

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**IMUNIDADE DE AVES (*Gallus gallus*) PARA *Salmonella*
enterica SUBESP. *enterica* SOROVAR GALLINARUM
BIOVAR GALLINARUM**

Silvia Juliana Acelas Díaz

Médica Veterinária

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**IMUNIDADE DE AVES (*Gallus gallus*) PARA *Salmonella*
enterica SUBESP. *enterica* SOROVAR GALLINARUM
BIOVAR GALLINARUM**

Silvia Juliana Acelas Díaz

Orientador: Prof. Dr. Angelo Berchieri Júnior

Coorientador: Dr. Rafael Antonio Casarin Penha Filho

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

2014

A173i Acelas Díaz, Silvia Juliana
Imunidade de aves (*Gallus gallus*) para *Salmonella enterica*
subesp. *enterica* Sorovar Gallinarum biovar Gallinarum / Silvia Juliana
Acelas Díaz. – – Jaboticabal, 2014
xvii, 75 f. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014
Orientador: Angelo Berchieri Júnior
Coorientador: Rafael Antonio Casarin Penha Filho
Banca examinadora: Rosemeire de Oliveira Vasconcelos, Luiz
Felipe Caron
Bibliografia

1. Resistência ao tifo aviário. 2. Resposta imune. 3. *Salmonella*
Gallinarum. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias.

CDU 616.981.49:636.5

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da
Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de
Jaboticabal.



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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: IMUNIDADE DE AVES (*Gallus gallus*) PARA *Salmonella enterica* SUBESP. *enterica* SOROVAR GALLINARUM BIOVAR GALLINARUM

AUTORA: SILVIA JULIANA ACELAS DIAZ

ORIENTADOR: Prof. Dr. ANGELO BERCHIERI JUNIOR

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. RAFAEL ANTONIO CASARIN PENHA FILHO

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

Prof. Dr. RAFAEL ANTONIO CASARIN PENHA FILHO
Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. ROSEMERI DE OLIVEIRA VASCONCELOS
Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. LUIZ FELIPE CARON
Universidade Federal do Paraná / Curitiba/PR

Data da realização: 21 de maio de 2014.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

SILVIA JULIANA ACELAS DÍAZ – nascida em 24 de Julho de 1989, na cidade de Bucaramanga, Santander (Colômbia). Formou-se em Médica Veterinária e Zootecnista em Abril do ano de 2013, pela Universidad Cooperativa de Colômbia, em Bucaramanga, Santander (Colômbia). Em Janeiro de 2012, realizou estágio curricular obrigatório no Laboratório de Ornitopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV-Unesp, Câmpus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Angelo Berchieri Júnior. Em Agosto de 2012, ingressou no curso de Mestrado no programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Área de concentração em Patologia Animal, subárea de Patologia Aviária), na FCAV-Unesp, período em que realizou o estudo intitulado “Imunidade de aves (*Gallus gallus*) para *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar Gallinarum biovar Gallinarum”, sob orientação do Prof. Dr. Angelo Berchieri Júnior e coorientação do Dr. Rafael Antonio Casarin Penha Filho. Durante o mestrado foi bolsista CAPES.

“Lute com determinação, abrace a vida com paixão, perca com classe e vença com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito para ser insignificante”

Charles Chaplin

À minha família, minha mãe Lucila Díaz Izaquita, meu pai Hernando Acelas Acelas e minha irmã Ana Maria Acelas Díaz pelo amor, incentivo e apoio nas minhas decisões. Por acreditar sempre em mim e me tornar uma mulher melhor.

À Jeison Javier Caceres Higuera por me apoiar nos momentos difíceis e por compartilhar comigo as alegrias e conquistas durante a caminhada. Agradeço ao seu amor que tanto me ajudou.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me deu força e coragem para me enfrentar a coisas novas na minha vida e me permitir chegar até aqui, que me amparou as vezes que me senti sozinha e com saudade da minha família.

Ao Prof. Dr. Angelo Berchieri Júnior pela orientação e sugestões para a melhoria do meu trabalho, por ter me aceitado e acreditado que eu poderia dar o meu melhor.

Ao Dr. Rafael Antonio Casarin Penha Filho minha eterna gratidão, você sempre me ajudou e teve paciência de me ensinar, obrigada pela disponibilidade e pela orientação durante todo meu mestrado.

A toda a equipe do laboratório: Adriana, Janine, Andrei, Diego, Rafael que me ensinaram e ajudaram durante meu mestrado.

A todo pessoal do laboratório de Clínica e Cirurgia Veterinária pelo apoio e contribuição na parte experimental do trabalho.

Aos meus amigos Priscila, Neia (ching), Alexandra (tia), Renan, Jhone, Rosa (capeta), Solange e Marcolino (formiga atômica) que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e dando forças para lutar, porque todos vocês foram minha família aqui no Brasil.

A Profa. Dr. Rosemeire de Oliveira Vasconcelos, Dra. Daniela Gomes da Silva e Prof. Dr. Luiz Felipe Caron, pela disponibilidade, apoio e pelas sugestões para a melhoria da dissertação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho,
MUITO OBRIGADA!!

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 <i>Salmonella</i> spp.....	3
2.2 Tifo Aviário	4
2.2.1 Resistência genética.....	5
2.2.2 Enfermidade	6
2.2.3 Alterações hematológicas.....	8
2.3 Resposta imune inata e função dos linfócitos T gama/delta ($\gamma\delta$) contra <i>Salmonella</i> spp.	10
2.3.1 Sistema imune inato: imunidade de mucosa	10
2.3.2 Ativação dos linfócitos T e diferenciação funcional.....	12
2.3.3 Distribuição dos linfócitos T $\gamma\delta$	13
2.3.4 Funções desempenhadas pelos linfócitos T $\gamma\delta$	14
3. OBJETIVOS.....	18
3.1 Objetivo geral	18
3.2 Objetivos específicos	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 Aves	19
4.2 Bactérias e preparação dos inóculos	19
4.3 Desenho experimental	20
4.4 Colheita de material	21
4.5 Avaliação clínica.....	22
4.6 Avaliação de lesões macroscópicas.....	22
4.7 Avaliação da infecção sistêmica	22

4.8	Colheita de sangue e de soro	23
4.8.1	Contagem de hemácias e determinação do volume globular	23
4.8.2	Perfil bioquímico sérico	24
4.9	Imunomarcagem dos linfócitos T $\gamma\delta$	25
4.10	Quantificação de genes envolvidos em resposta à infecção por SG	26
4.10.1	Extração de RNA total e síntese de DNA complementar (cDNA) ..	26
4.10.2	Iniciadores utilizados na PCR em tempo real	27
4.10.3	Reação de PCR em tempo real	28
4.11	Análise estatística	28
5.	RESULTADOS	29
5.1	Avaliação clínica.....	29
5.2	Avaliação de lesões macroscópicas.....	30
5.3	Avaliação da infecção sistêmica	34
5.4	Contagem de hemácias e volume globular	36
5.5	Perfil bioquímico sérico	36
5.6	Mensuração dos linfócitos T $\gamma\delta$: imuno-histoquímica	40
5.7	Quantificação de mRNA dos genes IL-17, Granzima A e CCL-4	43
6.	DISCUSSÃO.....	46
7.	CONCLUSÕES.....	56
8.	REFERÊNCIAS	57
	APÊNDICES.....	73

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 001558/13 do trabalho de pesquisa intitulado "**Avaliação da infecção e imunidade de linhagens de aves (*Gallus gallus*) suscetíveis e resistentes ao desafio por *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar *gallinarum***", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 05 de fevereiro de 2013.

Jaboticabal, 05 de fevereiro de 2013.


Prof. Dr. Andrigo Barboza De Nardi
Coordenador - CEUA

**IMUNIDADE DE AVES (*Gallus gallus*) PARA *Salmonella enterica* SUBESP.
enterica SOROVAR GALLINARUM BIOVAR GALLINARUM**

RESUMO - O tifo aviário é uma doença sistêmica causada por *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar Gallinarum biovar Gallinarum (SG). Esta bactéria é altamente patogênica para aves em qualquer idade, causando mortalidade inclusive em aves adultas. No entanto, a progressão dos sinais clínicos em galinhas pode diferir entre as diferentes variedades de aves. Aves de variedade branca são consideradas mais resistentes e dificilmente se observa mortalidade. Aves de variedade vermelha são suscetíveis e desenvolvem quadros clínicos mais severos com altas taxas de mortalidade. O objetivo do presente estudo foi avaliar o desenvolvimento da doença e infiltrado de linfócitos T $\gamma\delta$ durante a infecção por SG em diferentes variedades de aves. Neste trabalho, utilizaram-se 50 aves comerciais para postura de variedade branca e 60 aves comerciais para postura de variedade vermelha que foram distribuídas em quatro grupos: grupo A (controle de aves brancas), grupo B (aves brancas infectadas), grupo C (controle de aves vermelhas) e grupo D (aves vermelhas infectadas). As aves dos grupos B e D foram desafiadas aos 30 dias de vida com SG. Às 6 horas pós-infecção (6 hpi) e 1, 3 e 5 dias pós-infecção (dpi), três aves/grupo foram eutanasiadas para amostragem. A população de linfócitos T $\gamma\delta$ foi avaliada por imuno-histoquímica em tonsilas cecais e fígado; citocinas foram quantificadas por RT-qPCR em tempo real em tonsilas cecais e baço e amostras de sangue para análises bioquímicas séricas. As lesões macroscópicas foram mais intensas nas aves do grupo D, a partir do 3º dpi, em comparação com as aves do grupo B. As contagens bacterianas no baço e fígado tiveram maiores quantidades nas aves do grupo D no 3º e 5º dpi. Após o 6º dpi, as aves do grupo D começaram a sucumbir ao tifo aviário, diferente das aves do grupo B, que não apresentaram nenhuma mortalidade. Aves do grupo B tiveram maiores quantidades das proteínas ceruloplasmina, albumina e α 1-glicoproteína ácida, em relação às aves do grupo B, porém não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0.05$). Os níveis das proteínas PM=99.000 Da, PM=90.000 Da e transferrina estavam significativamente mais altos em aves do grupo B ($p < 0.05$) no 3º dpi. As aves do grupo D tiveram maiores níveis da haptoglobina ($p < 0.05$) no 3º e 5º dpi, em comparação com as aves do grupo B. O fluxo de linfócitos T $\gamma\delta$ para as tonsilas cecais e o fígado aumentou significativamente ($p < 0.05$) as 6 hpi e 1º dpi, nas aves do grupo B. Na tonsila cecal, IL-17 e granzima A, foram altamente expressas no grupo B. As aves de variedade branca apresentaram uma maior capacidade de conter a infecção e desenvolver poucos sinais clínicos característicos desta doença.

Palavras-chave: resistência ao tifo aviário, resposta imune, *Salmonella* Gallinarum, variedade branca, variedade vermelha

**IMMUNITY OF LAYER-HENS (*Gallus gallus*) FOR *Salmonella enterica* SUBSP.
enterica SEROVAR GALLINARUM BIOVAR GALLINARUM**

ABSTRACT - The fowl typhoid is a systemic disease of chickens caused by *Salmonella enteric* subsp. *enteric* serovar Gallinarum biovar Gallinarum. This bacterium is highly pathogenic for chickens at any age, causing mortality even in adult birds. The progress of clinical signs differs among different lines of chickens. White lines of chickens are considered resistant and hardly mortality is observed. Chickens of brown lines are more susceptible and develop severe clinical signs with high mortality rates. The aim of this study was to evaluate the development of the disease and $\gamma\delta$ T cells influx during the infection with SG in different varieties of layer-hens. In this study, 50 commercial layer-hens of white lines were used and 60 commercial layer-hens of brown lines were divided into 4 groups: group A (control for white layers), group B (infected white layers), group C (control for brown layers) and group D (infected brown layers). Chickens in groups B and D were challenged at 30 days-old with SG. At 6 hours post-infection (6 hpi) and 1, 3 and 5 days post-infection (dpi), three hens per group were sacrificed for sampling. The population of $\gamma\delta$ T cells was evaluated by immunohistochemistry in caecal tonsils and liver; cytokines were quantified by real time RT-qPCR in caecal tonsils and spleen and samples of serum were used for biochemistry analysis. The macroscopic lesions were more intense in the hens of group D, at 3 dpi, in comparison with the group B. The bacterial numbers in spleen and liver from chickens in the group D were higher at 3 and 5 dpi. After 6 dpi, the mortality caused by fowl typhoid, began in group D. Differently, group B had no mortality. The group B had higher amounts of the proteins ceruloplasmin, albumin and α 1- acid glycoprotein, in comparison to group D, but did not show statistical difference ($p>0.05$). The protein levels PM=99.000 Da, PM=90.000 Da and transferrin were significantly higher in group B ($p<0.05$) at 3 dpi. In group D, the levels of haptoglobin were greater ($p<0.05$) at 3 and 5 dpi, in comparison to group B. The population of $\gamma\delta$ T cells increased significantly ($p<0.05$) in caecal tonsils and liver at 6 hpi and 1 dpi in group B. In caecal tonsils, IL-17 and granzyme A, were highly expressed in group B. The white lines of layer-hens showed a higher capacity to contain the infection and develop reduced clinical signs that are characteristic of the fowl typhoid.

Keywords: disease resistance, immune response, *Salmonella* Gallinarum, white layer-hens, brown layer-hens

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Distribuição dos grupos experimentais das aves de variedades branca e vermelha.....	20
Tabela 2. Sequência dos pares de iniciadores utilizados nas reações de PCR em tempo real.	27
Tabela 3. Mortalidade acumulada de aves de postura de variedade branca e vermelha após o desafio experimental com SG NaI ^r 287/91.....	29
Tabela 4. Alterações macroscópicas observadas nas aves desafiadas com SG NaI ^r 287/91 (grupos B e D).	31
Tabela 5. Escores das lesões macroscópicas observadas nas aves desafiadas com SG NaI ^r 287/91 (grupos B e D).	31
Tabela 6. Média (Log ₁₀) do número de células viáveis (UFC/g) em amostras de fígado, baço e tonsila cecal de aves desafiadas aos 30° dias de vida com SG NaI ^r 287/91.	35
Tabela 7. Médias da contagem de hemácias e volume globular de aves de postura das variedades branca e vermelha, desafiadas experimentalmente por SG NaI ^r 287/91.	36
Tabela 8. Médias dos teores séricos de proteína total, albumina, ácido úrico, GGT e AST de aves de postura de variedade branca e vermelha, desafiadas experimentalmente por SG NaI ^r 287/91.....	37
Tabela 9. Média e desvio padrão dos teores séricos de sete frações proteicas (mg/dL) obtidas por fracionamento em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de aves comerciais de variedade branca e vermelha infectadas experimentalmente por SG NaI ^r 287/91.	39
Tabela 10. Média das porcentagens de linfócitos T γδ em amostras de fígado e tonsila cecal de aves de variedade branca (grupo A e B).	41
Tabela 11. Média das porcentagens de linfócitos T γδ em amostras de fígado e tonsila cecal de aves de variedade vermelha (grupo C e D).	41
Tabela 12. Média das porcentagens de linfócitos T γδ em amostras de fígado e tonsila cecal das aves de postura de variedade branca e vermelha (grupo B e D), desafiadas experimentalmente por SG NaI ^r 287/91.	41

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Fluxograma da colheita do material nos quatro grupos experimentais para cada momento após infecção.....21

Figura 2. Avaliação macroscópica de fígado e baço em aves de variedade vermelha desafiadas com SG 287/91 (grupo D) e não desafiadas (Grupo C). Em ave do grupo D, nota-se hepatomegalia com pontos necróticos esbranquiçados no 3° dpi. No grupo C, pode se notar o fígado sem alterações (controle negativo). (1) Baço de ave não desafiada do grupo C. (2) Baço de ave desafiada do grupo D apresentando esplenomegalia.32

Figura 3. Avaliação macroscópica no 5° dpi, em aves de variedade vermelha desafiadas com SG (grupo D), em comparação com aves não desafiadas (Grupo C). Pode se notar hepatomegalia com alteração na coloração do fígado e pontos necróticos esbranquiçados espalhados por todo parênquima (seta) em aves desafiadas. Em aves não desafiadas do grupo C nota-se o fígado normal.32

Figura 4. Lesões macroscópicas no 10° dpi de aves remanescentes desafiadas com SG 287/91, de variedade vermelha (grupo D). Pode se notar opacidade do pericárdio sugestivo de pericardite (A - seta), aumento no tamanho das tonsilas cecais (B - seta) e dos rins (C).....33

Figura 5. Lesões macroscópicas das aves de variedade branca desafiadas com SG 287/91 (grupo B). (A) Fígado congesto e aumentado de tamanho no 3° dpi. (B – seta) Ao 5° dpi observa-se hepatomegalia com necrose multifocal no parênquima. (C) Fígado normal de ave não desafiada (grupo A).33

Figura 6. Lesões macroscópicas de aves desafiadas com SG 287/91. (A) Aumento no tamanho dos rins; (B – seta) aumento das tonsilas cecais ao 10° dpi em aves de variedade branca do grupo B. (C – seta) Aumento das Placas de Peyer no intestino das aves do grupo B ao 5° dpi. Nas aves de variedade vermelha do grupo D, as Placas de Peyer estavam aumentadas no 10° dpi (E – seta) em comparação ao grupo C (D – seta).....34

Figura 7. Contagem bacteriana de SG NaI^r 287/91 expressos em Log₁₀ de UFC/g em amostras de fígado, baço e tonsila cecal após o desafio nos grupos B (aves brancas infectadas) e D (aves vermelhas infectadas). Asterisco (*) indica diferença entre médias da contagem bacteriana dos grupos (p<0,05).35

Figura 8. Quantificação dos linfócitos T $\gamma\delta$ imunomarcados em cortes de fígado e tonsila cecal nos quatro grupos experimentais às 6 hpi e 1,3 e 5 dpi. (*) indica diferença entre médias das porcentagens de linfócitos T $\gamma\delta$ entre os grupos A e B (variedade branca), no mesmo momento; (**) indica diferença entre as médias dos grupos C e D (variedade vermelha), no mesmo momento e (***) indica diferença entre as médias dos grupos infectados B e D, no mesmo momento. As análises foram realizadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).42

Figura 9. Fotomicrografia de fígado de aves desafiadas (B, D) e controle (A, C). Notar imunomarcagem citoplasmática em linfócitos T $\gamma\delta$ presentes nos sinusóides hepáticos nas aves. Imuno-histoquímica. Objetiva 40X.42

Figura 10. Fotomicrografia de tonsila cecal de aves desafiadas (B, D) e controle (A, C). Notar imunomarcagem citoplasmática em linfócitos T $\gamma\delta$ presentes nos sinusóides hepáticos nas aves. Imuno-histoquímica. Objetiva 40X43

Figura 11. Médias da expressão relativa de Granzima-A, IL-17 e CCL4 em tonsila cecal nos diferentes grupos (A, B, C e D) em relação aos momentos pós-infecção (6 horas pós-infecção e 1,3 e 5 dias pós-infecção). (*) indica diferença estatística entre as médias por grupo para cada momento pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).44

Figura 12. Médias da expressão relativa de Granzima-A, IL-17 e CCL4 em baço nos diferentes grupos (A, B, C e D) em relação aos momentos pós-infecção (6 horas pós-infecção e 1,3 e 5 dias pós-infecção). (*) indica diferença estatística entre as médias por grupo para cada momento pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)45

LISTA DE ABREVIATURAS

- APC – Células apresentadoras de antígenos
- APPs – Proteínas de fase aguda
- AST – Asparto aminotransferase
- BALT – Tecido linfoide associado ao brônquio
- CD – Grupamento de Diferenciação
- cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar
- MHC – Complexo principal de histocompatibilidade
- Da - Dáltons
- DM – Divertículo de Meckel
- GALT – Tecido linfoide associado ao intestino
- GGT – Gama glutamiltransferase
- IHQ – Imuno-histoquímica
- LII – Linfócitos Intraepiteliais Intestinais
- Células NK – Células Natural Killer
- Linfócitos T $\gamma\delta$ – Linfócitos T gama delta
- MALT – Tecido linfoide associado à mucosa
- NALT – Tecido linfoide associado à nasofaringe
- NRAMP1 – Proteína de macrófagos associada à resistência natural 1
- PBS – Solução salina tamponada com fosfatos (pH 7,4)
- PP – Placas de Peyer
- PRR – Receptores de reconhecimento de padrões
- RT – Transcrição reversa
- SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
- SE – *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar Enteritidis
- SFM – Sistema fagocítico mononuclear
- SG – *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar Gallinarum biovar Gallinarum
- SLC11A1 – Proteína transportadora 11a membro 1
- SP – *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar Gallinarum biovar Pullorum

SPI – *Salmonella* Patogenicity Islands

STM – *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium

TC – Tonsilas cecais

TCR – Receptores de células T

1. INTRODUÇÃO

A atividade avícola no Brasil tem se desenvolvido constantemente, uma vez que o país se tornou o terceiro maior produtor mundial e líder na exportação de carne de frango. Este crescimento se deve à modernização na indústria, aliado ao manejo adequado das aves, aprimoramento das medidas de biossegurança, adequação nutricional, melhoramento genético das linhagens e sistema de produção em integração.

A produção em galpões fechados com alta densidade favorece a disseminação rápida de agentes infecciosos. Dessa forma, a biossegurança constitui-se em programa indispensável para controle de doenças e para garantir a inocuidade dos alimentos para o consumidor final.

Salmonella é um gênero de enterobactéria que infecta seres humanos e animais. Os sintomas da doença causada por *Salmonella* variam de acordo com os mecanismos de patogenicidade, a idade e a resposta imunológica do hospedeiro durante a infecção.

