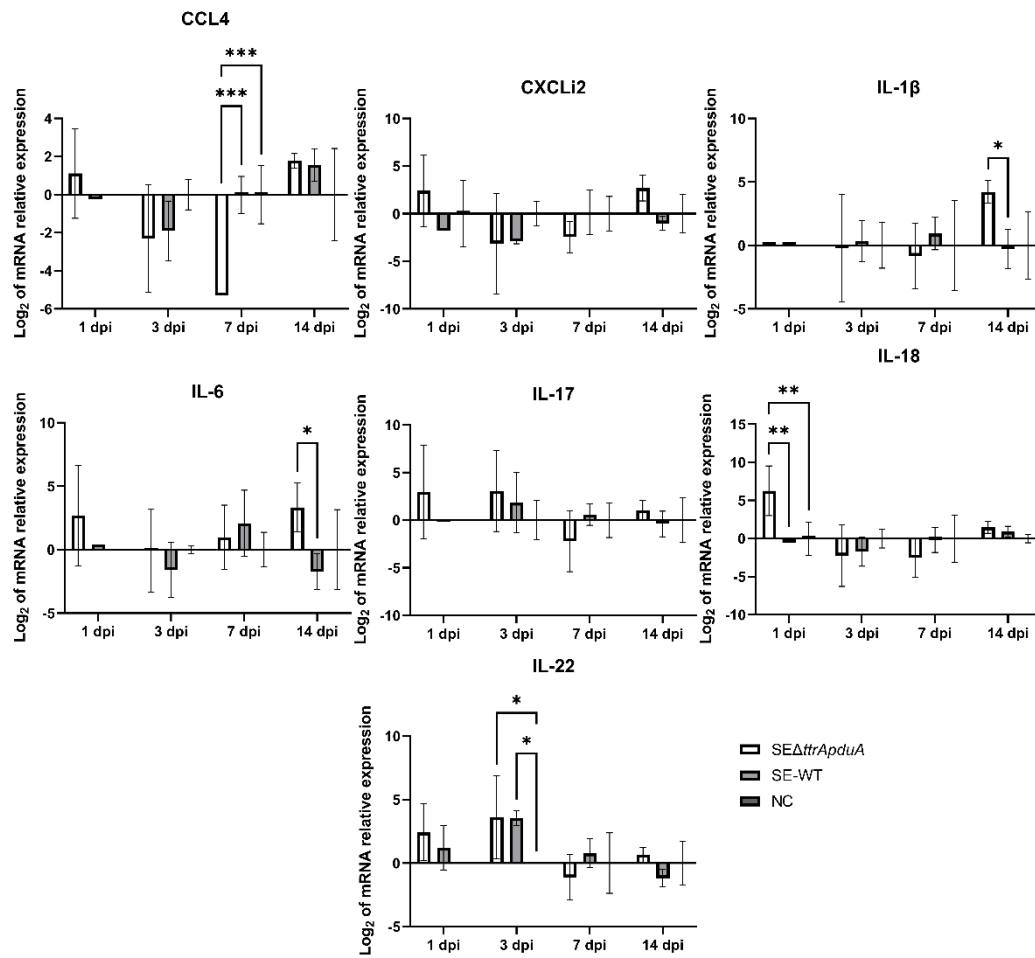


Figure 9. The expression relative of mRNA CCL4, CXCLi2, IL-1β, IL-6, IL-17, IL-18, and IL-22 gene expression in caecal tonsils of uninfected and orally infected light laying hens with SEΔttrApuA and SE-WT. Data are presented as mean ± standard error of the mean (SEM). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001.