Salmonella enterica subesp. *enterica* sorovar Gallinarum biovar Gallinarum (SG) e *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar Gallinarum biovar Pullorum (SP), são imóveis (não possuem flagelo) e hospedeiro-específico, capazes de infectar aves. A pulorose, cujo agente etiológico é SP, provoca uma enfermidade sistêmica aguda que pode acometer as aves em qualquer idade, sendo mais comum em aves jovens. O tifo aviário, causado por SG, uma doença altamente patogênica para aves em qualquer idade, tem sua ocorrência mais frequente em aves adultas.

O tifo aviário se caracteriza por um quadro de sepse, com resposta inflamatória sistêmica à infecção e mortalidade elevada. As aves comerciais para postura de ovos de mesa de variedade branca apresentam sintomatologia e mortalidade diminuída e são mais resistentes ao desenvolvimento da doença por SG, ao contrário das aves comerciais para postura de ovos de mesa de variedade vermelha que são altamente suscetíveis, manifestando quadros clínicos graves com alta taxa de mortalidade.

No intestino das aves se encontram tecidos linfoides associados à mucosa, como as placas de Peyer e as tonsilas cecais, nos quais ocorre grande concentração de células linfoides, onde acredita-se que ocorra a invasão bacteriana, tanto pelos biovares hospedeiro-específico (SG e SP) quanto pelos sorovares paratíficos (ex: *Salmonella Enteritidis*).

A resposta imune no intestino é bastante complexa e vários tipos de linfócitos intraepiteliais podem estar envolvidos, dentre eles, os linfócitos T gama delta ($\gamma\delta$), que se destacam por serem importantes células imunes efectoras, exercendo funções citotóxicas e auxiliando, assim, na prevenção da invasão e disseminação bacteriana no hospedeiro.

Diversos estudos têm demonstrado que os linfócitos T $\gamma\delta$ atuam na imunidade inata em resposta a agentes infecciosos, que iniciam o processo de infecção através das mucosas. Considerando-se o papel dos linfócitos $\gamma\delta$ na indução de uma resposta imune inata, é importante estudar a participação destas células durante a infecção por SG em aves de postura de variedades mais resistentes (aves leves) e susceptíveis (aves semi-pesadas e pesadas).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella*, compõe a família *Enterobacteriaceae*. Estas bactérias são bacilos Gram-negativos, aeróbicos ou anaeróbicos facultativos. São patógenos intracelulares facultativos e a classificação dos sorovares é baseada na composição de seus antígenos: somático (O), flagelar (H) e capsular (Vi), por meio das propriedades de aglutinação (POPOFF et al., 2001).

O gênero *Salmonella* é composto por duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. *Salmonella enterica* é dividida em seis subespécies: *S. enterica* subesp. *enterica*, *S. enterica* subesp. *salamae*, *S. enterica* subesp. *arizonae*, *S. enterica* subesp. *diarizonae*, *S. enterica* subesp. *houtenae* e *S. enterica* subesp. *indica* (GRIMONT; WEILL, 2007). Atualmente estão descritos mais de 2.610 sorovares, dos quais, 1547 pertencem a subesp. *enterica* (GUIBOURDENCHE et al., 2010). A maioria destes sorovares são móveis devido à presença de flagelos. Porém, os biovares hospedeiro-específicos de galinha, como *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar Gallinarum biovar Gallinarum (SG) e *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar Gallinarum biovar Pullorum (SP) são imóveis (UZZAU et al., 2000).

As salmoneloses aviárias causam três doenças diferentes: o tifo aviário causado por SG; a pulorose, causada por SP (SHIVAPRASAD, 2000) e o paratifo aviário, causado pelos sorovares flagelados como *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar Enteritidis (SE) e *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar Typhimurium (STM) (SHIVAPRASAD; BARROW, 2008).

2.2 Tifo Aviário

O tifo aviário é uma enfermidade de distribuição mundial. Nos países desenvolvidos como EUA, Canadá, Japão, Austrália e grande parte da Europa Ocidental, a doença encontra-se sob controle (KAHN; LINE, 2010). Por outro lado, continua sendo um grande problema na América Central e América do Sul, Europa oriental, África e Índia, locais onde a indústria avícola vem se desenvolvendo continuamente (UZZAU et al., 2000). No Brasil, o tifo aviário continua sendo diagnosticado em aves comerciais de postura, corte e reprodutoras (BERCHIERI JÚNIOR, 2000). Em 2012, foram relatados 14 casos de tifo aviário entre os Estados de Minas Gerais, Paraná e Santa Catarina (OIE, 2012).

SG acomete principalmente a classe Aves, sendo considerado um dos principais patógenos dentro da avicultura comercial por infectar galinhas (*Gallus gallus*) e perus (*Melleagris gallopavo*) (JEONG et al., 2008). Outras aves, como faisões, codornas, patos e pavão também são suscetíveis a esta doença (SHIVAPRASAD, 2000).

SG é altamente patogênica para aves em qualquer idade, sendo mais comum em aves adultas (UZZAU et al., 2000), manifestando uma mortalidade aguda, geralmente entre 60 – 70% (CHAUDHARI et al., 2012). Tanto a morbidade quanto a mortalidade podem ser variáveis, devido a fatores como a idade, a raça e o estado nutricional e imunológico (SHIVAPRASAD, 2000; UZZAU et al., 2000).

O meio mais importante de transmissão do micro-organismo ocorre pela via horizontal, visto que a bactéria é disseminada por vetores mecânicos como moscas, fômites, trânsito de veículos e pessoas, além do canibalismo da carcaça de aves mortas pelo tifo aviário por outras aves dentro dos lotes (SHIVAPRASAD, 2000; SHIVAPRASAD; BARROW, 2008).

2.2.1 Resistência genética

Aves de variedade branca são consideradas mais resistentes à infecção por SG, apresentando uma sintomatologia branda e mortalidade diminuída. Aves de variedade vermelha são altamente suscetíveis a esta enfermidade, desenvolvendo quadros clínicos graves com alta taxa de mortalidade (FREITAS NETO et al., 2007). A diferença na resistência ao tifo aviário e no quadro clínico observado entre as variedades de aves comerciais pode estar relacionada com a capacidade de adaptação da bactéria ao organismo do hospedeiro e ao controle do crescimento bacteriano no interior das células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), principalmente os macrófagos (FREITAS NETO et al., 2007).

Diferentes estudos têm sido realizados para avaliar a resistência à infecção por SG. Bumstead e Barrow (1993) relataram uma infecção experimental por SG, SP e STM, e observaram que em aves de variedade branca infectadas com STM, tem a capacidade de conter a infecção durante a fase inicial do tifo aviário por estes sorovares. Porém, não ficou esclarecido se esta diferença se deve à presença de um maior número de células fagocíticas nesta variedade de aves ou à maior atividade microbicida destas células.

Wigley et al. (2002), em um estudo *in vitro*, avaliaram a resposta dos macrófagos em aves de variedade branca e vermelha em uma infecção por SG e STM e mostraram que o estresse oxidativo (produção de óxido nítrico) dos macrófagos de aves resistentes foi mais eficaz do que nas das aves suscetíveis. Recentemente, foi demonstrado que os macrófagos das aves de variedade branca expressam citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas mais rapidamente e com uma maior magnitude que as células derivadas de aves suscetíveis, sugerindo que as aves de variedade branca possuem uma maior capacidade em ativar o sistema imunológico (WIGLEY et al., 2006).

Grande parte dos estudos sugerem que o principal fator genético envolvido na resistência à infecção por *Salmonella* spp., nas diferentes variedades de aves, esta relacionado à produção de uma proteína conhecida como proteína de macrófago associada à resistência natural 1 (Nramp1), atualmente conhecida como soluto

transportadora 11a membro 1 (Slc11a1), responsável pela resistência aos patógenos intracelulares (BUMSTEAD; BARROW, 1988; LAMONT et al., 2002; BEAUMONT et al., 2003; LIU; KAISER; LAMONT, 2003; CALENGE et al., 2010).

O Slc11a1 é uma proteína integral de membrana presente no compartimento lisossomal de células do SFM (macrófagos, neutrófilos e células dendríticas) (STOBER et al., 2007). A função desta proteína é formar um canal para remover íons Fe^{2+} e Mn^{2+} do ambiente intrafagolisossomal. Este mecanismo é importante para a defesa dessas células contra parasitos invasores, pois sequestra estes íons impedindo que sejam utilizados para o crescimento bacteriano dentro de fagócitos (BLACKWELL et al., 2001; FORBES; GROS, 2001).

Estudos em camundongos mostraram que o gene *Slc11a1* interfere na resistência e susceptibilidade em infecções por *Mycobacterium*, *Leishmania donovani* e STM (VIDAL et al., 1993; VIDAL et al., 1995), modulando o crescimento dos patógenos nas células do SFM durante as primeiras etapas da infecção (HU et al., 1997).

2.2.2 Enfermidade

A manifestação clínica nas aves infectadas por SG caracteriza-se por uma queda súbita no consumo de ração, diminuição na produção de ovos, redução da fertilidade e da taxa de eclosão, anorexia, diarreia amarelo-esverdeada ou esverdeada, depressão, desidratação e perda de peso (SHIVAPRASAD, 2000). A mortalidade inicia-se a partir do quarto dia pós-infecção (dpi) e pode se prolongar até o décimo dpi. Além disso, as aves podem apresentar um aumento na temperatura de um a três graus, no segundo e terceiro dpi (SHIVAPRASAD; BARROW, 2008).

Nos casos crônicos, os achados mais comuns são: interferência na absorção do saco vitelino (aves jovens), hidropericárdio com exsudato seroso ou fibrinoso e, ocasionalmente, podem ser encontrados nódulos brancos no pulmão, coração, pâncreas, moela e na parede do ceco e reto (BERCHIERI JÚNIOR, 2000;

SHIVAPRASAD, 2000; FREITAS NETO et al., 2007; SHIVAPRASAD; BARROW, 2008; BERCHIERI JÚNIOR; FREITAS NETO, 2009).

O curso da infecção e a resposta imune contra *Salmonella enterica* dependem do sorovar infectante e da genética do hospedeiro (CHAPPELL et al., 2009). Sorovares como SE e STM podem causar em aves uma infecção no trato gastrointestinal ou também uma infecção sistêmica. A capacidade de *Salmonella* spp. invadir células do intestino e sobreviver no interior de macrófagos deve-se a regiões do genoma bacteriano que codificam vários fatores de virulência denominadas ilhas de patogenicidade (SPI – “*Salmonella* Pathogenicity Islands”) (CHAPPELL et al., 2009). O desenvolvimento de cada quadro depende da expressão das SPI e da idade da ave acometida, ao contrário da SG que induz uma doença sistêmica grave nas aves, sem relação com a idade (BARROW, 2007; CHAPPELL et al., 2009).

O mecanismo de interação do micro-organismo com o sistema imune, no processo de infecção por *Salmonella* spp., pode ser dividido em três fases. A primeira consiste na sobrevivência e invasão pelo trato gastrointestinal, controlada pela expressão de genes da SPI-1. A segunda fase é o estabelecimento da infecção sistêmica, principalmente pela infecção e sobrevivência dentro de macrófagos, controlados por genes da SPI-2, disseminando a infecção para órgãos como coração, fígado, baço e trato reprodutivo. Em casos em que o sistema imune é incapaz de controlar a infecção pode ocorrer a morte do animal após a infecção sistêmica ou o hospedeiro pode se tornar portador assintomático (CHAPPELL et al., 2009).

Salmonella spp. ao atravessar o trato gastrointestinal precisa sobreviver a pH baixo, como do estômago ou do interior dos fagossomos dos macrófagos. Porém, a indução da tolerância à acidez é uma característica importante desta bactéria para responder às alterações no pH do ambiente e se adaptar para sobreviver e se multiplicar no hospedeiro infectado (BEARSON; BEARSON; FOSTER, 1997). Após a infecção por via oral, as bactérias que sobrevivem às condições de pH gástrico atingem o trato intestinal, e colonizam principalmente o ceco, onde a infecção pelos sorovares flagelados, como SE, STM e *S. Infantis* se estabelece. Diferentemente, SG e SP não colonizam o ceco de forma permanente, devido à ausência de flagelo,

não causam inflamação significativa e não comprometem gravemente a mucosa intestinal, devido à sua alta invasividade e capacidade de transpor as barreiras intestinais, infectando assim as células fagocíticas (SETTA et al., 2012).

O processo de infecção e invasão do organismo hospedeiro por *Salmonella* spp., se inicia após a captura das bactérias pelas células M e macrófagos (CHAPPELL et al., 2009; SETTA et al., 2012). Dentro dos fagócitos, a bactéria circula e chega aos órgãos internos como baço e fígado, levando à infecção sistêmica (RESCIGNO et al., 2001).

2.2.3 Alterações hematológicas

Uma das características patológicas mais visíveis na fase aguda da infecção pelo tifo aviário é a anemia marcante que pode levar a uma perda de mais de 70% dos eritrócitos circulantes nas aves (ASSOKU; PENHALE, 1970; ASSOKU; PENHALE; BUXTON, 1970a; ASSOKU; PENHALE; BUXTON, 1970b; ASSOKU; PENHALE, 1974).

Assoku, Penhale e Buxton (1970a) e Assoku e Penhale (1974) caracterizaram a anemia como hemolítica e sugerem que esta alteração é induzida pela presença de um componente bacteriano, o lipopolissacarídeo (LPS) na circulação sanguínea, o qual promove a formação de complexos LPS-anticorpo que seriam fagocitados pelo SFM. Buxton (1960) notou que nas infecções naturais por SG, as aves apresentam menor concentração de hemoglobina. No entanto, em condições experimentais o autor não verificou tal alteração.

As provas da função hepática nas aves estão divididas em testes de enzimas hepáticas que refletem lesão hepatocelular: asparto aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), lactato desidrogenase (LD), dentre outras; e aumento na produção enzimática consequente a colestase: gama glutamiltransferase (GGT), fosfatase alcalina (AP), e metabolitos do fígado (colesterol e ácidos biliares), glicose e as proteínas (SCHMIDT et al., 2007). A GGT é uma enzima de membrana associada a vários tecidos. Sua atividade sérica elevada ocorre pelo aumento de

produção e liberação pelo tecido hepatobiliar (MEYER; COLES; RICH, 1995). Contudo, a atividade plasmática da GGT não aumenta necessariamente em aves com distúrbio hepatobiliar. As aves apresentam atividade da GGT nos rins, cérebro e intestino, entretanto, distúrbios nesses órgãos não alteram os teores plasmáticos desta enzima (SCHMIDT et al., 2007).

Os valores de GGT entre 0–10 U/L são considerados “normais em aves”. Em níveis aumentados, a GGT sanguínea indica uma lesão hepática ativa, porém, níveis normais não indicam um funcionamento normal do fígado (LUMEIJ, 1997).

As aves apresentam alta atividade da AST no fígado, músculo esquelético e cardíaco, cérebro e rins (LUMEIJ, 1997). Os valores de AST acima de 275 UI/L podem estar relacionados a distúrbios hepáticos ou musculares (SCHMIDT et al., 2007), pois a AST não é hepato-específica (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008). Shah et al. (2013) avaliaram as alterações bioquímicas e hematológicas em infecção experimental com SG em frangos de corte e determinaram que a elevação nos níveis da AST estava relacionada com dano hepatocelular e, conseqüentemente, com alterações na permeabilidade da membrana celular.

A avaliação da concentração das proteínas plasmáticas totais e suas frações ajuda na interpretação do estado de hidratação, bem como no diagnóstico de doenças inflamatórias e imunomediadas, além de alteração na síntese proteica (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008). O teor plasmático das proteínas totais nas aves é menor do que nos mamíferos variando de 2,5 a 4,5 g/dL. A albumina representa 40 a 50% das proteínas plasmáticas totais nas aves, onde os teores normais variam de 0,8 a 2,0 g/dL. Esta proteína é sintetizada no fígado (SCHMIDT et al., 2007). Em aves infectadas com SG, Cardoso, Tessari e Castro (2003), constatarem elevação plasmática das proteínas totais.

As proteínas de fase aguda (APPs) são proteínas do sangue sintetizadas principalmente pelos hepatócitos (KOKOSHAROV, 2006), em resposta às etapas iniciais das infecções e processos de sepse (MOSLEH; NAZIFI; ALAEDDINI, 2011). Garcia et al. (2009), em um estudo com infecção experimental de aves poedeiras por SG, verificaram alterações nos teores plasmáticos de proteínas de fase aguda dessas aves em comparação com as aves sadias.

2.3 Resposta imune inata e função dos linfócitos T gama/delta ($\gamma\delta$) contra *Salmonella* spp.

2.3.1 Sistema imune inato: imunidade de mucosa

O sistema imune de todos os vertebrados incluindo das aves é dividido em dois tipos, a imunidade inata e a adaptativa. A imunidade inata constitui a primeira linha de defesa do hospedeiro durante a infecção e tem como função principal a indução inicial de uma resposta inflamatória inespecífica contra patógenos (MOGENSEN, 2009). A imunidade adaptativa começa após a imunidade inata agir, resultando em uma série de eventos que se destinam a eliminar o agente patogênico na fase tardia da infecção e levam a uma memória imunológica (ERF, 2004).

A imunidade inata é composta principalmente pelas barreiras físicas, químicas e celulares (MOGENSEN, 2009) capazes de reconhecer patógenos e ativar uma resposta imune antimicrobiana (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000).

As barreiras físicas e químicas estão representadas pela epiderme, o epitélio respiratório ciliado, o endotélio vascular e todas as mucosas com secreções antimicrobianas (BASSET et al., 2003; KINDT; GOLDSBY; OSBORNE, 2007; MOGENSEN, 2009). A barreira celular inclui células especializadas na defesa do organismo, que possuem receptores sensíveis capazes de detectar produtos microbianos e dessa forma, atacar o patógeno (KINDT; GOLDSBY; OSBORNE, 2007). Entre essas células estão os mastócitos, células dendríticas, células fagocíticas, como os macrófagos e granulócitos, células NK e linfócitos T $\gamma\delta$ (BASSET et al., 2003).

Estas barreiras físicas e químicas que o organismo da ave possui, ajudam a detectar e combater as infecções por *Salmonella* spp., sendo de grande importância esta interação para evitar o estabelecimento da infecção (PENHA FILHO et al., 2013).

Diferente dos mamíferos, as galinhas não possuem linfonodos organizados, mas, apresentam agregados linfoides associados à mucosa (MALT) como mecanismo de defesa (CASTELEYN et al., 2010). Os principais agregados linfoides

que compõem o MALT são: tecido linfoide associado ao intestino (GALT), tecido linfoide associado ao brônquio (BALT), tecido linfoide associado à nasofaringe (NALT), tecido linfoide associado à pele (SALT), tecido linfoide associado aos vasos sanguíneos (VALT), tecido linfoide associado ao olho (à conjuntiva) (CALT) e os órgãos geniturinários (LILLEHOJ; TROUT, 1996).

O GALT é o responsável pela indução de resposta imune contra antígenos bacterianos, virais e parasitas entéricos (LILLEHOJ; TROUT, 1996; BAR-SHIRA; SKLAN; FRIEDMAN, 2003). A bolsa cloacal, as tonsilas cecais (TC), as placas de Peyer (PP), o divertículo de Meckel (DM), os linfócitos intraepiteliais intestinais (LII) (linfócitos T) e as células do sistema imunológico residentes no intestino, são alguns dos agregados linfoides que compõem o GALT (BAR-SHIRA; SKLAN; FRIEDMAN, 2003).

A manutenção da homeostase do intestino e a integridade do epitélio ajudam de forma significativa a capacidade de resistência às infecções intestinais por *Salmonella* spp. No entanto, esta bactéria possui mecanismos para evadir a resposta imune inata e assim, invadir o epitélio intestinal por meio da síntese de enzimas que ajudam a romper as barreiras físicas composta pelo epitélio intestinal, alterando as membranas celulares (VAN ASTEN; KONINKX; VAN DIJK, 2005).

Quando *Salmonella* spp. consegue colonizar o trato intestinal das aves e se multiplicar neste ambiente, outros elementos da resposta imune inata se desenvolvem, como a inflamação, aumento de temperatura, diarreia e atração de linfócitos T $\gamma\delta$ e células NK. Estas duas populações distintas de linfócitos T, são importantes para combater infecções na mucosa intestinal das aves nos primeiros momentos da infecção (PENHA FILHO et al., 2013).

Os linfócitos T $\gamma\delta$ são encontrados principalmente nas mucosas, junto aos tecidos linfoides associados com células epiteliais. Estas células proliferam durante a inflamação e estão envolvidas na resposta imune contra uma grande variedade de patógenos (GARFAS; RAMÓN, 2011).

2.3.2 Ativação dos linfócitos T e diferenciação funcional

Os linfócitos T respondem aos antígenos peptídicos, que são apresentados pelas células apresentadoras de antígenos (APC). O início desta resposta requer o reconhecimento específico do antígeno pelos linfócitos T, a adesão estável das células T às APC e a transdução dos sinais ativadores, como as citocinas e quimiocinas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

As moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e os peptídeos formam um complexo na membrana plasmática das APC, o qual é reconhecido pelo receptor das células T (TCR) (CHEN et al., 1991; SMITH; GOBEL, 2012). Os sinais bioquímicos que ocorrem após o reconhecimento do antígeno pela proteína CD3, presente somente nos linfócitos e pelo receptor TCR formam um complexo. Assim, o reconhecimento do antígeno pelos linfócitos T, é realizado conjuntamente por duas moléculas: o receptor para o antígeno, TCR, e a proteína CD3 (LILLEHOJ; TROUT, 1996).

Existem duas linhagens dos linfócitos T que são geradas no timo e a classificação destas é realizada de acordo com o TCR. Estas linhagens expressam receptores denominados alfa(α)/beta(β) ou gama(γ)/delta(δ). Inicialmente, as células $\gamma\delta$, como as $\alpha\beta$, não expressam os correceptores CD4 ou CD8 e, portanto são denominadas timócitos duplo-negativos ($CD3^+CD4^-CD8^-$) (GIRARDI; HAYDAY, 2005).

Estas linhagens, mais adiante no processo de desenvolvimento, passam pela seleção negativa que determinará a maturação dos linfócitos T $CD4^+$ ou linfócitos T $CD8^+$. Durante este processo mediado pela interação de TCR com as APC, os linfócitos duplo-positivos ($CD4^+CD8^+$) são eliminados por apoptose, e somente os linfócitos T $\alpha\beta$ $CD4^+$ ou $CD8^+$ sobrevivem (CIOFANI; ZUNIGA-PFLUCKER, 2010). No entanto, no que diz respeito aos linfócitos T $\gamma\delta$, a maioria permanece duplo-negativa ($CD4^-CD8^-$) ou expressa apenas $CD8^+$, correspondendo às células predominantemente encontradas no epitélio intestinal (GALT) e de mucosas (MALT) (CIOFANI; ZUNIGA-PFLUCKER, 2010).

Assim, estas linhagens de linfócitos se diferenciam de acordo com a expressão do receptor TCR, também nomeados de TCR-1 ($\gamma\delta$), expresso por linfócitos T $\gamma\delta$ e TCR-2 ($\alpha\beta$), expresso por linfócitos T CD4⁺ ou T CD8⁺ (GERTNER et al., 2007; ZHAO; NGUYEN; KANG, 2005; CIOFANI; ZUNIGA-PFLUCKER, 2010).

2.3.3 Distribuição dos linfócitos T $\gamma\delta$

Os linfócitos T $\gamma\delta$ são encontrados no sangue periférico, intestino, baço, timo e bolsa cloacal, apresentando função imunomoduladora nestes locais (ADACHI et al., 1995; BERNDT; METHNER, 2001).

Em aves, os linfócitos T $\gamma\delta$ correspondem até 50% das células T (SOWDER et al., 1988; COOPER et al., 1991; CHEN et al., 1996). Uma proporção bastante elevada em relação a que se observa em seres humanos e camundongos (HAAS; PEREIRA; TONEGAWA, 1993). Além disso, estas células constituem a maior parte dos LII em aves e seres humanos (VINEY; MACDONALD; SPENCER, 1990).

Devido às variações nas porcentagens de linfócitos T $\gamma\delta$ no sangue periférico entre as diferentes espécies de vertebrados, estas células podem ser classificadas segundo a sua concentração como alta ou baixa (GARFAS; RAMÓN, 2011). Entre as espécies que apresentam níveis baixos estão os seres humanos e os camundongos (2 – 5%) (GOODMAN; LEFRANCOIS, 1988; GROH et al., 1989), ao contrário das aves (15%) (LAHTI et al., 1988), suínos (24%) (TANG et al., 2005) e bovinos (20 até 70% em bezerros), que apresentam grandes populações destas células (MACKAY; HEIN, 1990; HEIN; DUDLER, 1997).

Li et al. (2012), em uma análise das alterações dos LII induzida por um modelo de infecção oral com STM em camundongos, observaram que o número de LII e linfócitos T $\gamma\delta$ aumentaram após a infecção oral. Além disso, estas células mostraram acelerar a depleção bacteriana no intestino, fígado e baço. Por intermédio destas observações, os autores sugerem que os linfócitos T $\gamma\delta$ são importantes para a detecção de micro-organismos e indicam uma função importante

na proteção contra a infecção por *Salmonella* spp., evitando a propagação deste patógeno.

2.3.4 Funções desempenhadas pelos linfócitos T $\gamma\delta$

A maioria dos estudos sobre a função biológica dos linfócitos T $\gamma\delta$ em aves foi baseada em modelos de infecção com vírus e parasitas (BANBURA et al., 1991; MERKLE; CIHAK; LOSCH, 1992; EICHELBERGER; DOHERTY, 1994). O papel dessas células em infecções bacterianas em aves foi pouco estudado. Em modelos de infecção com STM e SE em aves, foram avaliadas diversas subpopulações de linfócitos, incluindo os linfócitos T $\gamma\delta$ na proteção contra as infecções (BERNDT; METHNER, 2001; BERNDT; PIEPER; METHNER, 2006; PIEPER; METHNER; BERNDT, 2008; 2011). Neste contexto, salienta-se a importância de novas pesquisas para conhecer a participação destas células na resposta imune inata frente ao desafio com SG.

Brandes, Willimann e Moser (2005), em um estudo *in vitro* dos linfócitos T $\gamma\delta$, demonstrou a capacidade destas células em atuar tanto na imunidade inata quanto na adquirida. Entre as características que classificam essa célula dentro do sistema imune inato, se destacam: a capacidade de responder rapidamente à infecções primárias, expressão limitada dos genes do TCR, expressão de receptores de reconhecimento de padrão (PRR), além de serem capazes de apresentar antígenos aos linfócitos T $\alpha\beta$ *in vitro* (MODLIN; SIELING, 2005). As funções destas células dentro do sistema imune adaptativo compreendem o rearranjo de receptores de superfície e o desenvolvimento de memória imunológica (SHEN et al., 2002), a indução da maturação dos linfócitos T $\alpha\beta$ e funções efetoras semelhantes às exercidas pelos linfócitos T citotóxicos ($\alpha\beta$ CD8⁺) (MODLIN; SIELING, 2005).

Existem estudos que demonstram o desempenho de uma função homeostática do intestino por linfócitos T $\gamma\delta$, que fica evidenciado pela ativação destas células por enterócitos em estresse, durante uma infecção (HAYDAY, 2000; JAMESON; HAVRAN, 2007).

Os linfócitos T $\gamma\delta$ apresentam o mecanismo de reconhecimento de antígenos semelhantes ao de imunoglobulinas (HAYDAY, 2000). Enquanto os linfócitos T $\alpha\beta$ reconhecem somente antígenos processados e associados às moléculas do MHC para serem reconhecidos, os linfócitos T $\gamma\delta$ podem reconhecer antígenos sem a necessidade de processamento e apresentação (HAYDAY, 2000; KONIGSHOFER; CHIEN, 2006).

Outra característica da plasticidade dos linfócitos T $\gamma\delta$ foi evidenciada em um estudo que relatou estas células com características de células apresentadoras de antígenos (BRANDES; WILLIMANN; MOSER, 2005). Assim, quando estas são ativadas, são capazes de processar antígenos eficientemente e fornecem sinais coestimulatórios suficientes para induzir a proliferação e diferenciação de linfócitos T $\alpha\beta$ virgens.

Após a infecção por *Salmonella* spp., os linfócitos T $\gamma\delta$ estimulam a produção de citocinas e quimiocinas pró e anti-inflamatórias, além da função citotóxica (HOLDERNESS et al., 2013). A função citotóxica se deve à presença de grânulos citoplasmáticos que contém mediadores, como as perforinas (NAKATA et al., 1990; KOIZUMI et al., 1991), assim como a expressão de CD95 (também conhecido como FAS) (NAGATA; GOLSTEIN, 1995), granzimas A e B e linfoxinas (DIELI et al., 2001; FAHRER et al., 2001; SHIRES; THEODORIDIS; HAYDAY, 2001; QIN et al., 2009), demonstrando a sua capacidade para utilizar qualquer destes mecanismos de citotoxicidade para lisar às células alvo (PASSMORE et al., 2001).

Dentre os mediadores citotóxicos descritos, as granzimas A e B têm recebido grande destaque (METKAR et al., 2008). A granzima A é expressa pelos linfócitos T $\alpha\beta$ ($CD4^+$ e $CD8^+$) ativados, linfócitos T $\gamma\delta$ e células NK, e a liberação dos grânulos citotóxicos (perforinas e granzimas) por estas células, é a principal via para eliminar células infectadas por vírus, bactérias intracelulares e células tumorais (STINCHCOMBE et al., 2001; TRAPANI, 2001). Assim, quando os linfócitos T $\gamma\delta$ reconhecem a célula alvo ocorre a apoptose devido à condensação da cromatina, fragmentação nuclear e a perda do potencial da membrana mitocondrial gerada pela ação da granzima A (LIEBERMAN, 2003).

A produção da IL-17 tem um papel importante na regulação da resposta imune inata promovendo o recrutamento e o acúmulo de heterófilos nos tecidos para

a eliminação do patógeno no início da infecção (FORLOW et al., 2001). Dentre as células produtoras de IL-17 estão as células NK (MICHEL et al., 2007) e os linfócitos T $\gamma\delta$ (ROARK et al., 2008).

Nos camundongos, a produção da IL-17 pelos linfócitos T $\gamma\delta$ tem sido abundante nos órgãos linfoides secundários, assim como no pulmão, fígado, retina e pele, em resposta a diferentes infecções (LOCKHART; GREEN; FLYNN, 2006; KISIELOW et al., 2008; CUI et al., 2009; MURDOCH; LLOYD, 2010).

A IL-17 estimula a secreção de quimiocinas como a proteína inflamatória de macrófagos 1 (MIP-1) e MIP-2 e a proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1/CCL-2) (KIMIZUKA et al., 2012), causando o recrutamento de células inflamatórias para o foco da lesão (CUA; TATO, 2010).

Estudos descrevem que a IL-17 ajuda no controle de infecções contra *Salmonella* spp. no trato gastrointestinal (HAPPEL et al., 2003; SCHULZ et al., 2008; SIEGEMUND et al., 2009). Em infecções por *Listeria monocytogenes* no fígado, constatou-se a presença desta citocina durante os três primeiros dias da infecção por este patógeno intracelular. *Toxoplasma gondii* (KELLY et al., 2005; HAMADA et al., 2008; MEEKS et al., 2009) e *Escherichia coli*, também estimulam a produção desta citocina horas após a infecção, que pode persistir por dias (SHIBATA et al., 2007), demonstrando a importância desta citocina na defesa do hospedeiro contra diversas infecções (HAAS et al., 2012).

Outra função efetora destes linfócitos é a produção de quimiocinas nos locais de lesão. Dentre estes, a quimiocina CCL-4 (Quimiocina C-C Ligante 4) exerce uma função que baseia-se principalmente na atração de células NK (TAUB et al., 1995), macrófagos e células dendríticas nos tecidos infectados (MATRAPALLIL et al., 1998). CCL-4 também tem mostrado ser um eficaz modulador da imunidade de mucosa (LILLARD et al., 2003). A expressão desta quimiocina é aumentada em infecções por diferentes sorovares de *Salmonella* spp. em aves, sendo relatado um aumento da CCL-4, 12 horas pós-infecção (hpi) por STM, no intestino de pintinhos (WITHANAGE et al., 2004). Outro estudo comprova que o aumento da expressão desta quimiocina ocorre entre 12 e 48 hpi nas tonsilas cecais e entre 12 e 24 hpi no fígado (CHEESEMAN, 2007).

Em vista do exposto anteriormente, este estudo foi elaborado para estudar a infecção por SG em duas variedades de aves comerciais para postura de ovos e avaliar os processos clínicos e imunológicos que possam estar envolvidos na resistência ou suscetibilidade à infecção, em aves de variedade branca e vermelha.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudo comparativo do tifo aviário, avaliando o desenvolvimento clínico da doença, a invasão do epitélio intestinal e o infiltrado linfocitário (linfócitos T $\gamma\delta$) em aves comerciais (*Gallus gallus domesticus*) para postura de ovos de mesa para consumo de variedade branca (resistentes) e vermelha (sensíveis à infecção).

3.2 Objetivos específicos

- Desafiar aves de postura comerciais das variedades branca e vermelha com SG Nal^r 287/91 e avaliar o desenvolvimento da infecção sistêmica por meio da contagem bacteriana em fígado, baço e tonsila cecal.
- Avaliar o desenvolvimento de lesões macroscópicas nos órgãos internos das aves desafiadas
- Avaliar as alterações hematológicas em resposta à infecção por SG em comparação com aves não desafiadas.
- Realizar a imunomarcagem dos linfócitos T $\gamma\delta$ em amostras de tonsila cecal e fígado.
- Quantificar a expressão de genes responsáveis pela produção de IL-17, CCL-4 e granzima A, em resposta à infecção por SG.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aves

Foram utilizadas 60 aves comerciais para postura de ovos de mesa para consumo da variedade vermelha e 50 aves comerciais para postura de ovos de mesa para consumo da variedade branca. O experimento foi realizado no Setor de Ornitopatologia¹. Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – Protocolo No. 001558/13).

As aves de postura foram alojadas em baterias de cria e recria, onde receberam aquecimento durante o período inicial, água e ração *ad libitum*. As aves foram criadas desde o primeiro dia de vida. No momento da chegada ao laboratório, foram realizados suabes de fundo de caixa para pesquisa de *Salmonella* spp., conforme a metodologia descrita por Zancan et al. (2000). As aves utilizadas no experimento apresentaram resultados negativos no isolamento de *Salmonella* spp.

4.2 Bactérias e preparação dos inóculos

Foi utilizada a cepa selvagem *Salmonella* Gallinarum 287/91 (GeneBank ID: AM933173.1) resistente ao ácido nalidíxico (SGNaI^l) da bacterioteca do Laboratório de Ornitopatologia¹.

A cepa bacteriana foi cultivada em Caldo Luria-Bertani (LB) (DIFCO:240110) e incubada por 24 horas a 37°C, em agitação (100 rpm). Uma amostra de 0,1 mL da cultura foi diluída decimalmente em 0,9 mL de solução de fosfato tamponada (PBS, pH 7,4) na proporção de 1:10. De cada diluição foi retirado 0,1 mL que foi semeado em placas de ágar verde-brilhante contendo ácido nalidíxico (20 µg/mL) (VB NaI)

¹ Laboratório de Ornitopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Júlio de Mesquita Filho – Câmpus de Jaboticabal.

(OXOID: CM0263), as quais foram incubadas a 37°C/24 horas. Após esse período, foi realizada a contagem do número de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL) do inóculo, contendo aproximadamente concentrações de 10^8 UFC/mL. O número de colônias por mililitro de caldo LB foi transformado em $\log_{10}$ para apresentação dos resultados.

4.3 Desenho experimental

As aves foram distribuídas aleatoriamente em quatro grupos experimentais (A, B, C e D). Os grupos A e B eram conformados pelas aves de postura de variedade branca, enquanto, os grupos C e D correspondiam às aves de postura de variedade vermelha. Os grupos A e C conformavam os grupos controle negativos (sem desafio) para cada variedade de aves (Tabela 1).

As aves do grupo B e D foram desafiadas aos 30 dias de vida por via oral, recebendo diretamente no papo por meio de cânula, um volume de 1 mL do inóculo bacteriano SG NaI^r 287/91, contendo aproximadamente 6×10^8 UFC/mL.

Tabela 1. Distribuição dos grupos experimentais das aves de variedades branca e vermelha.

Variedade de ave	Grupos	Desafio	Dose do inóculo	Quantidade de animais
Branca	A	Não	Controle negativo	12
	B	Sim	1 mL de 6×10^8 UFC/mL	38
Vermelha	C	Não	Controle negativo	12
	D	Sim	1 mL de 6×10^8 UFC/mL	48

Grupo A: aves de variedade branca sem desafio; Grupo B: aves de variedade branca desafiadas aos 30 dias de vida; Grupo C: aves de variedade vermelha sem desafio; Grupo D: aves de variedade vermelha desafiadas aos 30 dias de vida.

4.4 Colheita de material

Às 6 horas pós a infecção (hpi), 1 dia pós-infecção (dpi), 3 dpi e 5 dpi, três aves de cada grupo foram eutanasiadas pelo método de deslocamento cervical para colheita do material (Figura 1). Antes da eutanásia, foi colhida amostra de sangue pela via intracardíaca para contagem de hemácias e determinação do volume globular, e para os testes bioquímicos e o proteinograma. Na necropsia das aves, as amostras de tonsila cecal e baço foram colhidas assepticamente e congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80°C , até serem processadas para a extração de RNA. Amostras de fígado e tonsila cecal foram colhidas, cortadas e fixadas com acetona gelada durante 10 minutos e armazenadas no freezer a -80°C , até serem submetidas a técnica de imuno-histoquímica (IHQ). Além disso, amostras de fígado, baço e tonsila cecal foram colhidas e utilizadas para estimar o número de células viáveis de SG Nal^r 287/91, utilizada no desafio, conforme procedimento descrito no item 4.7.

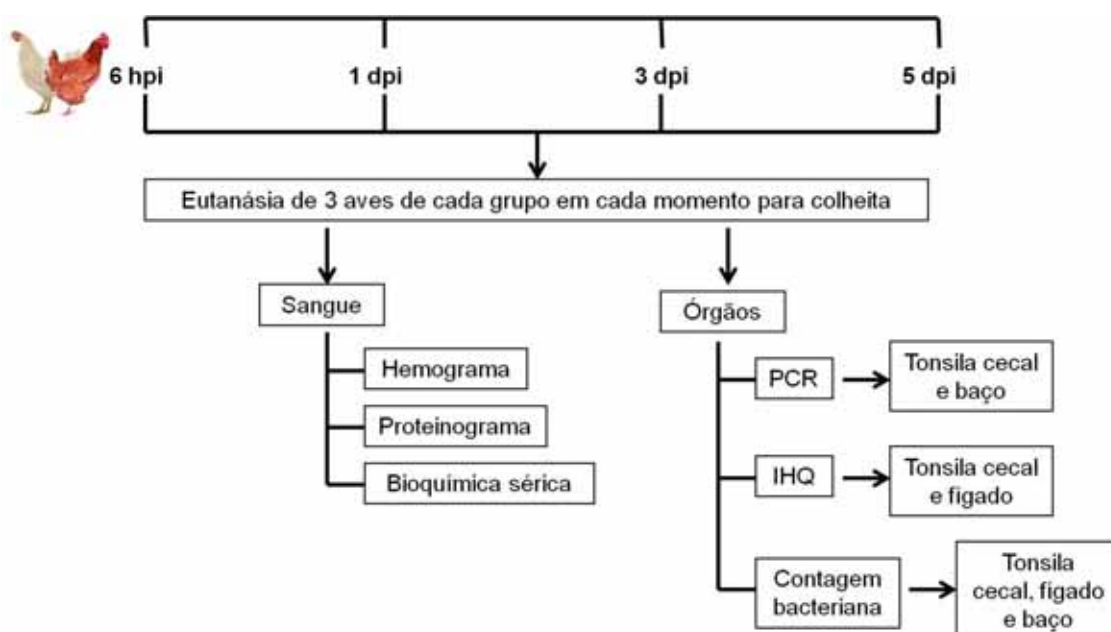


Figura 1. Fluxograma da colheita do material nos quatro grupos experimentais para cada momento após infecção.

4.5 Avaliação clínica

As aves foram submetidas ao exame clínico (TULLY; DORRESTEIN; JONES, 2011) antes do desafio e ao longo de dez dias após a infecção experimental. Neste período foram realizadas as avaliações de temperatura retal, consistência das fezes, comportamento, apetite dos animais e registro da mortalidade. A temperatura retal foi aferida por meio de termômetro clínico.

Durante este período, o exame clínico foi realizado no início da manhã e no final da tarde.

4.6 Avaliação de lesões macroscópicas

Após a eutanásia, os órgãos das aves foram analisados para avaliar o tamanho, coloração e aspecto, para a identificação de alterações anatomopatológicas da infecção por SG nos grupos infectados e assim, comparar dentre as diferentes variedades de aves, tendo como parâmetro os grupos controles negativos.

4.7 Avaliação da infecção sistêmica

Foi realizada a contagem bacteriana de amostras de fragmentos do fígado, baço e tonsila cecal de cada momento descrito no item 4.4. Estes órgãos foram colocados em PBS (solução salina tamponada com fosfatos pH 7,4) na proporção de 1:10, macerados e diluídos decimalmente até 10^{-3} (fígado e baço) e até 10^{-6} (tonsila cecal). De cada diluição, 100 μ L foram despejados em placas de ágar verde brilhante contendo ácido nalidíxico (20 μ g/mL) (VB Nal) (OXOID: CM0263) e incubados a 37°C/24 horas. O número de colônias por grama de órgão foi

transformado em $\log_{10}$ para análise dos resultados. Na ausência de crescimento, aos frascos contendo a amostra homogeneizada em PBS (1:10), foi adicionado igual volume de caldo selenito (OXOID: CM 395) contendo novobiocina (0,04%) preparado em concentração dupla. O frasco foi incubado a 37°C/24 horas e a seguir, seu conteúdo era semeado em ágar VB Nal, com nova incubação a 37°C/24 horas para detecção de SG Nal^r 287/91.

4.8 Colheita de sangue e de soro

Antes da eutanásia de cada ave, foi colhido 3 mL de sangue em seringa com anticoagulante (Heparina sódica, Sigma, EUA) pela via intracardíaca, para a realização de contagem de hemácias e determinação do volume globular. Além disso, foram colhidas 3 mL de sangue em seringa sem anticoagulante e transferidos a um frasco para obtenção de soro sanguíneo, que foi utilizado para as análises bioquímicas e no proteinograma. Após a colheita, amostras de sangue foram mantidas em repouso por 1 hora para coagulação e obtenção dos soros que foram centrifugadas a 1050xg durante 10 minutos, para melhor separação e em sequencia, armazenadas em microtubos de 1,5 mL e congeladas à -20°C durante dois meses, até o momento das análises. As amostras de sangue total foram mantidas refrigeradas até a realização das análises².

4.8.1 Contagem de hemácias e determinação do volume globular

As contagens de hemácias foram realizadas na câmara de Neubauer e estas células foram coradas segundo a técnica de Natt e Herrick (1952), expressando-se a contagem em número de hemácias/ μ L de sangue. A determinação do volume

² Laboratório de Apoio a Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Júlio de Mesquita Filho – Câmpus de Jaboticabal.

globular foi realizada pelo método do micro-hematócrito. Os tubos capilares contendo amostras de sangue foram centrifugados a 11.000 rpm por 5 minutos, os resultados expressos em porcentagem foram obtidos após a análise no cartão de leitura de volume globular.