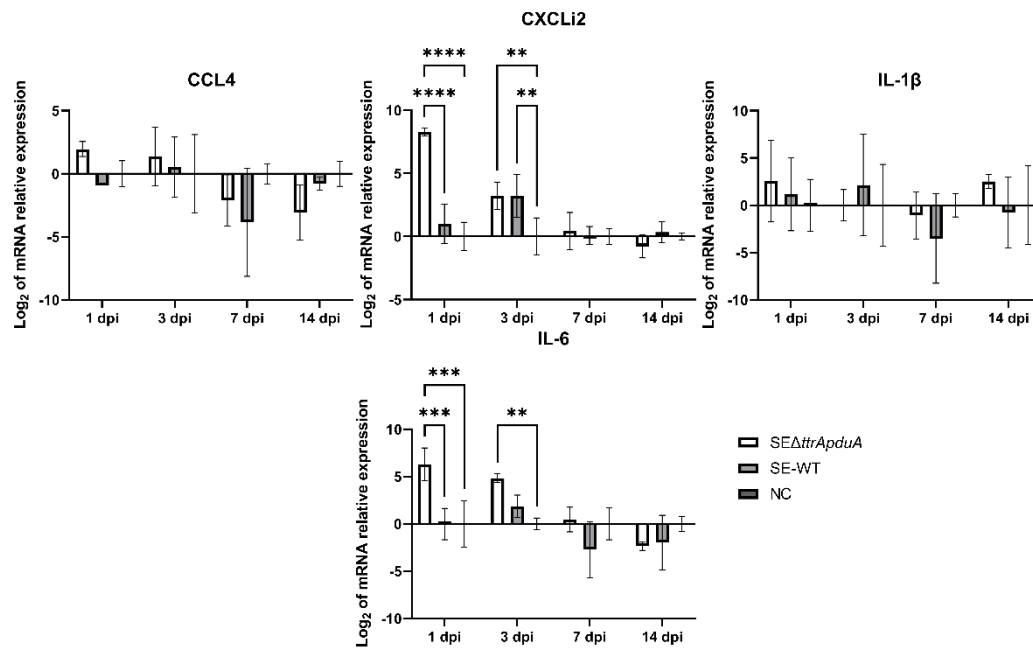


Figure 10. The expression relative of mRNA CCL4, CXCLi2, IL-1 β , and IL-6 gene expression in the spleen of uninfected and orally infected light laying hens with SE Δ ttrApuA and SE-WT. Data are presented as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001.