4.8.2 Perfil bioquímico sérico

As amostras de soro foram submetidas à determinação dos teores séricos de proteína total (método do biureto), albumina (método verde de bromocresol), gamaglutamiltransferase (GGT) (método de Szasz modificado), asparto aminotransferase (AST) (método cinética UV-IFCC) e ácido úrico (método enzimático de Trinder), mediante a utilização de kits comerciais (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brasil). As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro semi-automático (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brasil), com luz de comprimento de onda apropriado para cada teste.

O proteinograma sérico foi obtido pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), proposta por Weber e Osborn (1969). Após o fracionamento, o gel foi corado durante 10 minutos em solução de *coomassie blue* 0,25% e, em seguida, o gel foi colocado em solução de ácido acético 7% para retirar o excesso de corante, até que as frações proteicas se tornassem nítidas. As concentrações dessas proteínas foram determinadas em densitômetro computadorizado (CS9301 PC, Shimadzu Corporation, Toquio, Japão). Como referência foi utilizada solução marcadora (S8445, Sigma – Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA) com diferentes pesos moleculares, além das proteínas purificadas ceruloplasmina, haptoglobina, α_1 -antitripsina, transferrina e IgG.

4.9 Imunomarcac o dos linfócitos T $\gamma\delta$

Amostras de fígado e tonsila cecal de três aves de cada grupo foram utilizadas para estimar a popula o dos linfócitos T $\gamma\delta$ (TCR1) nos momentos estudados. Amostras congeladas incorporadas em reagente crioprotetor (TissueTek[ ], OCT, Sakura, EUA) foram usadas para preparar secções de tecido congelado (10 m) em um micrótomo criostato a -20 C (CM1950; Leica Microsystems, Alemanha). Os cortes foram fixados em acetona gelada durante 10 minutos e armazenados em freezer -80 C até serem utilizados na técnica de IHQ. Antes de se proceder a realiza o da IHQ, as lâminas foram lavadas em PBS por três vezes durante 10 minutos e em seguida, os cortes foram incubados com soluço de peróxido de hidrog nio 4%, durante 10 minutos em temperatura ambiente, para realizar o bloqueio da peroxidase endógena. Depois de lavar as lâminas durante 5 minutos com PBS, o bloqueio das reações inespecíficas foi feito com soluço Protein Block[ ] (Dako, EUA), durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, os cortes foram incubados por 18 horas a 4 C com o anticorpo monoclonal anti-TCR $\gamma\delta$ de galinha diluído na razão 1:200 (8230-01, Southern Biotech, EUA). Após a incubac o, as lâminas foram lavadas com PBS durante 5 minutos e incubadas com o Polímero Reveal (SPD-125, Spring, EUA), usando o complemento durante 30 minutos e depois o conjugado HRP por outros 30 minutos. O cromógeno utilizado foi 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Merck, Alemanha). Para cada corte, cinco regiões de interesse foram aleatoriamente fotografadas em microscópio de luz (Eclipse E200, Moticam 2300; Nikon, Japão). A porcentagem de linfócitos T $\gamma\delta$ marcados foi calculada com o software de análise de imagem (ImageProPlus, MediaCybernetics, EUA).

4.10 Quantificação de genes envolvidos em resposta à infecção por SG

4.10.1 Extração de RNA total e síntese de DNA complementar (cDNA)

Para estudar a expressão dos genes IL-17, CCL-4 e granzima A, após a infecção por SG, as extrações do RNA total das amostras de tonsilas cecais e baço foram realizadas utilizando-se o RNeasy Mini Kit (Qiagen, Alemanha). Aproximadamente 30 mg do tecido foram pulverizados em tubos estéreis de 1,5 mL contendo nitrogênio líquido. Após maceração foram adicionados 600 µL de reagente de lise celular (RLTlise) com 1% de β-mercaptoetanol. O lisado foi centrifugado a 10.000xg durante 3 minutos e em seguida, 400 µL do sobrenadante foi colhido e transferido para outro tubo contendo 400 µL de etanol 70% para homogeneizar o lisado. Posteriormente, 700 µL da última mistura foi transferido para a coluna fornecida pelo kit e centrifugada a 8.000xg por 30 segundos. Após esta etapa, a coluna foi lavada usando os tampões RW1 e RPE. O RNA purificado foi eluído em 30 µL de água livre de RNase. Em seguida, foi determinada a concentração e a pureza do RNA utilizando o espectrofotômetro NanoDrop 1000 (ThermoScientific, EUA), para a leitura da absorbância em 280/260nm e 260/230nm, respectivamente. Posteriormente, as amostras foram estocadas a temperatura de -80°C até a sua utilização para produção do DNA complementar (cDNA).

A síntese da primeira fita de cDNA por transcrição reversa (RT) foi realizada pelo kit comercial QuantiTect® (Qiagen, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante com poucas modificações. Para a reação de síntese, foi feito um mix contendo 2 µL de gDNA, RNA template (quantidade variável até 1 µg) e quantidade suficiente de água livre de RNase fornecida pelo kit para um volume final de 14 µL. Esta mistura foi incubada por 2 minutos a 42°C. Após este período, foram acrescentados à mistura 1 µL Quantiscript Reverse Transcriptase, 4 µL tampão RT e 1 µL do primer RT, para um volume final de 20 µL. Esta mistura foi incubada por 20 minutos a 42°C, seguida de incubação por 3 minutos a 95°C, para a inativação da transcriptase reversa. A amplificação e a síntese de cDNA foi realizada usando

termociclador (MyCycler™, Bio-Rad, USA). Após este passo, a concentração e pureza do cDNA foram analisadas por espectrofotometria como descrito anteriormente e, depois armazenado a temperatura de -20°C, até a utilização para a quantificação dos genes nas reações de PCR em tempo real.

4.10.2 Iniciadores utilizados na PCR em tempo real

Os iniciadores utilizados para a amplificação dos genes IL-17 e GAPDH (gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase) foram baseados no trabalho de Crhanova et al. (2011). Além disso, os iniciadores dos genes CCL-4 e granzima-A foram desenhados com base nas sequências de RNA mensageiro disponíveis no banco de dados GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Os genes foram selecionados para estudar a resposta imune dos linfócitos T $\gamma\delta$, após a infecção por SG. O gene GAPDH é um gene de expressão constante e foi utilizado como gene normalizador. Na Tabela 2 estão disponíveis as sequências dos pares de iniciadores e a temperatura de anelamento (TA) utilizadas nas reações da PCR em tempo real.

Tabela 2. Sequência dos pares de iniciadores utilizados nas reações de PCR em tempo real.

Gene	Referência dos iniciadores	Sequência dos iniciadores (5' → 3')	Amplicons	TA (°C)
CCL-4	Próprio estudo	F 5'-GCAGTTGTTCTCGCTCTTCT-3' R 5'- CGCGGGATCTTGTGTGTTAT-3'	89 pb	60°C 60°C
Granzima-A	Próprio estudo	F 5'- CCTCTGGGGATGATCTCAAA-3' R 5'-ACACGGTGACTTCCCAAAG-3'	260 pb	60°C 60°C
IL-17	Crhanova et al. (2011)	F 5'- TATCAGCAAACGCTCACTGG-3' R 5'- AGTTCACGCACCTGGAATG-3'	110 pb	56,3°C 56,3°C
GAPDH	Crhanova et al. (2011)	F 5'-CCTGCATCTGCCCATTT-3' R 5'- GGCACGCCATCACTATC-3'	333 pb	60°C 60°C

F: Forward, R: Reverse, pb:Pares de base, TA: Temperatura de Anelamento

4.10.3 Reação de PCR em tempo real

As reações de PCR em tempo real para a amplificação dos genes alvo IL-17, CCL-4 e granzima-A e o gene normalizador GAPDH, foram realizadas com o cDNA obtido. A detecção dos genes alvos durante a amplificação ocorreu pela emissão de fluorescência do marcador SYBRGreen Jump Start Taq Ready Mix (Sigma-Aldrich, UK) em todos os genes.

A reação foi realizada no equipamento Real-time PCR CFX96 Touch™ (Bio-Rad). Cada reação foi preparada com 6,25 µL de SYBRGreen Jump Start Taq Ready Mix (Sigma-Aldrich, UK), 0,3 µM de iniciador forward e 0,3 µM de iniciador reverse para cada um dos genes, 50 ng de cDNA template ajustados em 2,9 µL e 0,08 µL de Platinum Hot Start Taq DNA polymerase (Invitrogen, Life Science, USA) para completar um volume final de 10 µL.

O padrão térmico utilizado no termociclador para a PCR em tempo real foi constituído por uma etapa de desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 45 ciclos de 94°C por 15 segundos, TA por 30 segundos (Tabela 2) e 72°C por 30 segundos, seguidos de leitura da fluorescência da placa entre cada ciclo. Todas as amostras foram avaliadas em duplicata.

4.11 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa SAS (Statistical Analysis System), versão 9.3. A normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias foram testadas previamente e os dados transformados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA), quando a diferença entre os dados foram significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) (DANIEL, 1991).

Os dados relativos à mortalidade foram analisados pelo teste Qui-quadrado ($p < 0,05$) (GREENWOOD; NIKULIN, 1996).

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação clínica

Os controles diários das temperaturas foram feitos para avaliar o estado febril decorrentes da infecção por SG. A partir do 4º dpi, as aves do grupo D (aves de variedade vermelha) manifestaram aumento da temperatura, atingindo 43°C, o que se manteve até o 7º dpi. As aves de variedade branca que foram infectadas não sofreram alterações na temperatura retal, mantendo-se dentro da faixa normal para a espécie entre 40,5 a 42°C. Além disso, notou-se que as aves do grupo D, mostraram sinais de depressão, penas eriçadas e diarreia com fezes de coloração amarelo-esverdeada a partir do 4º dpi, ao contrário das aves do grupo B as quais não apresentaram sinais clínicos. Os dados referentes à mortalidade das aves que receberam a cepa selvagem SG NaI^r 287/91 foram observados durante um período de dez dias. No grupo B não houve mortalidade de aves, ao contrário do grupo D, no qual a mortalidade começou a partir do 6º dpi (Tabela 3). A partir do 10º dpi, as aves remanescentes foram eutanasiadas para avaliar a presença de alterações macroscópicas, as quais são descritas no item 5.2.

Tabela 3. Mortalidade acumulada de aves de postura de variedade branca e vermelha após o desafio experimental com SG NaI^r 287/91.

Grupo	Nº de aves	Mortalidade acumulada Dias após infecção (dpi)										Total	Nº de aves restantes	Mortalidade (%)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
B	26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ^b	26	0%
D	36	0	0	0	0	0	3	8	15	19	22	22 ^a	14	73%

Grupo B: aves de variedade branca desafiadas aos 30 dias de vida; Grupo D: aves de variedade vermelha desafiadas aos 30 dias de vida. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatisticamente significativa pelo test χ^2 ($p < 0,05$).

5.2 Avaliação de lesões macroscópicas

Na avaliação das alterações macroscópicas, os órgãos das aves do grupo D (variedade vermelha) apresentaram lesões principalmente no fígado e baço a partir do 3º dpi, onde observou-se hepatoesplenomegalia com a presença de necrose focal, caracterizada por pontos esbranquiçados no fígado (Figura 2). Alterações mais exacerbadas neste grupo foram observadas a partir do 5º dpi, destacando-se coloração escurecida (variou de vermelho-escuro a esverdeado sugestivo de congestão e colestase, respectivamente) e aumento de volume do fígado, com pontos necróticos esbranquiçados espalhados por todo parênquima (Figura 3), espessamento e opacidade do pericárdio e aumento no volume dos rins e tonsilas cecais (Figura 4). No grupo B (variedade branca) foi notado pontos esbranquiçados puntiformes focais e congestão do fígado a partir do 3º dpi e no 5º dpi notou-se hepatomegalia em algumas aves (Figura 5). Contudo, não foram observadas alterações agudas em outros órgãos, de forma que somente no 10º dpi houve aumento de tamanho dos rins e das tonsilas cecais (Figura 6). As Placas de Peyer estavam aumentadas e visíveis macroscopicamente no intestino grosso das aves do grupo B a partir do 5º dpi, quando comparadas com as aves do grupo D, as quais foram visíveis a partir do 10º dpi (Figura 6).

Na Tabela 4 se mostra um resumo das alterações macroscópicas de cada grupo desafiado com SG Nal^r 287/91 para cada momento após a infecção.

Na tabela 5 estão descritas os diferentes graus de lesões macroscópicas entre os grupos infectados (B e D), em cada momento após a infecção. A severidade das alterações encontradas foi qualificada em quatro escores para os seguintes órgãos: fígado, baço, coração, rins e intestino (tonsila cecal e Placas de Peyer).

De acordo com os resultados desta avaliação, as aves do grupo D apresentaram escores variando entre moderado e severo em todos os órgãos no 5º e 10º dpi.

Tabela 4. Alterações macroscópicas observadas nas aves desafiadas com SG NaI^r 287/91 (grupos B e D).

Alterações macroscópicas	Momentos após infecção					
	3° dpi		5° dpi		10° dpi	
	B	D	B	D	B	D
Áreas esbranquiçadas puntiformes hepáticas	+	+	+	+	+	+
Hepatomegalia	-	+	+	+	+	+
Alteração na coloração do fígado*	-	-	-	+	-	+
Esplenomegalia	-	+	-	+	-	+
Aumento das tonsilas cecais	-	-	-	+	+	+
Pericardite	-	-	-	+	-	+
Aumento dos rins	-	-	-	+	+	+
Placas de Peyer visíveis	-	-	+	-	+	+

dpi: dias pós infecção; grupo B: aves brancas infectadas; grupo D: aves vermelhas infectadas; +: presença de alteração; -: ausência de alteração. *: coloração variou de vermelho-escuro a esverdeado, sugestivo de congestão e colestase, respectivamente.

Tabela 5. Escores das lesões macroscópicas observadas nas aves desafiadas com SG NaI^r 287/91 (grupos B e D).

Intensidade das alterações macroscópicas	Momentos após infecção					
	3° dpi		5° dpi		10° dpi	
	B	D	B	D	B	D
Áreas esbranquiçadas puntiformes hepáticas	+	++	++	+++	++	+++
Hepatomegalia	-	++	++	+++	++	+++
Alteração na coloração do fígado*	-	-	-	+++	-	+++
Esplenomegalia	-	+++	-	+++	-	+++
Aumento das tonsilas cecais	-	-	-	++	++	++
Pericardite	-	-	-	++	-	+++
Aumento dos rins	-	-	-	++	++	++
Placas de Peyer visíveis	-	-	++	-	++	+++

dpi: dias pós infecção; grupo B: aves brancas infectadas; grupo D: aves vermelhas infectadas. Qualificação dos quatro escores: ausência de lesão (-), leve (+), moderado (++) e severo (+++).



Figura 2. Avaliação macroscópica de fígado e baço em aves de variedade vermelha desafiadas com SG 287/91 (grupo D) e não desafiadas (Grupo C). Em ave do grupo D, nota-se hepatomegalia com pontos necróticos esbranquiçados no 3° dpi. No grupo C, pode se notar o fígado sem alterações (controle negativo). (1) Baço de ave não desafiada do grupo C. (2) Baço de ave desafiada do grupo D apresentando esplenomegalia.

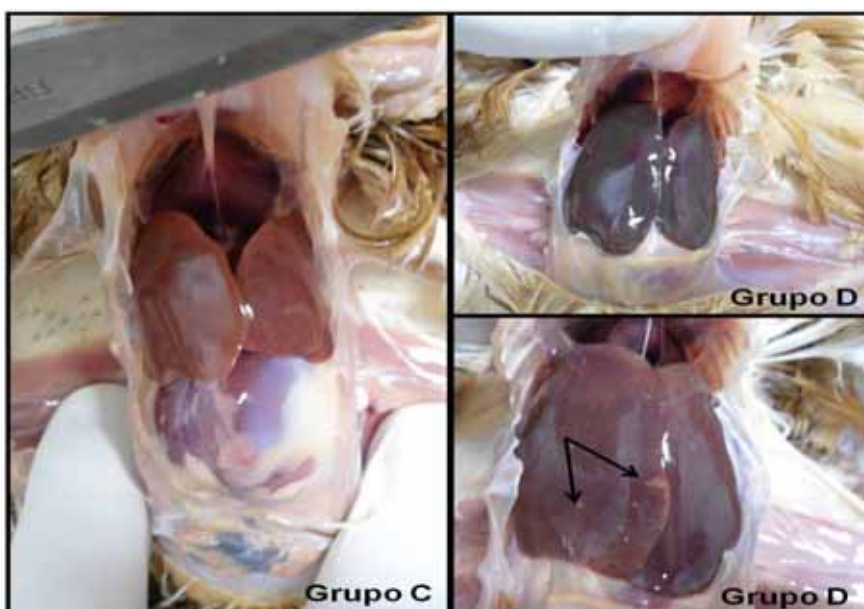


Figura 3. Avaliação macroscópica no 5° dpi, em aves de variedade vermelha desafiadas com SG (grupo D), em comparação com aves não desafiadas (Grupo C). Pode se notar hepatomegalia com alteração na coloração do fígado e pontos necróticos esbranquiçados espalhados por todo parênquima (seta) em aves desafiadas. Em aves não desafiadas do grupo C nota-se o fígado normal.

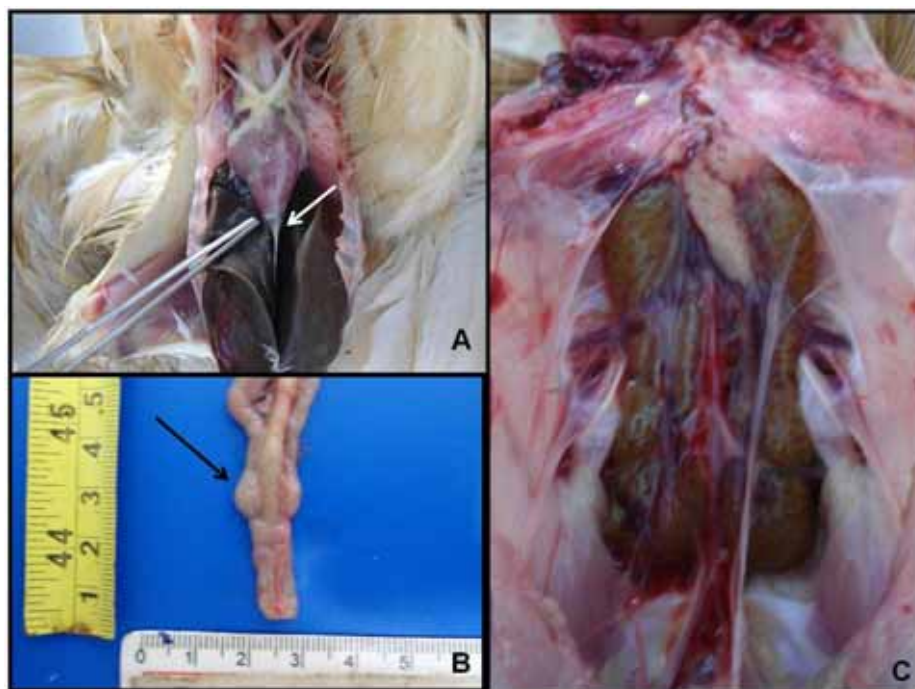


Figura 4. Lesões macroscópicas no 10º dpi de aves remanescentes desafiadas com SG 287/91, de variedade vermelha (grupo D). Pode se notar opacidade do pericárdio sugestivo de pericardite (A - seta), aumento no tamanho das tonsilas cecais (B - seta) e dos rins (C).

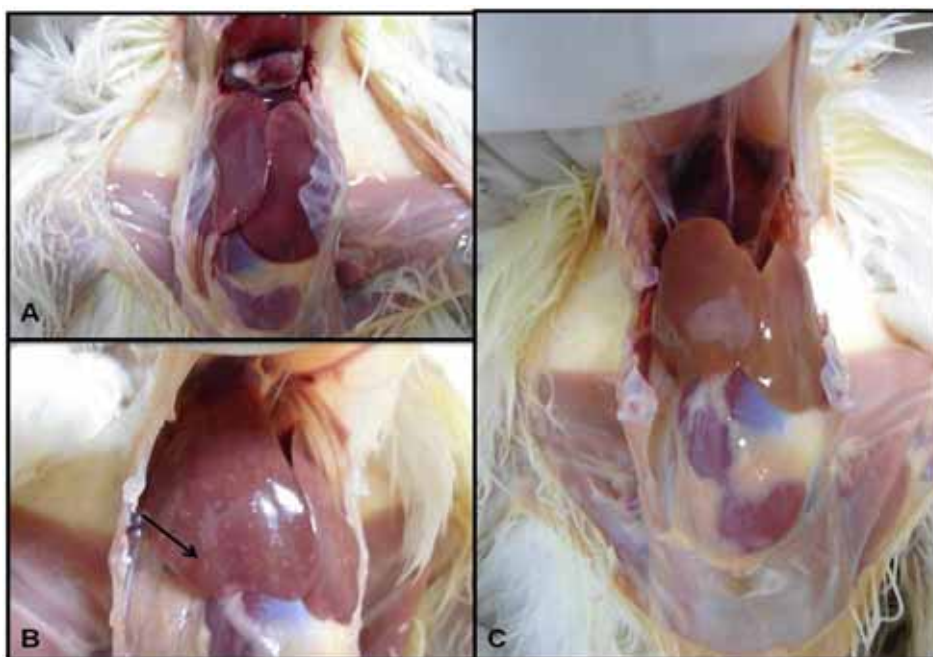


Figura 5. Lesões macroscópicas das aves de variedade branca desafiadas com SG 287/91 (grupo B). (A) Fígado congestionado e aumentado de tamanho no 3º dpi. (B – seta) Ao 5º dpi observa-se hepatomegalia com necrose multifocal no parênquima. (C) Fígado normal de ave não desafiada (grupo A).

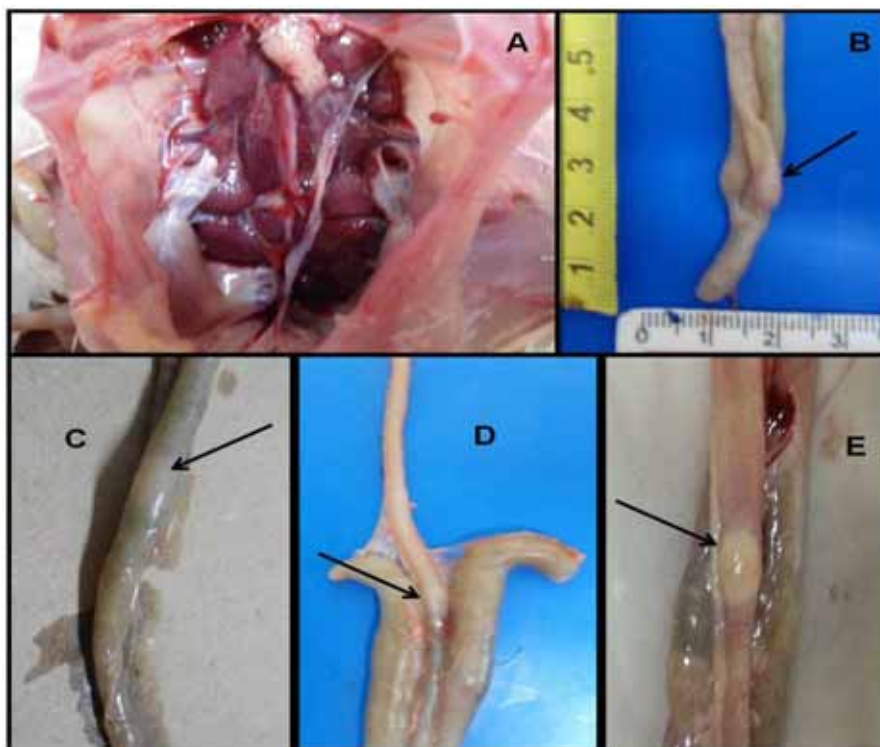


Figura 6. Lesões macroscópicas de aves desafiadas com SG 287/91. (A) Aumento no tamanho dos rins; (B – seta) aumento das tonsilas cecais ao 10º dpi em aves de variedade branca do grupo B. (C – seta) Aumento das Placas de Peyer no intestino das aves do grupo B ao 5º dpi. Nas aves de variedade vermelha do grupo D, as Placas de Peyer estavam aumentadas no 10º dpi (E – seta) em comparação ao grupo C (D – seta).

5.3 Avaliação da infecção sistêmica

A contagem bacteriana no fígado, baço e tonsila cecal foi realizada para comparar o número de SG Nal^r 287/91 nestes órgãos entre as diferentes variedades de aves desafiadas. Os resultados das médias do número de unidades formadoras de colônia por grama de amostra (UFC/g) foram convertidos em Log₁₀ e estão apresentados na Tabela 6. As contagens para fígado e baço no 3º e 5º dpi, apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre as aves do grupo B e D. No entanto, os valores da contagem bacteriana da tonsila cecal, não diferiram estatisticamente entre os grupos desafiados com SG ($p > 0,05$). Na Figura 7 estão dispostos a cinética da contagem bacteriana nos grupos desafiados, para cada órgão.

Tabela 6. Média (Log_{10}) do número de células viáveis (UFC/g) em amostras de fígado, baço e tonsila cecal de aves desafiadas aos 30° dias de vida com SG NaI^r 287/91.

Fígado	Grupo B	6 hpi	1 dpi	3 dpi	5 dpi
	Grupo D	0,00 ± 0,00 ^{aA}	1,33 ± 1,15 ^{aA}	1,89 ± 1,83 ^{aB}	2,00 ± 0,00 ^{aB}
Baço	Grupo B	0,00 ± 0,00 ^{aA}	0,67 ± 1,15 ^{aA}	2,00 ± 0,00 ^{aB}	1,33 ± 1,15 ^{aB}
	Grupo D	0,00 ± 0,00 ^{aA}	0,67 ± 1,15 ^{aA}	4,36 ± 0,34 ^{bA}	5,54 ± 0,45 ^{bA}
Tonsila Cecal	Grupo B	2,15 ± 2,23 ^{aA}	5,69 ± 0,74 ^{aA}	4,57 ± 2,32 ^{aA}	2,82 ± 2,47 ^{aA}
	Grupo D	1,33 ± 1,15 ^{aA}	4,75 ± 3,19 ^{aA}	6,78 ± 0,84 ^{aA}	4,01 ± 3,48 ^{aA}

hpi: horas pós infecção; dpi: dias após infecção; grupo B: aves brancas infectadas; grupo D: aves vermelhas infectadas. Dados representam médias ± desvio padrão da contagem bacteriana de três aves por grupo em amostras de fígado, baço e tonsila cecal. Médias seguidas por letras minúsculas foram comparadas na mesma linha e por letras maiúsculas foram comparadas na mesma coluna pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

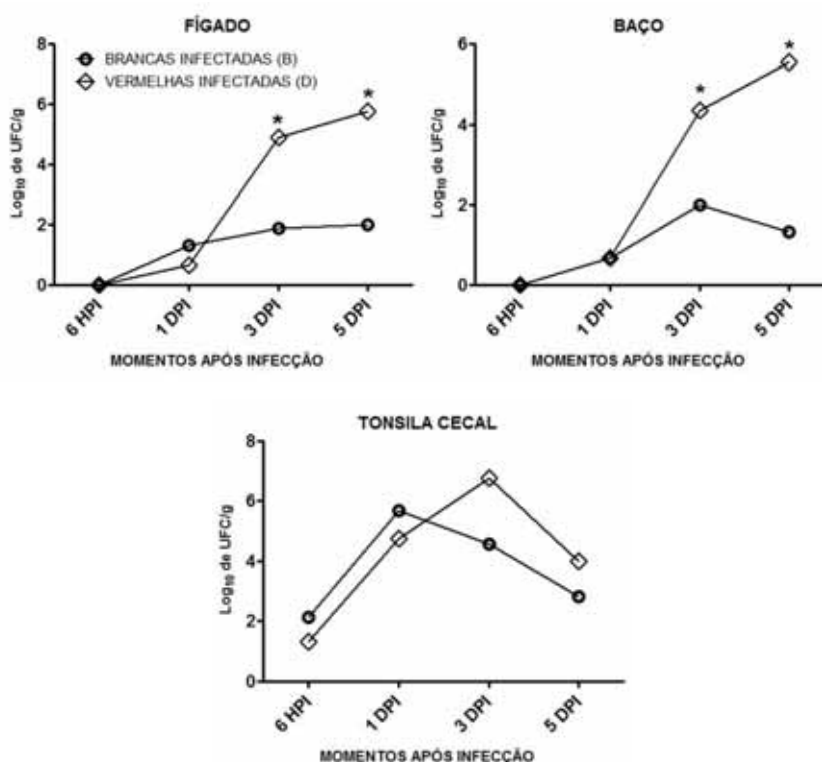


Figura 7. Contagem bacteriana de SG NaI^r 287/91 expressos em Log_{10} de UFC/g em amostras de fígado, baço e tonsila cecal após o desafio nos grupos B (aves brancas infectadas) e D (aves vermelhas infectadas). Asterisco (*) indica diferença entre médias da contagem bacteriana dos grupos ($p < 0,05$).

5.4 Contagem de hemácias e volume globular

Os resultados da contagem de hemácias e volume globular dos grupos experimentais são mostrados na Tabela 7. Não foram observadas diferenças estatísticas ($p>0,05$) entre as médias dos grupos em relação ao volume globular. Nas aves desafiadas (grupos B e D), a contagem de hemácias não demonstraram alterações significativas ($p>0,05$), porém, observou-se um aumento do número destas células às 6 hpi e 1° dpi em comparação com cada um dos grupos controles (A e C).

Tabela 7. Médias da contagem de hemácias e volume globular de aves de postura das variedades branca e vermelha, desafiadas experimentalmente por SG Nal^r 287/91.

VARIÁVEL	COLHEITAS	GRUPOS			
		A (controle)	B	C (controle)	D
Hemácias/ μ L ($\times 10^6$)	6 HPI	1,96 ^{aA}	2,30 ^{aA}	1,63 ^{aB}	2,30 ^{aA}
	1 DPI	1,85 ^{aA}	2,36 ^{aA}	1,40 ^{aB}	2,42 ^{aA}
	3 DPI	3,45 ^{aA}	3,11 ^{aA}	3,38 ^{aA}	3,66 ^{aA}
	5 DPI	2,76 ^{aA}	2,07 ^{aA}	2,49 ^{aAB}	2,37 ^{aA}
Volume Globular (%)	6 HPI	28,33 ^{aA}	33,00 ^{aA}	28,00 ^{aA}	31,33 ^{aA}
	1 DPI	35,00 ^{aA}	35,33 ^{aA}	18,33 ^{aA}	30,67 ^{aA}
	3 DPI	19,33 ^{aA}	31,00 ^{aA}	21,00 ^{aA}	18,33 ^{aA}
	5 DPI	31,33 ^{aA}	27,33 ^{aA}	31,33 ^{aA}	28,33 ^{aA}

A= Grupo controle negativo das aves de variedade branca; B= Grupo de aves de variedade branca desafiadas oralmente com SG; C= Grupo controle negativo das aves de variedade vermelha; D= Grupo de aves de variedade vermelha desafiadas oralmente com SG. HPI= horas pós-infecção; DPI= dias pós-infecção. Médias seguidas por letras minúsculas foram comparadas na mesma linha e por letras maiúsculas foram comparadas na mesma coluna pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

5.5 Perfil bioquímico sérico

Os dados referentes aos parâmetros bioquímicos séricos são apresentados na Tabela 8. As médias dos teores séricos de ácido úrico, GGT e AST, não demonstraram alterações significativas ($p>0,05$) entre os grupos. No grupo B,

observou-se aumento significativo ($p>0,05$) da concentração de proteína total no 3º dpi em comparação com os outros grupos. No 5º dpi, os níveis de albumina apresentaram uma diminuição na concentração sérica em aves do grupo D, em relação às aves do grupo C (controle).

Tabela 8. Médias dos teores séricos de proteína total, albumina, ácido úrico, GGT e AST de aves de postura de variedade branca e vermelha, desafiadas experimentalmente por SG NaI^r 287/91.

VARIÁVEL	COLHEITAS	GRUPOS			
		A (controle)	B	C (controle)	D
Proteína total (g/dL)	6 HPI	3,78 ^{aA}	3,69 ^{aA}	2,98 ^{bA}	3,36 ^{abA}
	1 DPI	3,42 ^{aA}	3,59 ^{aA}	3,21 ^{aA}	3,27 ^{aA}
	3 DPI	3,36 ^{aA}	3,89 ^{aA}	3,11 ^{bA}	3,35 ^{bA}
	5 DPI	3,20 ^{aA}	3,73 ^{aA}	3,24 ^{aA}	3,55 ^{aA}
Albumina (g/dL)	6 HPI	1,89 ^{aA}	1,91 ^{aA}	1,54 ^{aA}	1,79 ^{aA}
	1 DPI	1,82 ^{aA}	1,83 ^{aA}	1,74 ^{aA}	1,52 ^{aA}
	3 DPI	1,69 ^{aA}	1,47 ^{aAB}	1,55 ^{aA}	1,49 ^{aA}
	5 DPI	1,55 ^{abA}	1,12 ^{bcB}	1,64 ^{aA}	0,91 ^{cB}
Ácido Úrico (mg/dL)	6 HPI	4,68 ^{aA}	5,86 ^{aA}	5,90 ^{aA}	6,78 ^{aA}
	1 DPI	6,59 ^{aA}	7,84 ^{aA}	5,59 ^{aA}	6,61 ^{aA}
	3 DPI	5,77 ^{aA}	5,43 ^{aA}	5,49 ^{aA}	6,79 ^{aA}
	5 DPI	5,49 ^{aA}	7,14 ^{aA}	6,97 ^{aA}	5,72 ^{aA}
GGT (U/L)	6 HPI	30,60 ^{aA}	33,15 ^{aA}	25,50 ^{aA}	30,60 ^{aA}
	1 DPI	33,15 ^{aA}	40,80 ^{aA}	30,60 ^{aA}	38,25 ^{aA}
	3 DPI	38,25 ^{aA}	43,35 ^{aA}	40,80 ^{aA}	43,35 ^{aA}
	5 DPI	30,60 ^{aA}	38,25 ^{aA}	33,15 ^{aA}	30,60 ^{aA}
AST (U/L)	6 HPI	228,73 ^{aA}	232,20 ^{aA}	202,53 ^{aA}	195,57 ^{aA}
	1 DPI	219,97 ^{aAB}	221,73 ^{aA}	191,15 ^{aA}	185,10 ^{aA}
	3 DPI	183,33 ^{aAB}	183,30 ^{aA}	223,47 ^{aA}	192,07 ^{aA}
	5 DPI	164,13 ^{aB}	209,53 ^{aA}	178,10 ^{aA}	200,80 ^{aA}

A= Grupo controle negativo das aves de variedade branca; B= Grupo de aves de variedade branca desafiadas oralmente com SG; C= Grupo controle negativo das aves de variedade vermelha; D= Grupo de aves de variedade vermelha desafiadas oralmente com SG. HPI= horas pós infecção; DPI= dias pós a infecção. Médias seguidas por letras minúsculas foram comparadas na mesma linha e por letras maiúsculas foram comparadas na mesma coluna pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

Nos traçados densitométricos das amostras de soro sanguíneo dos diferentes grupos, obtidos por SDS-PAGE, foram constatadas entre 28 a 33 proteínas, cujos pesos moleculares variaram de 285.000 a 21.000 daltons (Da). No apêndice Figura

1A, encontra-se um exemplo do traçado densitométrico com 12 frações de proteínas selecionadas neste estudo, mostrando as principais alterações no perfil de uma ave sem infecção (grupo controle) em comparação com uma ave infectada.

Na Tabela 9 estão representadas sete frações proteicas consideradas mais relevantes para este estudo. Embora outras frações foram calculadas e estão disponíveis no apêndice Tabela 1A.

Os teores séricos da albumina, α 1-glicoproteína ácida e ceruloplasmina não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) entre os grupos. Apesar dos níveis da ceruloplasmina não terem diferido entre os grupos, nota-se que as quantidades desta proteína foram maiores em todos os momentos nas aves do grupo B quando comparado com as aves do grupo D (Tabela 9). No 3° dpi, as aves do grupo B mostraram um aumento nos níveis da proteína 99.000 Da em relação ao grupo A. No entanto, os resultados obtidos nos grupos infectados (grupo B e D) não foram estatisticamente diferentes ($p>0,05$). Nos momentos avaliados, pode-se observar que as quantidades da proteína de 99.000 Da, aumentaram constantemente nos dois grupos, sendo que, os maiores níveis foram verificados nas aves do grupo B. Tanto no grupo B quanto no grupo D, as quantidades da proteína de 90.000 Da estavam aumentadas no 3° dpi em comparação com os respectivos grupos controles (A e C), entretanto, esta diferença não foi significativa ($p>0,05$).

Os níveis de transferrina estavam significativamente aumentados ($p<0,05$) no 3° e 5° dpi, nos grupos infectados B e D, em comparação aos grupos A e C (não infectados). As maiores quantidades desta proteína foram observadas em aves do grupo B até o 3° dpi em comparação com o grupo D. Ao 5° dpi, as quantidades foram maiores no grupo D em relação ao grupo B. No 3° dpi, as aves do grupo D mostraram um aumento de até 10 vezes maior da haptoglobina em relação ao grupo controle (grupo C), aproximadamente. No 5° dpi, os níveis desta proteína para ambos os grupos infectados (B e D), foram 7 e 10 vezes maiores, respectivamente, em relação às aves do grupo A e C (controle) ($p<0,05$).

Tabela 9. Média e desvio padrão dos teores séricos de sete frações proteicas (mg/dL) obtidas por fracionamento em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de aves comerciais de variedade branca e vermelha infectadas experimentalmente por SG NaI^r 287/91.

Proteínas	6 HPI	1 DPI	3 DPI	5 DPI
Ceruloplasmina				
Grupo A (controle)	24,80 ± 12,97 ^{aA}	14,18 ± 1,90 ^{aA}	17,12 ± 2,01 ^{aA}	18,49 ± 1,10 ^{aA}
Grupo B	21,86 ± 11,94 ^{aA}	19,23 ± 4,14 ^{aA}	21,60 ± 13,67 ^{aA}	30,81 ± 9,59 ^{aA}
Grupo C (controle)	7,80 ± 1,55 ^{aA}	10,69 ± 0,60 ^{aA}	10,44 ± 0,74 ^{aA}	31,16 ± 18,24 ^{aA}
Grupo D	10,47 ± 2,56 ^{aA}	10,36 ± 2,80 ^{aA}	12,80 ± 3,47 ^{aA}	22,16 ± 1,78 ^{aA}
99.000 Da				
Grupo A (controle)	41,45 ± 1,80 ^{aA}	21,43 ± 3,68 ^{aA}	27,22 ± 4,77 ^{bA}	21,27 ± 6,25 ^{aA}
Grupo B	34,80 ± 10,66 ^{abA}	37,50 ± 8,82 ^{aA}	83,39 ± 29,61 ^{aA}	94,46 ± 63,48 ^{aA}
Grupo C (controle)	12,02 ± 7,79 ^{cAB}	25,99 ± 9,59 ^{aA}	18,24 ± 12,54 ^{bB}	52,96 ± 7,57 ^{aAB}
Grupo D	19,97 ± 9,57 ^{bcA}	34,75 ± 14,89 ^{aA}	35,01 ± 22,39 ^{abA}	75,98 ± 32,47 ^{aA}
90.000 Da				
Grupo A (controle)	48,44 ± 11,50 ^{aA}	23,47 ± 3,12 ^{aA}	29,59 ± 5,69 ^{bA}	25,96 ± 5,93 ^{bA}
Grupo B	41,54 ± 10,09 ^{aA}	43,20 ± 10,97 ^{aA}	101,46 ± 38,98 ^{aA}	100,50 ± 65,51 ^{abA}
Grupo C (controle)	33,87 ± 18,98 ^{aA}	30,00 ± 14,30 ^{aA}	34,49 ± 4,84 ^{bA}	31,77 ± 48,30 ^{abA}
Grupo D	45,0 ± 6,25 ^{aAB}	37,88 ± 17,22 ^{aAB}	71,55 ± 18,59 ^{abA}	136,65 ± 20,50 ^{aB}
Transferrina				
Grupo A (controle)	128,95 ± 20,35 ^{aA}	107,02 ± 7,22 ^{aA}	117,96 ± 12,23 ^{bcA}	108,98 ± 12,20 ^{aA}
Grupo B	123,53 ± 7,96 ^{aA}	118,80 ± 13,11 ^{aA}	325,09 ± 82,68 ^{aA}	450,89 ± 286,58 ^{bA}
Grupo C (controle)	93,99 ± 19,95 ^{aAB}	88,50 ± 18,59 ^{aA}	91,84 ± 2,70 ^{CB}	167,77 ± 94,32 ^{aAB}
Grupo D	103,55 ± 10,25 ^{aA}	99,34 ± 17,14 ^{aBC}	208,81 ± 21,63 ^{bAB}	533,53 ± 10,96 ^{bC}
Albumina				
Grupo A (controle)	2507 ± 201,3 ^{aA}	2304 ± 160 ^{aA}	2629 ± 570 ^{aA}	2158 ± 276,6 ^{aA}
Grupo B	2461 ± 156,1 ^{aA}	2326 ± 117,3 ^{aA}	2200 ± 242,4 ^{aA}	2036 ± 328,4 ^{aA}
Grupo C (controle)	2011 ± 49,8 ^{bA}	2249 ± 382 ^{aA}	2132 ± 120,3 ^{aA}	2061 ± 140,3 ^{aA}
Grupo D	2292 ± 12,1 ^{abA}	2189 ± 321,2 ^{aA}	2142 ± 258,7 ^{aA}	1862 ± 181,1 ^{aA}
Haptoglobina				
Grupo A (controle)	5,40 ± 1,20 ^{aA}	6,54 ± 0,58 ^{aA}	5,31 ± 0,41 ^{bA}	5,19 ± 2,27 ^{cA}
Grupo B	6,13 ± 0,46 ^{aA}	6,97 ± 0,98 ^{aA}	25,90 ± 25,01 ^{abA}	53,82 ± 42,04 ^{bA}
Grupo C (controle)	5,16 ± 1,93 ^{aA}	5,15 ± 0,14 ^{aAB}	3,89 ± 1,25 ^{bA}	12,56 ± 10,45 ^{CB}
Grupo D	5,28 ± 1,07 ^{aA}	4,32 ± 0,50 ^{aBC}	38,71 ± 3,80 ^{aAB}	92,17 ± 3,62 ^{aC}
α1-glicoproteína ácida				
Grupo A (controle)	0,88 ± 0,16 ^{aA}	0,82 ± 0,35 ^{aA}	0,96 ± 0,16 ^{aA}	1,87 ± 0,17 ^{aA}
Grupo B	1,10 ± 0,49 ^{aA}	1,14 ± 0,23 ^{aA}	0,29 ± 0,26 ^{aA}	1,87 ± 0,94 ^{aA}
Grupo C (controle)	0,46 ± 0,41 ^{aA}	1,04 ± 0,48 ^{aA}	0,70 ± 0,08 ^{aA}	1,20 ± 0,45 ^{aA}
Grupo D	0,56 ± 0,07 ^{aA}	0,71 ± 0,24 ^{aA}	0,48 ± 0,07 ^{aA}	1,33 ± 1,16 ^{aA}

A= Grupo controle negativo das aves de variedade branca; B= Grupo de aves de variedade branca desafiadas oralmente com SG; C= Grupo controle negativo das aves de variedade vermelha; D= Grupo de aves de variedade vermelha desafiadas oralmente com SG. HPI= horas pós infecção; DPI= dias pós a infecção. Médias seguidas por letras minúsculas foram comparadas na mesma coluna e por letras maiúsculas foram comparadas na mesma linha pelo teste de Tukey (p<0,05).