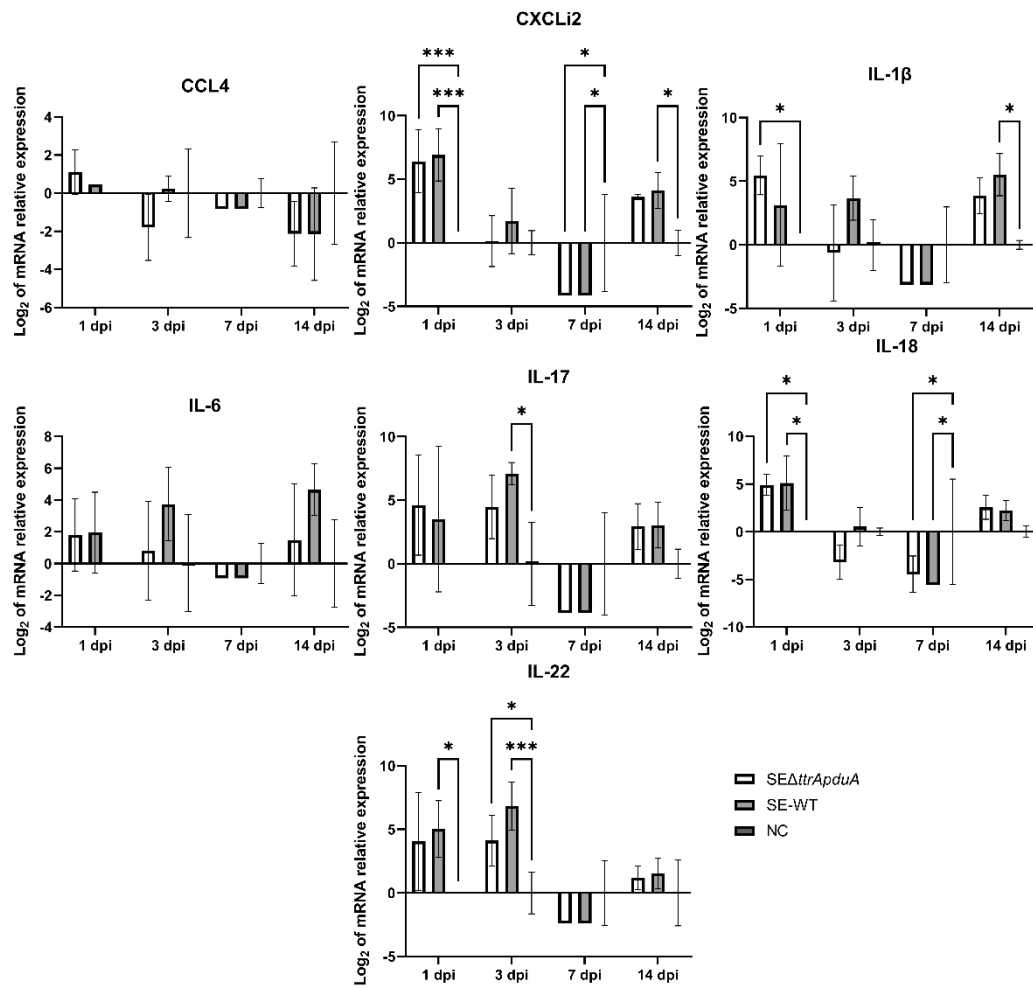


Figure 11. The expression relative of mRNA CCL4, CXCLi2, IL-1β, IL-6, IL-17, IL-18, and IL-22 gene expression in caecal tonsils of uninfected and orally infected semi-heavy laying hens with SEΔtrApuA and SE-WT. Data are presented as mean ± standard error of the mean (SEM). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001.

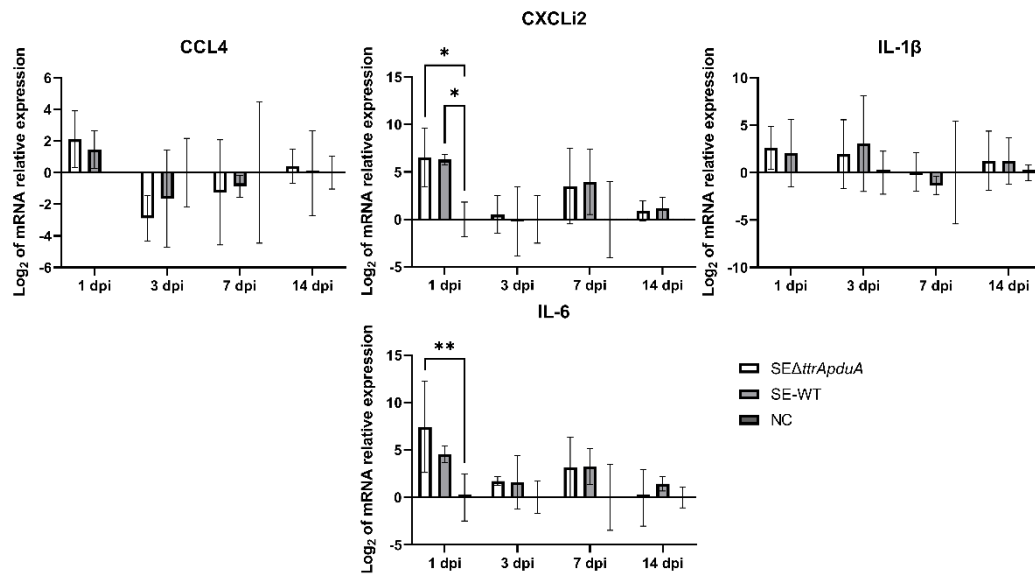


Figure 12. The expression relative of mRNA CCL4, CXCLi2, IL-1 β , and IL-6 gene expression in the spleen of uninfected and orally infected semi-heavy laying hens with SE Δ ttrApuA and SE-WT. Data are presented as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001.

Apêndice A: Supplementary Material

Supplementary Table 1. Genes and primer sequences used for RT-qPCR in the experiment.

Gene	Primer	Sequence	Amplicon	Reference	Accession number
GAPDH	F R	ggcacgccatcactatc cctgcatctgcccattt	61 pb	(De Boever et al., 2008)	K01458
28S	F R	ggcgaagccagaggaaact gacgaccgatttgacgtc	61 pb	(Setta et al., 2012)	XR_003078040.1
UBQ	F R	ggatgcagatcttcgtgaaa cttgccagcaaagatcaacctt	147 pb	(Fan et al., 2012)	M11100
B-ACT	F R	acagatcatgtttgagacctt atcacaataaccagtggtagc	101 pb	(De Boever et al., 2008)	L08165
CXCLi2	F R	gccctcctcctggtttcag tggcaccgcagctcatt	74 pb	(Setta et al., 2012)	NM_205498.1
CCL4	F R	ccccttgatcatcggtcac agaggcaggagcagagca	166 pb	(Truong et al., 2016)	NM_204720
IL-1 β	F R	gaagtgcctcgtgctggagt actggcatctgcccagttc	144 pb	(Crhanova et al., 2011)	NM_204524.2
IL-6	F R	gctcgccggcttcga ggtaggtctgaaaggcgaacag	71 pb	(Setta et al., 2012)	NM_204628.1
IL-17	F R	tatcagcaaacgctcactgg agttcacgcacctggaatg	110 pb	(Crhanova et al., 2011)	NM_204460.1
IL-18	F R	acgtggcagcttttgaagat gcggtggttttgaacagtg	88 pb	(Crhanova et al., 2011)	NM_204608.1
IL-22	F R	cagactcatcggtcagcaaa ggtacctctccttggcctct	217 pb	(Crhanova et al., 2011)	NM_001199614.1