5.6 Mensuração dos linfócitos T $\gamma\delta$: imuno-histoquímica

A mensuração dos linfócitos T $\gamma\delta$ foi analisada pela técnica da imuno-histoquímica em amostras de fígado e tonsila cecal, avaliando a população destas células (porcentagem da área) em ambas as variedades de aves. A detecção destes linfócitos foi positiva para o anticorpo anti-TCR $\gamma\delta$, com marcação citoplasmática nos linfócitos T $\gamma\delta$. Nos cortes de fígado, esta subpopulação de linfócitos T, foi observada nos sinusóides hepáticos. Na tonsila cecal, estas células tiveram uma distribuição homogênea em todo o fragmento (vilos, mucosa, nódulos linfáticos, submucosa). Os resultados das médias das porcentagens de áreas imunomarcadas estão dispostos nas Tabelas 10, 11 e 12.

No fígado das aves de variedade branca (grupo A e B), o fluxo de linfócitos T $\gamma\delta$ no grupo A, teve uma maior população destas células quando comparado com o grupo B às 6 hpi. Os níveis de linfócitos T $\gamma\delta$ no grupo A, mostraram-se significativamente aumentados às 6 hpi, em relação aos outros momentos avaliados. No 1º dpi, o grupo A demonstrou maior quantidade de áreas marcadas na tonsila cecal, com relação aos níveis do grupo B, que foram significativamente menores (Tabela 10). Na tonsila cecal das aves de variedade vermelha (grupo C e D), às 6 hpi, foi verificado que o fluxo de linfócitos T $\gamma\delta$ no grupo C, estava aumentado ($p < 0,05$) com relação aos demais momentos (Tabela 11). No 1º dpi, o grupo C demonstrou maior quantidade de linfócitos T $\gamma\delta$ ($p < 0,05$) detectados em amostras de fígado. Os níveis destas células foram maiores no grupo D no 5º dpi, em relação aos outros momentos deste mesmo grupo e aos valores obtidos no grupo C.

As análises feitas entre as diferentes variedades de aves (grupos B e D), após o desafio, mostrou que no primeiro momento (6 hpi), o grupo B, teve maior quantidade de linfócitos T $\gamma\delta$ detectados nas amostras de fígado e tonsila cecal (Tabela 12). Na Figura 8 estão dispostas as médias das porcentagens de linfócitos T $\gamma\delta$ em amostras de fígado e tonsila cecal. As áreas imunomarcadas no fígado e tonsila cecal estão representadas nas Figuras 9 e 10.

Tabela 10. Média das porcentagens de linfócitos T $\gamma\delta$ em amostras de fígado e tonsila cecal de aves de variedade branca (grupo A e B).

		6 Hpi	1 Dpi	3 Dpi	5 Dpi
Fígado	Grupo A	3,21 $\pm$ 0,00 ^{aA}	1,50 $\pm$ 1,15 ^{bA}	0,51 $\pm$ 1,83 ^{cA}	1,67 $\pm$ 0,00 ^{bA}
	Grupo B	1,79 $\pm$ 0,00 ^{aB}	1,50 $\pm$ 1,15 ^{aA}	0,90 $\pm$ 0,40 ^{aA}	2,15 $\pm$ 0,38 ^{aA}
		6 Hpi	1 Dpi	3 Dpi	5 Dpi
Tonsila Cecal	Grupo A	11,16 $\pm$ 5,72 ^{aA}	7,19 $\pm$ 3,80 ^{abA}	0,51 $\pm$ 0,26 ^{cA}	1,67 $\pm$ 0,24 ^{bcA}
	Grupo B	9,60 $\pm$ 3,47 ^{aA}	1,50 $\pm$ 0,64 ^{bB}	0,90 $\pm$ 0,40 ^{bA}	2,15 $\pm$ 1,05 ^{bA}

hpi: horas pós infecção; dpi: dias pós infecção; grupo A: aves brancas não infectadas; grupo B: aves brancas infectadas. Dados representam médias $\pm$ desvio padrão das porcentagens de linfócitos T $\gamma\delta$ de três aves por grupo em amostras de fígado e tonsila cecal. Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma linha ou por letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 11. Média das porcentagens de linfócitos T $\gamma\delta$ em amostras de fígado e tonsila cecal de aves de variedade vermelha (grupo C e D).

		6 Hpi	1 Dpi	3 Dpi	5 Dpi
Fígado	Grupo C	0,40 $\pm$ 0,22 ^{bA}	1,66 $\pm$ 0,36 ^{aA}	0,44 $\pm$ 0,27 ^{bA}	0,58 $\pm$ 0,27 ^{bb}
	Grupo D	0,15 $\pm$ 0,10 ^{bA}	0,59 $\pm$ 0,37 ^{bB}	0,34 $\pm$ 0,16 ^{bcA}	1,22 $\pm$ 0,25 ^{aA}
		6 Hpi	1 Dpi	3 Dpi	5 Dpi
Tonsila Cecal	Grupo C	5,25 $\pm$ 1,61 ^{aA}	1,66 $\pm$ 0,36 ^{aA}	0,44 $\pm$ 0,27 ^{bA}	0,58 $\pm$ 0,27 ^{bA}
	Grupo D	3,22 $\pm$ 0,99 ^{ab}	0,59 $\pm$ 0,37 ^{bA}	0,34 $\pm$ 0,16 ^{bA}	1,22 $\pm$ 0,25 ^{bA}

hpi: horas pós infecção; dpi: dias pós infecção; grupo A: aves brancas não infectadas; grupo B: aves brancas infectadas. Dados representam médias $\pm$ desvio padrão das porcentagens de linfócitos T $\gamma\delta$ de três aves por grupo em amostras de fígado e tonsila cecal. Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma linha ou por letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 12. Média das porcentagens de linfócitos T $\gamma\delta$ em amostras de fígado e tonsila cecal das aves de postura de variedade branca e vermelha (grupo B e D), desafiadas experimentalmente por SG Nal^I 287/91.

		6 Hpi	1 Dpi	3 Dpi	5 Dpi
Fígado	Grupo B	1,79 $\pm$ 0,87 ^{aA}	1,50 $\pm$ 0,64 ^{aA}	0,90 $\pm$ 0,40 ^{abA}	2,15 $\pm$ 1,05 ^{acA}
	Grupo D	0,15 $\pm$ 0,10 ^{ab}	0,59 $\pm$ 0,37 ^{aA}	0,34 $\pm$ 0,16 ^{aA}	1,22 $\pm$ 0,25 ^{aA}
		6 Hpi	1 Dpi	3 Dpi	5 Dpi
Tonsila Cecal	Grupo B	9,60 $\pm$ 3,47 ^{aA}	1,50 $\pm$ 0,64 ^{bB}	0,90 $\pm$ 0,40 ^{bA}	2,15 $\pm$ 1,05 ^{bA}
	Grupo D	3,22 $\pm$ 0,99 ^{ab}	0,59 $\pm$ 0,37 ^{bA}	0,34 $\pm$ 0,16 ^{bA}	1,22 $\pm$ 0,25 ^{bA}

hpi: horas pós infecção; dpi: dias pós infecção; grupo B: aves brancas infectadas; grupo D: aves vermelhas infectadas. Dados representam médias $\pm$ desvio padrão das porcentagens de linfócitos T $\gamma\delta$ de três aves por grupo em amostras de fígado e tonsila cecal. Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma linha ou por letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

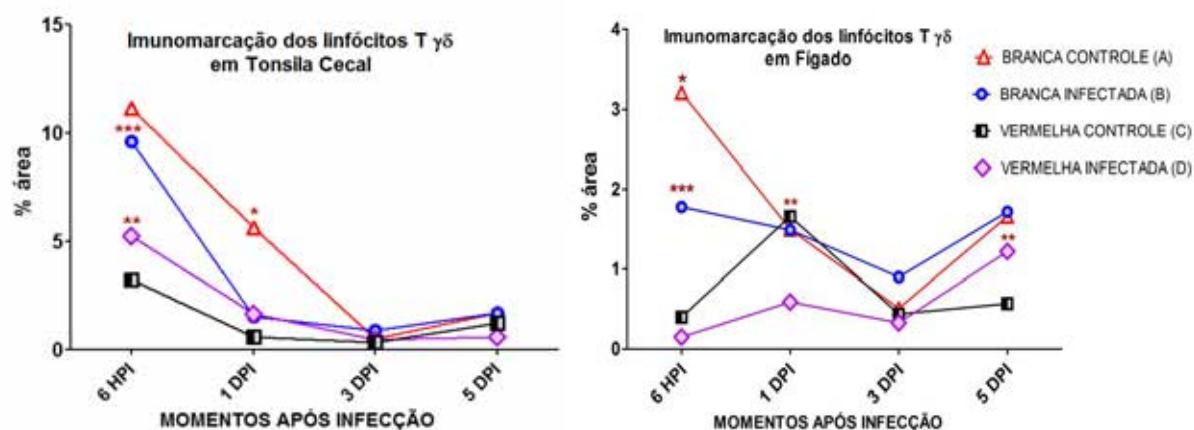


Figura 8. Quantificação dos linfócitos T $\gamma\delta$ imunomarcados em cortes de fígado e tonsila cecal nos quatro grupos experimentais às 6 hpi e 1,3 e 5 dpi. (*) indica diferença entre médias das porcentagens de linfócitos T $\gamma\delta$ entre os grupos A e B (variedade branca), no mesmo momento; (**) indica diferença entre as médias dos grupos C e D (variedade vermelha), no mesmo momento e (***) indica diferença entre as médias dos grupos infectados B e D, no mesmo momento. As análises foram realizadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

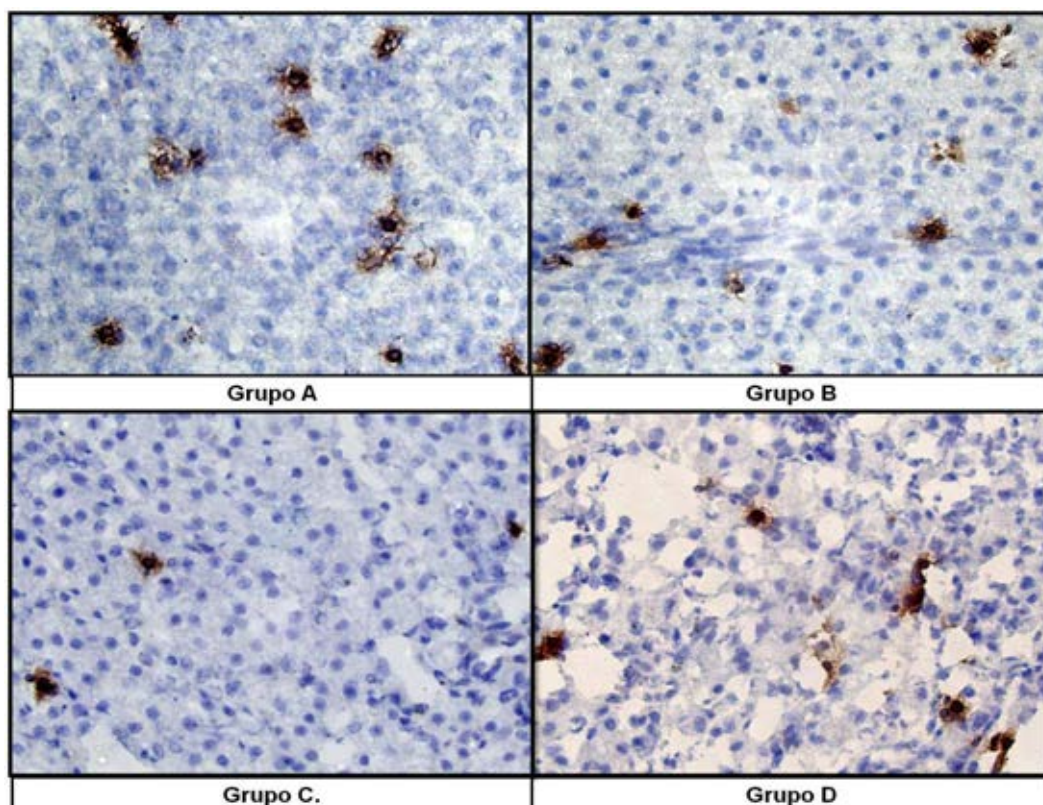


Figura 9. Fotomicrografia de fígado de aves desafiadas (B, D) e controle (A, C). Notar imunomarcção citoplasmática em linfócitos T $\gamma\delta$ presentes nos sinusóides hepáticos nas aves. Imuno-histoquímica. Objetiva 40X.

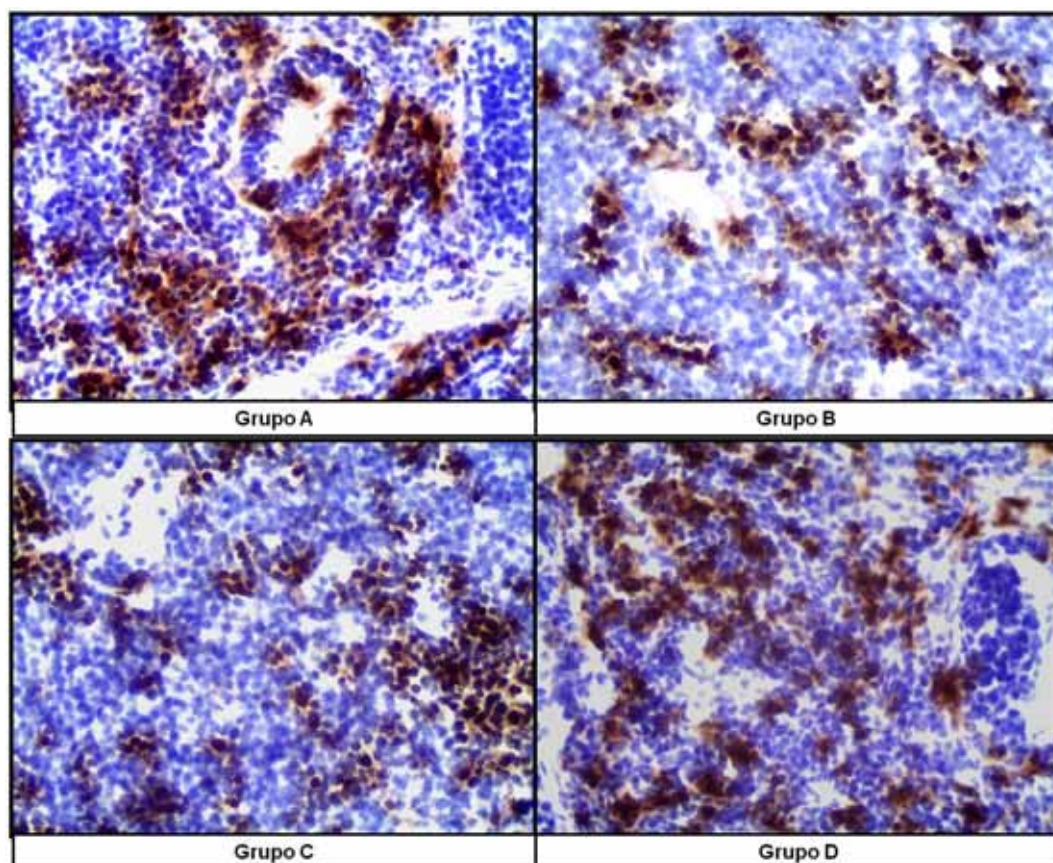


Figura 10. Fotomicrografia de tonsila cecal de aves desafiadas (B, D) e controle (A, C). Notar imunomarcção citoplasmática em linfócitos T $\gamma\delta$ presentes nos sinusóides hepáticos nas aves. Imuno-histoquímica. Objetiva 40X

5.7 Quantificação de mRNA dos genes IL-17, Granzima A e CCL-4

Os níveis de mRNA em amostras de baço e tonsila cecal foram determinadas pela RT-PCR de quantificação relativa. A expressão destes genes foi avaliada para cada momento descrito no item 4.4.

Os resultados do presente estudo demonstram que os níveis de Granzima A e IL-17 às 6 hpi, tiveram um aumento significativo ($p < 0,05$) na tonsila cecal do grupo D em comparação com o grupo B (Figura 11). A CCL-4 teve uma expressão aumentada ($p < 0,05$) em amostras de tonsila cecal para o grupo D no 1º dpi quando comparado com os grupos A e C. Em amostras de tonsila cecal, os níveis de Granzima A e IL-17 em relação aos outros momentos, não mostraram diferenças

estatisticamente significativa ($p>0,05$). Porém, foi observado que no grupo D, a expressão destes genes foi maior em todos os momentos após a infecção em relação ao grupo B.

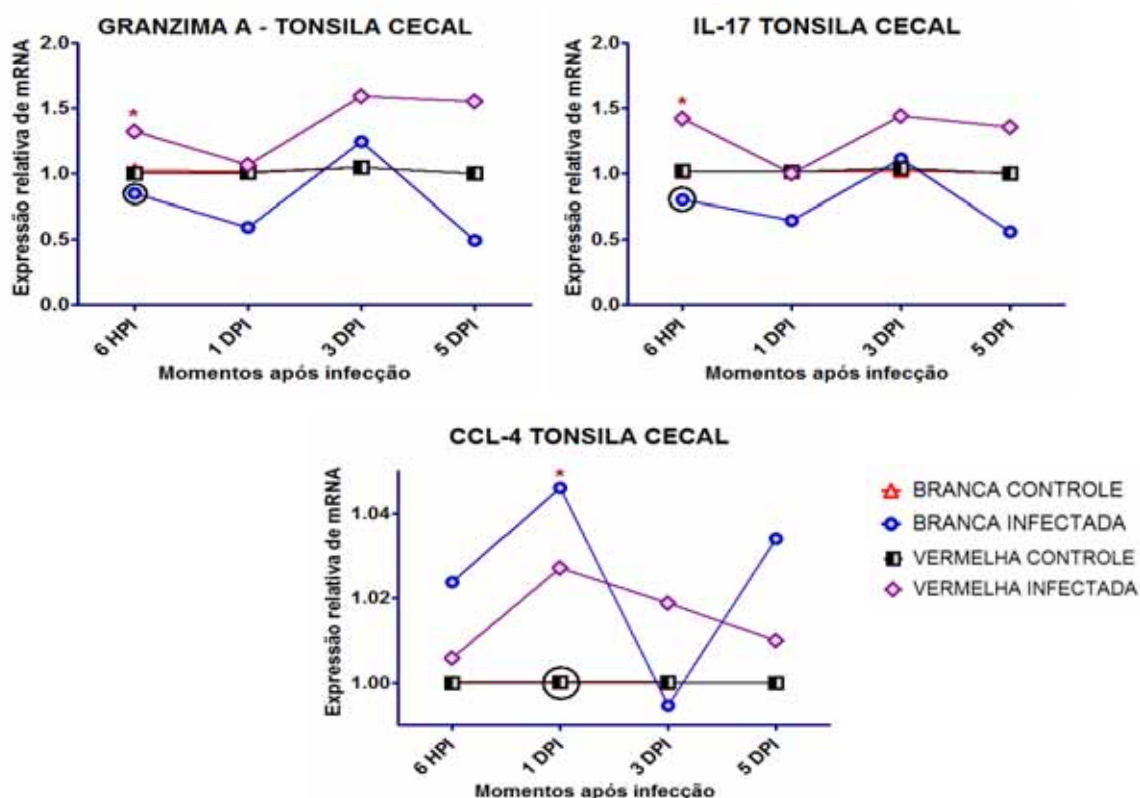


Figura 11. Médias da expressão relativa de Granzima-A, IL-17 e CCL4 em tonsila cecal nos diferentes grupos (A, B, C e D) em relação aos momentos pós-infecção (6 horas pós-infecção e 1,3 e 5 dias pós-infecção). (*) indica diferença estatística entre as médias por grupo para cada momento pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

Na Figura 12, pode-se notar que Granzima A, IL-17 e CCL4, não tiveram diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) entre os grupos, em amostras de baço. No entanto, foi observado que na expressão de CCL4, mostrou-se uma diferença na cinética entre os dois primeiros momentos após a infecção (6 hpi e 1º dpi), em relação ao 3º e 5º dpi, no qual, houve uma diminuição na produção desta citocina no baço das aves.

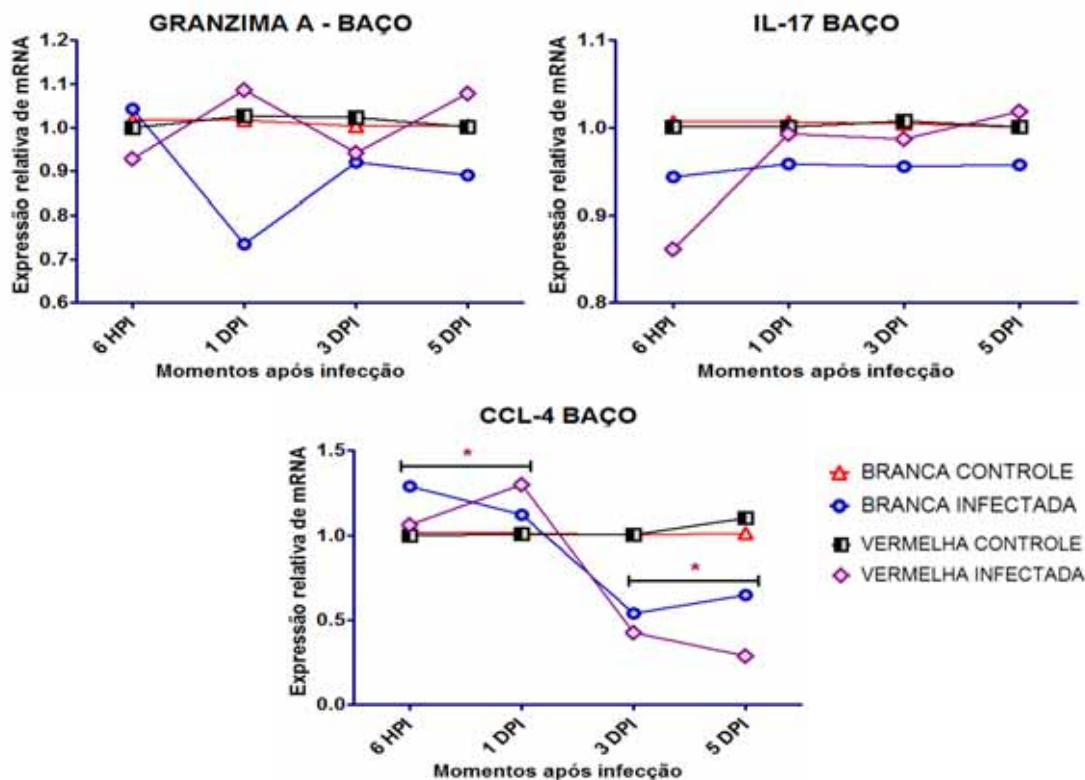


Figura 12. Médias da expressão relativa de Granzima-A, IL-17 e CCL4 em baço nos diferentes grupos (A, B, C e D) em relação aos momentos pós-infecção (6 horas pós-infecção e 1,3 e 5 dias pós-infecção). (*) indica diferença estatística entre as médias por grupo para cada momento pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

6. DISCUSSÃO

O tifo aviário é uma doença que acomete diversas espécies de aves comerciais, incluindo galinhas, codornas e perus. A progressão dos sinais clínicos em galinhas pode diferir entre as diferentes variedades. Aves de postura de variedade branca são mais resistentes ao desenvolvimento da enfermidade clínica e dificilmente observa-se mortalidade. Aves de postura de variedade vermelha e as aves pesadas, são suscetíveis ao desenvolvimento de quadros mais severos que, frequentemente culminam em elevadas taxas de mortalidade (SHIVAPRASAD; BARROW, 2008). A associação da resistência com as características genéticas das aves foi demonstrada por Bumstead e Barrow (1993).

Neste estudo, realizou-se avaliação comparativa do desenvolvimento clínico da doença e a mensuração de parâmetros da resposta imune inata, como o infiltrado de linfócitos T $\gamma\delta$ em duas variedades de aves de postura, a branca e a vermelha. Após a infecção, observou-se os sinais clínicos, registrando-se a mortalidade durante dez dias, período mais crítico no qual ocorre a infecção sistêmica aguda. Conforme os resultados descritos na Tabela 3, nenhuma ave de variedade branca morreu após a infecção. No entanto, no grupo de aves vermelhas, ocorreu mortalidade a partir do 6º dpi, atingindo 73% das aves do grupo D.

Estudos relacionados à infecção por SG em diferentes variedades de aves infectadas evidenciam que as taxas de mortalidade variam entre ambas as variedades de aves. Berchieri Júnior et al. (2000) compararam o desenvolvimento da infecção por SG em diferentes variedades de aves, demonstrando que a variedade vermelha apresentou uma mortalidade a partir do 5º e 7º dpi. Além disso, os autores sugerem que as aves de variedade branca, podem carrear o patógeno por várias semanas após a infecção, com sintomatologia diminuída. Freitas Neto et al. (2007) relataram taxas de mortalidade variáveis entre 7 a 40% em aves de variedade branca e 40 a 100% em aves de variedade vermelha.

Após a infecção, comparou-se a patogenicidade de SG em ambas as variedades de aves. Aves de variedade vermelha infectadas (grupo D) apresentaram diarreia amarelo-esverdeada, depressão e penas eriçadas; sinais comumente

observados em infecções por SG (SHIVAPRASAD, 2000; FREITAS NETO et al., 2007; SHIVAPRASAD; BARROW, 2008). No entanto, as aves de variedade branca infectadas (grupo B) não manifestaram nenhum sinal à infecção do tifo aviário.

Estudos da interação de *Salmonella* spp. com o trato digestório animal têm sido realizados em camundongos com cepas de *Salmonella* Typhimurium (STM) (JONES; GHORI; FALKOW, 1994, CLARK et al., 1994, CLARK et al. de 1996 e PENHEITER et al., 1997). Segundo esses trabalhos, a invasão de *Salmonella* spp. ocorre através dos tecidos linfoides associados ao intestino (GALT), como as placas de Peyer, em particular, as células M. O que parece claro a partir do nosso estudo (Tabela 6), é que em locais específicos como as tonsilas cecais, SG demonstrou diferença no nível de invasão, no qual, nas aves do grupo B às 6 hpi SG foi recuperada em maiores quantidades (2,15 Log₁₀ UFC/g) quando comparadas com o grupo D (1,33 Log₁₀ UFC/g), sugerindo que as tonsilas cecais são importantes locais de entrada de *Salmonella* spp. (BARROW; HUGGINS; LOVELL, 1994). Embora não seja possível afirmar, pode ser que a susceptibilidade entre as variedades de aves à invasão intestinal por *Salmonella* spp. esteja relacionada com uma competição mais efetiva com outras bactérias do intestino (BARROW; TUCKER; SIMPSON, 1987) ou uma melhor capacidade da bactéria se aderir e invadir o epitélio intestinal (SOEJARDI et al., 1982).

A capacidade de SG sobreviver dentro de células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), principalmente os macrófagos, é fundamental para o desenvolvimento da doença sistêmica no animal. No entanto, quando a bactéria se multiplica dentro destas células, desencadeia uma forte resposta inflamatória, causando lesões macroscópicas severas, notáveis principalmente no fígado e no baço (SHIVAPRASAD; BARROW, 2008). Neste estudo, SG foi recuperada do fígado e do baço em ambos os grupos (B e D) a partir do 1º dpi (Tabela 6). Contudo, foi observado que as aves brancas do grupo B, sofreram uma infecção sistêmica branda, demonstrada pela menor intensidade nas lesões macroscópicas (Tabela 5) e baixa contagem bacteriana no 3º dpi e 5º dpi. No grupo D, pode-se notar uma infecção severa, com desenvolvimento de hepatoesplenomegalia e pontos esbranquiçados puntiformes no fígado, a partir do 3º dpi. Além das alterações macroscópicas no grupo D, foi notado um aumento de sete vezes na contagem

bacteriana no fígado e baço, em relação à contagem obtida no 1º dpi neste grupo (Tabela 6). Esta diferença na contagem bacteriana, entre as duas variedades de aves infectadas sugere que o desenvolvimento do tifo aviário e o agravamento do quadro clínico, visto principalmente em aves vermelhas pode estar ligado ao fato desta bactéria conseguir se multiplicar em maior escala nesta variedade, como o observado no grupo D.

Outras lesões foram evidenciadas como alteração na coloração do fígado que variou de vermelho escuro a esverdeado sugestivo de congestão e colestase, respectivamente e, espessamento e opacidade do pericárdio. Isto pode estar relacionado com a ligação estabelecida entre o fígado e o intestino, no qual quando ocorre o desequilíbrio da flora bacteriana ou a enterotoxemia, observa-se também o aumento da atividade fagocítica das células de Kupffer, hiperplasia linfóide e hepatite. Além disso, nas alterações no coração, Didio (1985) descreve que a pericardite bacteriana, na qual apenas o pericárdio parece ter sido afetado, geralmente é resultado de uma complicação da infecção que se disseminou inicialmente pela corrente sanguínea.

De acordo com Tortora, Funke e Case (2012), as bactérias Gram-negativas contêm LPS na sua membrana externa. Este componente interage com o sistema imune do hospedeiro induzindo a inflamação, febre e até o choque séptico, dependendo da quantidade na circulação. Considerando as lesões evidenciadas nas aves do grupo D, junto com a presença de febre nestas aves no 4º dpi, sugere-se que a partir deste momento após a infecção, se iniciou o processo de sepse, devido à alta carga bacteriana nos órgãos internos.

A ocorrência de anemia é típica de infecções bacterianas como o tifo aviário (CHRISTENSEN et al., 1996; FREITAS NETO et al., 2007; GARCIA et al., 2010). Certas infecções bacterianas como as salmoneloses, podem causar anemia provocada pela destruição de hemácias (FUDGE, 2000). No presente estudo, verificou-se um aumento na contagem das hemácias nas aves do grupo D às 6 hpi e 1º dpi (Tabela 7). Estudos relacionados com alterações hematológicas em galinhas desafiadas por SG evidenciam mudanças nos parâmetros sanguíneos durante o desenvolvimento da doença (FREITAS NETO et al., 2007; GARCIA et al., 2010). Segundo esses trabalhos, constatou-se uma perda no número de hemácias durante

a fase aguda da infecção. Os resultados obtidos neste trabalho diferem de outros da literatura, uma vez que o número de hemácias aumentou nas aves experimentalmente após o desafio por SG. Além disso, não foram observadas alterações no percentual do volume globular (Tabela 7). Isto pode estar relacionado com a alta dose do inóculo e a rápida multiplicação bacteriana nas aves, causando uma infecção de alto grau de endotoxicidade, devido à presença de LPS e outros componentes inflamatórios da bactéria. Este fato também pode estar associado a uma resposta compensatória com a liberação de hemácias pelo baço, mantendo ou aumentando o número de eritrócitos na corrente sanguínea no período avaliado, conforme os resultados demonstraram.

As alterações dos teores séricos de proteína total nos animais infectados irão depender de como a doença se manifesta no organismo, de tal forma que, aumenta nos casos de uma resposta imunológica em que há produção de imunoglobulinas ou diminui nos casos de déficit de produção proteica (LATIMER, 2011). Nos grupos infectados (B e D) foram verificadas poucas alterações nos teores séricos da albumina e proteína total em relação aos grupos controles (A e C) (Tabela 8). Nas aves do grupo B, observou-se maiores quantidades das proteínas totais em relação às aves do grupo D. Esse aumento no grupo B foi procedente, pois das sete proteínas apresentadas na Tabela 8, cinco delas estão aumentadas em relação ao grupo controle (grupo A) a partir do 1º dpi. Porém, já no 3º dpi, duas proteínas apresentaram seu pico neste dia, com destaque para as proteínas de 90.000 e 99.000 Da, e transferrina, que seus valores continuaram aumentando no 3º e 5º dpi, respectivamente. Resultados semelhantes foram observados por Garcia et al. (2009) em aves de variedade vermelha infectadas por SG.

A fração proteica da pré-albumina na maioria dos mamíferos é inexistente. Em aves, os valores da pré-albumina variam de acordo com a espécie, podendo representar de 10 a 75% do valor total de albumina, ou mesmo estar ausente (CRAY; TATUM, 1998). Nos traçados densitométricos do presente trabalho, a fração da pré-albumina foi observada em 17 amostras de soro pertencentes aos quatro grupos (Figura 1A). Esta fração também foi observada em outras aves como os psitacídeos, conforme relatos descritos por Lumeij e Overduin (1990) e Lane (1991).

Nos grupos B e D, não foi verificado uma diferença estatística na cinética da albumina, porém, a partir do 1º dpi, foi observada uma diminuição desta proteína em relação aos grupos controles (A e C) (Tabela 9). As baixas concentrações de albumina (hipoalbuminemia) são um parâmetro importante para indicar uma lesão hepática, uma vez que o fígado é o único lugar onde a albumina é sintetizada (KOKOSHAROV, 2006). De acordo com Kaneko, Harvey e Bruss, (2008), durante a sepse, as proteínas de fase aguda são produzidas no fígado e por isso a síntese de albumina é diminuída. Esta redução coincide com as lesões hepáticas encontradas nos grupos B e D, como se pode observar nas Figuras 2, 3 e 5. Embora a meia vida da albumina no sangue seja superior ao período de experimento em questão, a diminuição observada na cinética desta proteína pode ter sido decorrente de sua menor síntese sugestivo de uma insuficiência hepática.

A determinação das atividades das enzimas séricas permite avaliar a funcionalidade de vários órgãos e tecidos. A elevação da concentração plasmática destas enzimas pode indicar um dano ou lesão no fígado, uma vez que a maioria destas enzimas são sintetizadas neste órgão (CAMPBELL, 2004). No entanto, um perfil normal não garante que o fígado esteja saudável (FUDGE, 2000). No presente estudo não foi verificado uma diferença estatística nos parâmetros bioquímicos séricos (ácido úrico, GGT e AST) segundo os dados apresentados na Tabela 8. Porém, não é possível afirmar que as funções hepáticas e renais permaneceram inalteradas, uma vez que a avaliação macroscópica revelou lesões nestes órgãos em ambos os grupos infectados (B e D) (Figuras 2, 3, 4, 5 e 6).

As proteínas da fase aguda (APPs) se alteram na presença de lesões teciduais, tendo participação na reparação tecidual, podendo ser positivas ou negativas quando aumentam ou diminuem, respectivamente (GRUYS et al., 2005). Quanto à transferrina, uma proteína de fase aguda negativa em mamíferos, reage como proteína positiva em aves (CRAY; TATUM, 1998). As alterações encontradas nos grupos B e D comprovam essa teoria, uma vez que a cinética desta proteína começou a aumentar a partir do 1º dpi (Tabela 9) em ambos os grupos infectados. Nas aves do grupo B, observou-se maiores quantidades no 1º e 3º dpi. Esse fato pode ser importante para a maior resistência à infecção notada nestas aves. Uma vez que *Salmonella* spp. necessita de ferro para se multiplicar, dessa forma a maior

quantidade de transferrina consegue sequestrar este íon da corrente sanguínea, diminuindo a sua disponibilidade para o patógeno. Estes resultados sugerem que as aves de variedade branca tem uma melhor resposta após a infecção no que tange a produção desta proteína no sangue. Num estudo sobre a cinética da produção de APPs em aves de postura infectadas com SG, Garcia et al. (2013) observaram diminuição nas concentrações de transferrina nas aves infectadas com a cepa mutante SG $\Delta cobS \Delta cbiA$. Ao contrário, em aves infectadas com cepas patogênicas de SG, a produção desta proteína aumentou e atingiu seu pico no 5ºdpi, decrescendo somente a partir deste momento.

Os aumentos na concentração plasmática de cobre (Cu) e de ceruloplasmina ocorrem simultaneamente no início de processos infecciosos agudos (UNDERWOOD, 2012). Isto se deve à redistribuição do Cu, do fígado para o sangue. Foi sugerido que esse processo é mediado pelos leucócitos e tem como finalidade estimular o fígado a sintetizar quantidades adicionais de ceruloplasmina, proteína que tem atividade anti-inflamatória (UNDERWOOD, 2012). Em aves e outros animais infectados com diferentes bactérias, foi observado que a cinética da ceruloplasmina aumenta 6 vezes durante o processo de infecção (HILL, 1979; KOLLER et al., 1987). No presente trabalho, os resultados obtidos demonstram que no grupo B, esta proteína foi produzida em maior quantidade em comparação ao grupo A e D no 5º dpi (Tabela 9).

As proteínas 90.000 e 99.000 Da, não possuem função definida, porém grande produção e um comportamento semelhante nos grupos B e D foi observado, demonstrando aumento nos valores durante a infecção (Tabela 9), quando comparados aos valores nos grupos A e C. Resultados semelhantes foram encontrados por Garcia et al. (2009), que obtiveram aumento destas duas proteínas em aves infectadas por SG.

Durante a resposta imune inata, a exposição aos patógenos induz à produção de citocinas e outros mediadores imunes que promovem respostas inflamatórias, dando origem à produção de proteínas da fase aguda e redistribuição dos minerais e outros nutrientes no organismo animal (JOHNSON, 1998). Haptoglobina é uma proteína plasmática de fase aguda positiva, que alcança níveis séricos máximos entre 1 e 2 dias após o início da resposta inflamatória no hospedeiro (HUNTOON et

al., 2008). Os resultados obtidos neste estudo mostram que a concentração da haptoglobina começou a aumentar a partir 3° dpi nos grupos B e D (Tabela 9), o que sugere que a resposta inflamatória ocorreu nas duas variedades de aves. No entanto, pode-se notar um melhor controle da inflamação e da febre em aves brancas, fato que pode ter contribuído para o controle da infecção nestes animais, evitando o desencadeamento da toxemia e sepse grave que ocorre em casos agudos de tifo aviário.

A função dos linfócitos T $\gamma\delta$ é pouco esclarecida. Estudos recentes que foram desenvolvidos sugerem um papel crucial dessa população de células na resposta imune inata e no desenvolvimento da resposta adaptativa, principalmente na mucosa intestinal (HOLDERNESS et al., 2013). No trabalho abordando o fenótipo de resistência ao tifo em camundongos, foi demonstrado que a resposta por linfócitos T $\alpha\beta$ (TCR2) foi crucial para a sobrevivência após a infecção, e não os linfócitos T $\gamma\delta$ (TCR1), células alvo do presente estudo (WEINTRAUB et al., 1997). Este fato pode ser atribuído à importância da resposta adaptativa para proteção contra o tifo. No entanto, em animais desprovidos de células T $\alpha\beta$ (linfócitos CD4 e CD8), os linfócitos T $\gamma\delta$ são capazes de reduzir o número de bactérias em até 10 vezes, o que sugere um importante papel das células T $\gamma\delta$ em controlar a infecção por *Salmonella* spp. (WEINTRAUB et al., 1997).

O estudo da função de linfócitos T $\gamma\delta$ durante a infecção por *Salmonella* spp. depende do modelo de infecção que é utilizado. Os modelos de infecção intestinal de curta duração dificultam a investigação sobre o papel dessas células durante a resposta inata. No entanto, em um estudo realizado por Hara et al. (1992) foi notado uma expansão no tamanho da população de linfócitos T $\gamma\delta$ durante a infecção por *Salmonella* spp. *in vitro* e *in vivo*, em pacientes humanos que haviam desenvolvido infecção sistêmica. No presente estudo, a infecção de aves por SG causou infecção sistêmica em ambas as variedades de aves. No entanto, este fato não interferiu na população de linfócitos T $\gamma\delta$ nas tonsilas cecais ou no fígado das aves (Figura 8). Este fato pode ser explicado pelo curto período após a infecção que foi avaliado e devido à participação de outras células durante a resposta inata. No entanto, pouco foi estudado sobre o papel ou o comportamento desta população de células durante a resposta imune adaptativa, que pode se desenvolver após uma infecção ou

vacinação de aves. Berndt, Pieper e Methner (2006) realizaram um estudo sobre variação do tamanho da população de linfócitos T $\gamma\delta$ em aves vacinadas e infectadas por SE. Os autores deste estudo descrevem um aumento na população de células $\gamma\delta$ após o desafio pela cepa patogênica. Estes dados sugerem um importante papel e envolvimento destas células durante a resposta imune adaptativa e vacinal, sendo estas capazes de se proliferar. No entanto, neste mesmo estudo não foi possível demonstrar se as células $\gamma\delta$ são específicas contra o antígeno de SE e se multiplicaram pelo fenômeno da expansão clonal, ou se ocorreu uma multiplicação de forma não clonal, apenas pela migração de células para o local infectado. Pode-se sugerir que esta subpopulação de linfócitos T, seja importante no combate à infecção por SG segundo os resultados obtidos na Figura 8. Além disso, estar relacionada com a resistência encontrada nas aves de variedade branca, uma vez que tiveram maiores quantidades de células imunomarcadas no início da infecção. Este fato deve-se à capacidade destas células de produzir SLC11A1, proteína envolvida na resistência à infecções intracelulares e ativação de macrófagos e linfócitos durante a resposta inata (GOMEZ et al., 2007).

Recentemente, muitos estudos têm sido realizados para investigar a produção de IL-17 por linfócitos T $\gamma\delta$ em diferentes modelos de doenças e infecções (O'BRIEN; ROARK; BORN, 2009; XU et al., 2010; SUTTON; MIELKE; MILLS, 2012). A maioria destes estudos sugere que o importante papel desempenhado por esta população em respostas imunes se deve à produção de IL-17 e citocinas relacionadas por este tipo de linfócito T $\gamma\delta$. Os resultados obtidos no presente estudo demonstram um aumento na expressão de IL-17 na tonsila cecal no grupo D (Figura 11) em relação aos outros grupos. Este aumento pode estar relacionado com a função inflamatória de IL-17, sendo capaz de atrair células imunes no local da infecção. A produção desta citocina também sugere a ocorrência de uma resposta inata para controlar a invasão bacteriana inicial, uma vez que IL-17 é capaz fortalecer as barreiras epiteliais do intestino. Levando este fato em consideração, os resultados da contagem bacteriana mostram menores quantidades de SG na tonsila cecal das aves do grupo D durante os momentos iniciais da infecção (Figura 7) quando a produção de IL-17 estava aumentada (Figura 11) neste grupo.

Quimiocinas pró-inflamatórias como CCL4, são importantes para proteção contra o tifo, devido ao seu papel quimiotático para macrófagos e células NK nos locais de inflamação. Neste estudo, observou-se uma maior produção desta quimiocina no 1º dpi em ambos os grupos infectados (B e D) na tonsila cecal, cuja expressão foi significativamente diferente no grupo B ($P < 0,05$) em relação aos grupos controles (A e C) (Figura 11), o que pode favorecer a resposta celular do tipo Th1. Estas quimiocinas podem ter um papel importante na formação de infiltrados leucocitários nos tecidos infectados por *Salmonella* spp. (RYDSTROM; WICK, 2009). No entanto, apesar do aumento na expressão relativa de CCL-4 (Figura 11) na tonsila cecal das aves do grupo B, não foi notado neste grupo uma correlação com o controle da invasão bacteriana, já que a contagem de SG estava aumentada neste local (Figura 7).