Supplementary Table 2. RT-qPCR parameters obtained by experiment 1.

Gene of Caecal Tonsil						
	Gene	Amplification efficiencies (%E)	Correlation coefficients (R2)	Slope	y-intercept	Melting temperature (°C)
Reference genes	GAPDH	90,70	0,981	- 3,567	31,904	81 °C
	28S	99,08	0,994	- 3,344	22,528	82,5 °C
	UBQ	103,39	0,970	- 3,243	30,903	82,5 °C
	B-ACT	100,25	0,990	- 3,316	30,555	82 °C
Target genes	CCL4	104,7	0,912	- 3,214	36,443	85 °C
	CXCLi2	109,5	0,960	- 3,113	36,324	83 °C
	IL-1 β	107,9	0,930	- 3,146	40,319	88,5 °C
	IL-6	92	0,927	- 3,530	43,959	84 °C
	IL-17	99,2	0,992	- 3,342	39,970	85 °C
	IL-18	103,3	0,976	- 3,245	37,656	80 °C
	IL-22	103,7	0,932	- 3,235	38,661	80,5 °C
Gene of Spleen						
Reference genes	GAPDH	90,03	0,980	- 3,587	31,919	80,5 °C
	28S	94,97	0,986	- 3,449	23,792	82,5 °C
	UBQ	94,95	0,971	- 3,449	31,810	83 °C
	B-ACT	103,08	0,978	- 3,250	29,653	82,5 °C
Target genes	CCL4	106,5	0,919	- 3,176	39,483	85,5 °C
	CXCLi2	98,1	0,958	- 3,369	37,142	82,5 °C
	IL-1 β	105	0,903	- 3,207	40,286	88,5 °C
	IL-6	98,9	0,915	- 3,349	41,289	84 °C

Supplementary Table 3. RT-qPCR parameters obtained by experiment 2.

Gene of Caecal Tonsil						
	Gene	Amplification efficiencies (%E)	Correlation coefficients (R2)	Slope	y-intercept	Melting temperature (°C)
Reference genes	GAPDH	91,6	0,979	- 3,542	34,262	80,5 °C
	28S	99,8	0,996	- 3,326	23,921	82,5 °C
	UBQ	94,3	0,995	- 3,466	32,845	82,5 °C
	B-ACT	94,1	0,982	- 3,473	33,253	82,5 °C
Target genes	CCL4	90,5	0,953	- 3,572	41,795	85 °C
	CXCLi2	101,4	0,986	- 3,289	36,758	83 °C
	IL-1 β	106,2	0,929	- 3,182	38,709	88,5 °C
	IL-6	97	0,952	- 3,395	43,136	84 °C
	IL-17	103	0,970	- 3,251	39,427	85 °C
	IL-18	102,3	0,989	- 3,268	38,622	80 °C
	IL-22	90,8	0,989	- 3,564	37,472	81 °C
Gene of Spleen						
Reference genes	GAPDH	104,3	0,992	- 3,223	35,621	80,5 °C
	28S	100,1	0,997	- 3,321	23,897	82,5 °C
	UBQ	99,1	0,991	- 3,343	33,445	83 °C
	B-ACT	104,3	0,997	- 3,223	32,741	82 °C
Target genes	CCL4	94,7	0,917	- 3,456	39,070	84,5 °C
	CXCLi2	93,1	0,969	- 3,499	37,288	82,5 °C
	IL-1 β	92,2	0,922	- 3,525	39,531	88,5 °C
	IL-6	101,9	0,914	- 3,277	43,485	84 °C