A infecção intracelular por bactérias e outros patógenos pode induzir apoptose nos macrófagos. Estudos de infecções por *Shigella flexneri*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Salmonella* Typhimurium têm descrito a indução de apoptose em macrófagos de camundongos e de seres humanos (ZYCHLINSKY et al., 1994; MONACK et al., 1996; KEANE et al., 1997; ROJAS et al., 1997). Após a infecção sistêmica, a apoptose dos linfócitos pode ser iniciada pela ausência de IL-2 ou pela liberação de granzimas ou citocinas como fator de necrose tumoral induzido por lipopolissacarídeo (LITAF) ou Fas ligante (FasL) (OBERHOLZER et al., 2001). Embora muitas pesquisas tenham sido realizadas para estudar as propriedades das granzimas na indução de morte celular, Lieberman (2003), descreve que as granzimas provavelmente também possuem funções extracelulares e estimulam a inflamação e degradação da matriz extracelular dos tecidos, permitindo assim o acesso de células citotóxicas às células alvo. No presente estudo, a infecção sistêmica ocasionada por SG, não causou diferença na expressão da granzima A em amostras de baço, entre os grupos infectados (Figura 12). No entanto, na tonsila cecal de aves do grupo D, ocorreu um aumento às 6 hpi, com diferença significativa em relação com às aves do grupo B. Embora uma limitada atividade citolítica tenha sido demonstrada no perfil da produção de granzima A na tonsila cecal em ambos os grupos infectados, deve-se lembrar que as perforinas juntamente com as granzimas, estão presentes em grânulos secretórios de linfócitos T citotóxicos. Sugerindo que

esta protease sérica esteja mantida em estoque no citoplasma dos linfócitos para sua pronta liberação durante a resposta, de forma que não seja necessário a tradução do mRNA e aumento da produção pelos linfócitos, dificultando assim a quantificação relativa desta proteína pelo método de PCR em tempo real.

De forma geral, este trabalho mostrou uma diferença no desenvolvimento do tifo aviário entre ambas às variedades de aves. Observando que as aves de variedade branca apresentaram uma maior capacidade de responder a infecção, uma vez que estas aves desenvolveram poucos sinais clínicos característicos desta doença. Ao contrário das aves de variedade vermelha, as quais não foram capazes de conter a infecção desde o início, demonstrando maior contagem bacteriana nos órgãos internos e o desenvolvimento de um quadro clínico agudo, onde a infecção se expandiu rapidamente, causando febre, processo de sepse e mortalidade.

7. CONCLUSÕES

Dentre as condições experimentais em que foi realizado o presente trabalho, concluiu-se que:

- As aves comerciais de variedade vermelha desafiadas com SG NaI^r 287/91 apresentaram quadro típico do tifo aviário, no que tange aos sinais clínicos, mortalidade. Diferente das aves de variedade branca, as quais apresentaram um melhor controle da infecção por SG e do desenvolvimento do quadro clínico.
- Nos exames macroscópicos, as aves de variedade vermelha desafiadas com SGNaI^r 287/91 apresentaram lesões macroscópicas comumente observadas em infecções do tifo aviário nos órgãos de fígado, baço e coração. Entretanto, foram verificadas lesões mais brandas nas aves de variedade branca nestes órgãos.
- As aves de variedade branca tiveram uma melhor resposta nos exames hematológicos e bioquímicos séricos, observando-se maiores quantidades nas proteínas totais, albumina, ceruloplasmina, PM=99.000 Da, PM=90.000 Da, α 1-glicoproteína ácida e transferrina.
- Linfócitos T $\gamma\delta$ estão presentes em maiores quantidades na mucosa intestinal e fígado em aves de variedade branca.

8. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. H.; PILLAI, S. Processamento e apresentação de antígeno aos linfócitos T. In: _____. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Elsevier Brasil, 2008. cap. 6, p. 113-136.

ADACHI, M.; SUEMATSU, S.; KONDO, T.; OGASAWARA, J.; TANAKA, T.; YOSHIDA, N.; NAGATA, S. Targeted mutation in the Fas gene causes hyperplasia in peripheral lymphoid organs and liver. **Nature Genetics**, New York, v. 11, n. 3, p. 294-300, 1995.

ASSOKU, R.; PENHALE, W. J. An immunological basis for the anaemia of acute *Salmonella* Gallinarum infection of chicken. II. The relationship of the immune response to the development of the haemolytic anaemia. **Clinical & Experimental Immunology**, Chichester, v. 7, n. 6, p. 875-883, 1970.

ASSOKU, R. K.; PENHALE, W. J. The pathogenesis of fowl thyphoid. The influence of anaemia and erythrocyte clearance on the susceptibility of the fowl to bacterial endotoxin. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 84, n. 4, p. 443-53, 1974.

ASSOKU, R.; PENHALE, W.; BUXTON, A. An immunological basis for the anaemia of acute *Salmonella* Gallinarum infection of chicken. I. Haematological changes and their association with in vivo modification of the erythrocytes. **Clinical & Experimental Immunology**, Chichester, v. 7, n. 6, p. 865-874, 1970a.

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

BANBURA, M.; WEBSTER, R. G.; COOPER, M.; DOHERTY, P. C. Size and frequency characteristics of alpha beta and gamma delta T cells in the spleens of normal and cyclophosphamide-suppressed virus-infected chickens. **Cellular Immunology**, Maryland Heights, v. 136, n. 1, p. 242-250, 1991.

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

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

BARROW, P. A.; TUCKER, J. F.; SIMPSON, J. M. Inhibition of colonization of the chicken alimentary tract with *Salmonella* Typhimurium gram-negative facultatively anaerobic bacteria. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 98, n. 3, p. 311-322, 1987.

BAR-SHIRA, E.; SKLAN, D.; FRIEDMAN, A. Establishment of immune competence in the avian GALT during the immediate post-hatch period. **Developmental & Comparative Immunology**, Kidlington, v. 27, n. 2, p. 147-157, 2003.

BASSET, C.; HOLTON, J.; O'MAHONY, R.; ROITT, I. Innate immunity and pathogen-host interaction. **Vaccine**, London, v. 21, suppl. 2, p. S12-S23, 2003.

BEARSON, S.; BEARSON, B.; FOSTER, J. W. Acid stress responses in enterobacteria. **FEMS Microbiology Letters**, Chichester, v. 147, n. 2, p. 173-180, 1997.

BEAUMONT, C.; PROTAIS, J.; PITEL, F.; LEVEQUE, G.; MALO, D.; LANTIER, F.; PLISSON-PETIT, F.; COLIN, P.; PROTAIS, M.; LE ROY, P.; ELSEN, J. M.; MILAN, D.; LANTIER, I.; NEAU, A.; SALVAT, G.; VIGNAL, A. Effect of two candidate genes on the *Salmonella* carrier state in fowl. **Poultry Science**, Cary, v. 82, n. 5, p. 721-726, 2003.

BERCHIERI JÚNIOR, A. Salmoneloses aviárias. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. (Ed.). **Doenças das aves**. Campinas: Facta, 2000. p.185-195.

BERCHIERI JÚNIOR, A.; FREITAS NETO, O. C. Salmoneloses aviárias. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; SILVA, E. N.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. (Ed.). **Doença das aves**. 2. ed. Campinas: Facta, 2009. p. 435-471.

BERCHIERI JÚNIOR, A.; OLIVEIRA, G. H. D.; PINHEIRO, L. A. S.; BARROW, P. A. Experimental *Salmonella* Gallinarum infection in light laying hen lines. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 1, p. 50-52, 2000.

BERNDT, A.; METHNER, U. Gamma/delta T cell response of chickens after oral administration of attenuated and non-attenuated *Salmonella* Typhimurium strains. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 78, n. 2, p. 143-161, 2001.

BERNDT, A.; PIEPER, J.; METHNER, U. Circulating gamma delta T cells in response to *Salmonella enterica* serovar Enteritidis exposure in chickens. **Infection and Immunity**, Washington, v. 74, n. 7, p. 3967-3978, 2006.

BLACKWELL, J. M.; GOSWAMI, T.; EVANS, C. A.; SIBTHORPE, D.; PAPO, N.; WHITE, J. K.; SEARLE, S.; MILLER, E. N.; PEACOCK, C. S.; MOHAMMED, H.; IBRAHIM, M. SLC11A1 (formerly NRAMP1) and disease resistance. **Cellular Microbiology**, Chichester, v. 3, n. 12, p. 773-784, 2001.

BRANDES, M.; WILLIMANN, K.; MOSER, B. Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells. **Science**, Washington, v. 309, n. 5732, p. 264-268, 2005.

BUMSTEAD, N.; BARROW, P. A. Genetics of resistance to *Salmonella* Typhimurium in newly hatched chicks. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 29, n. 3, p. 521-529, 1988.

BUMSTEAD, N.; BARROW, P. Resistance to *Salmonella* Gallinarum, *S. pullorum*, and *S. enteritidis* in inbred lines of chickens. **Avian Diseases**, Jacksonville, v. 37, n. 1, p. 189-193, 1993.

BUXTON, A. Pathological changes in the blood of chickens infected with *Salmonella* Gallinarum. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**, London, v. 70, p. 308-325, 1960.

CALENGE, F.; KAISER, P.; VIGNAL, A.; BEAUMONT, C. Genetic control of resistance to salmonellosis and to *Salmonella* carrier-state in fowl: a review. **Genetics Selection Evolution**, London, v. 42, p. 11, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1297-9686-42-11>>.

CAMPBELL, T. W. Clinical chemistry of birds. In: THRALL, M. A. (Ed.). **Veterinary hematology and clinical chemistry**. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2004. p. 479-492.

CARDOSO, A.; TESSARI, E.; CASTRO, A. Estudo hematológico em aves inoculadas com *Salmonella* Gallinarum. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 1, p. 35-42, 2003.

CASTELEYN, C.; DOOM, M.; LAMBRECHTS, E.; VAN DEN BROECK, W.; SIMOENS, P.; CORNILLIE, P. Locations of gut-associated lymphoid tissue in the 3-month-old chicken: a review. **Avian Pathology**, Abingdon, v. 39, n. 3, p. 143-150, 2010.

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

CHAUDHARI, A. A.; JAWALE, C. V.; KIM, S. W.; LEE, J. H. Construction of a *Salmonella* Gallinarum ghost as a novel inactivated vaccine candidate and its protective efficacy against fowl typhoid in chickens. **Veterinary Research**, London, v. 43, n. 1, p. 44, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1297-9716-43-44>>.

CHEESEMAN, J. H. **Avian immunology, immunogenetics, and host immune response to *Salmonella enterica* serovar enteritidis infection in chickens**. 2007. 153 Animal Science, Iowa State University

CHEN, C.-L.; PICKEL, J. M.; LATHI, J. M.; COOPER, M. D. Surface markers on avian immune cells. In: SHARMA, J. M. (Ed.). **Avian cellular immunology**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p.1-22.

CHEN, C. H.; SIX, A.; KUBOTA, T.; TSUJI, S.; KONG, F. K.; GOBEL, T. W.; COOPER, M. D. T cell receptors and T cell development. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, New York, v. 212, p. 37-53, 1996.

CHRISTENSEN, J.; BARROW, P.; OLSEN, J.; POULSEN, J.; BISGAARD, M. Correlation between viable counts of *Salmonella* Gallinarum in spleen and liver and the development of anaemia in chickens as seen in experimental fowl typhoid. **Avian Pathology**, Abingdon, v. 25, n. 4, p. 769-783, 1996.

CIOFANI, M.; ZUNIGA-PFLUCKER, J. C. Determining gammadelta versus alphass T cell development. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 10, n. 9, p. 657-663, 2010.

CLARK, M. A.; JEPSON, M. A.; SIMMONS, N. L.; HIRST, B. H. Preferential interaction of *Salmonella* Typhimurium with mouse Peyer's patch M cells. **Research in Microbiology**, Issy les Moulineaux, v. 145, p. 543-552, 1994.

CLARK, M. A.; REED, K. A.; LODGE, J.; STEPHEN, J.; HIRST, B. H.; JEPSON, M. A. Invasion of murine intestinal M cells by *Salmonella* Typhimurium inv mutants severely deficient for invasion of cultured cells. **Infection and Immunity**, Washington, v. 16, n. 10, p. 4363-4368, 1996.

COOPER, M. D.; CHEN, C. L.; BUCY, R. P.; THOMPSON, C. B. Avian T cell ontogeny. **Advances in Immunology**, Maryland Heights, v. 50, p. 87-117, 1991.

CRAY, C.; TATUM, L. M. Applications of Protein Electrophoresis in Avian Diagnostics. **Journal of Avian Medicine and Surgery**, Boca Raton, v. 12, n. 1, p. 4-10, 1998.

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**, Washington, v. 79, n. 7, p. 2755-2763, 2011.

CUA, D. J.; TATO, C. M. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 10, n. 7, p. 479-489, 2010.

CUI, Y.; SHAO, H.; LAN, C.; NIAN, H.; O'BRIEN, R. L.; BORN, W. K.; KAPLAN, H. J.; SUN, D. Major role of gamma delta T cells in the generation of IL-17+ uveitogenic T cells. **Journal of Immunology**, Amsterdam, v. 183, n. 1, p. 560-567, 2009.

DANIEL, W. W. In:_____. (Ed.). **Biostatistics: a foundation for analysis in the health sciences**. 5. ed. New York: John Wiley and Sons, 1991. p. 944.

DIDIO, L. J. A. Anatomia aplicada do pericárdio humano. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, São Paulo, v. 44, n. 6, p. 373-376, 1985.

DIELI, F.; TROYE-BLOMBERG, M.; IVANYI, J.; FOURNIE, J. J.; KRENSKY, A. M.; BONNEVILLE, M.; PEYRAT, M. A.; CACCAMO, N.; SIRECI, G.; SALERNO, A. Granulysin-dependent killing of intracellular and extracellular *Mycobacterium tuberculosis* by Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes. **Journal of Infectious Diseases**, Cary, v. 184, n. 8, p. 1082-1085, 2001.

EICHELBERGER, M.; DOHERTY, P. C. Gamma delta T cells from influenza-infected mice develop a natural killer cell phenotype following culture. **Cellular Immunology**, Maryland Heights, v. 159, n. 1, p. 94-102, 1994.

ERF, G. F. Cell-mediated immunity in poultry. **Poultry Science**, Cary, v. 83, n. 4, p. 580-590, 2004.

FAHRER, A. M.; KONIGSHOFER, Y.; KERR, E. M.; GHANDOUR, G.; MACK, D. H.; DAVIS, M. M.; CHIEN, Y. H. Attributes of gammadelta intraepithelial lymphocytes as suggested by their transcriptional profile. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 18, p. 10261-10266, 2001.

FORBES, J. R.; GROS, P. Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions. **Trends in Microbiology**, Kidlington, v. 9, n. 8, p. 397-403, 2001.

FORLOW, S. B.; SCHURR, J. R.; KOLLS, J. K.; BAGBY, G. J.; SCHWARZENBERGER, P. O.; LEY, K. Increased granulopoiesis through interleukin-17 and granulocyte colony-stimulating factor in leukocyte adhesion molecule-deficient mice. **Blood**, Washington, v. 98, n. 12, p. 3309-3314, 2001.

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

FUDGE, A. M. Avian complete blood count. . In: FUDGE, A. M. (Ed.). **Laboratory medicine: avian and exotic pets**. Collingwood:W.B. Saunders, 2000. p. 9-18.

GARCIA, K. O.; BERCHIERI JÚNIOR, A.; SANTANA, A. M.; FREITAS NETO, O. C.; FAGLIARI, J. J. Experimental infection of commercial layers using a *Salmonella enterica* serovar Gallinarum strain: Leukogram and serum acute-phase protein concentrations. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 11, n. 4, p. 263-270, 2009.

GARCIA, K. O.; SANTANA, A. M.; FREITAS NETO, O.; SIMPLÍCIO, K.; ALESSI, A. C.; BERCHIERI JÚNIOR, A.; FAGLIARI, J. J. Experimental infection of commercial layers using a *Salmonella enterica* sorovar Gallinarum strain: blood serum components and histopathological changes. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, Botucatu, v. 3, n. 2, p. 111-117, 2010.

GARCIA, K. O.; BERCHIERI JÚNIOR, A.; SANTANA, A. M.; ALARCON, M. F. F.; FREITAS NETO, O. C.; FAGLIARI, J. J. Experimental infection of commercial layers with wild or attenuated *Salmonella* Gallinarum mutant strains: anatomic pathology, total blood cell count and serum protein levels. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 91-104, 2013.

GARFAS, B.; RAMÓN, C. Importancia de los linfocitos T $\gamma\delta$ en la respuesta inmunitaria de los bovinos. **Veterinaria México**, México, v. 42, n. 1, p. 65-75, 2011.

GERTNER, J.; SCOTET, E.; POUPOT, M.; BONNEVILLE, M.; FOURNIÉ, J.-J. Lymphocytes: Gamma Delta. In: *ENCYCLOPEDIA of Life Sciences*. New York, 2007.

GIRARDI, M.; HAYDAY, A. C. Immunosurveillance by gammadelta T cells: focus on the murine system. **Chemical Immunology and Allergy**, Basel, v. 86, p. 136-150, 2005.

GOMEZ, M. A.; LI, S.; TREMBLAY, M. L.; OLIVIER, M. NRAMP-1 Expression modulates protein-tyrosine phosphatase activity in macrophages impact on host cell signaling and functions. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 282, n. 50, p. 36190-36198, 2007.

GOODMAN, T.; LEFRANCOIS, L. Expression of the gamma-delta T-cell receptor on intestinal CD8⁺ intraepithelial lymphocytes. **Nature**, London, v. 333, n. 6176, p. 855-858, 1988.

GREENWOOD, P. E.; NIKULIN, M. S. In: _____. **A guide To Chi-Squared Testing**. New York: John Wiley, 1996. p. 280.

GRIMONT, P. A.; WEILL, F.-X. **Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars**. Paris: Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, 2007.

GROH, V.; PORCELLI, S.; FABBI, M.; LANIER, L. L.; PICKER, L. J.; ANDERSON, T.; WARNKE, R. A.; BHAN, A. K.; STROMINGER, J. L.; BRENNER, M. B. Human lymphocytes bearing T cell receptor gamma/delta are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 169, n. 4, p. 1277-1294, 1989.

GRUYS, E.; TOUSSAINT, M. J. M.; NIEWOLD, T. A.; KOOPMANS, S. J. Review: Acute phase reaction and acute phase proteins. **Journal of Zhejiang University. Science B**, London, v. 6, n. 11, p. 1045-1056, 2005.

GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P. I.; BOCKEMÜHL, J.; GRIMONT, P. A.; WEILL, F.-X. Supplement 2003–2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, Issy les Moulineaux, v. 161, n. 1, p. 26-29, 2010.

HAAS, W.; PEREIRA, P.; TONEGAWA, S. Gamma/delta cells. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 11, p. 637-685, 1993.

HAAS, J. D.; RAVENS, S.; DUBER, S.; SANDROCK, I.; OBERDORFER, L.; KASHANI, E.; CHENNUPATI, V.; FOHSE, L.; NAUMANN, R.; WEISS, S.; KRUEGER, A.; FORSTER, R.; PRINZ, I. Development of interleukin-17-producing gammadelta T cells is restricted to a functional embryonic wave. **Immunity**, Cambridge, v. 37, n. 1, p. 48-59, 2012.

HAMADA, S.; UMEMURA, M.; SHIONO, T.; TANAKA, K.; YAHAGI, A.; BEGUM, M. D.; OSHIRO, K.; OKAMOTO, Y.; WATANABE, H.; KAWAKAMI, K.; ROARK, C.; BORN, W. K.; O'BRIEN, R.; IKUTA, K.; ISHIKAWA, H.; NAKAE, S.; IWAKURA, Y.; OHTA, T.; MATSUZAKI, G. IL-17A produced by gammadelta T cells plays a critical role in innate immunity against *Listeria monocytogenes* infection in the liver. **Journal of Immunology**, Amsterdam, v. 181, n. 5, p. 3456-3463, 2008.

HAPPEL, K. I.; ZHENG, M.; YOUNG, E.; QUINTON, L. J.; LOCKHART, E.; RAMSAY, A. J.; SHELLITO, J. E.; SCHURR, J. R.; BAGBY, G. J.; NELSON, S.; KOLLS, J. K. Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to *Klebsiella pneumoniae* infection. **Journal of Immunology**, Amsterdam, v. 170, n. 9, p. 4432-4436, 2003.

HARA, T.; MIZUNO, Y.; TAKAKI, K.; TAKADA, H.; AKEDA, H.; AOKI, T.; NAGATA, M.; UEDA, K.; MATSUZAKI, G.; YOSHIKAI, Y. Predominant activation and expansion of V gamma 9-bearing gamma delta T cells in vivo as well as in vitro in *Salmonella* infection. **Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 90, n. 1, p. 204, 1992.

HAYDAY, A. C. [gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 18, p. 975-1026, 2000.

HEIN, W. R.; DUDLER, L. TCR gamma delta+ cells are prominent in normal bovine skin and express a diverse repertoire of antigen receptors. **Immunology**, Chichester, v. 91, n. 1, p. 58-64, 1997.

HILL, C. H. Dietary influences on resistance to *Salmonella* infection in chicks. **Federation Proceedings**, [S.I.], v. 38, n. 7, p. 2129-2133, 1979.

HOLDERNESS, J.; HEDGES, J. F.; RAMSTEAD, A.; JUTILA, M. A. Comparative biology of $\gamma\delta$ T cell function in humans, mice, and domestic animals. **Annual Review of Animal Biosciences**, Palo Alto, v. 1, p. 99-124, 2013.

HU, J.; BUMSTEAD, N.; BARROW, P.; SEBASTIANI, G.; OLIEN, L.; MORGAN, K.; MALO, D. Resistance to salmonellosis in the chicken is linked to NRAMP1 and TNC. **Genome Research**, Woodbury, v. 7, n. 7, p. 693-704, 1997.

HUNTOON, K. M.; WANG, Y.; EPPOLITO, C. A.; BARBOUR, K. W.; BERGER, F. G.; SHRIKANT, P. A.; BAUMANN, H. The acute phase protein haptoglobin regulates host immunity. **Journal of Leukocyte Biology**, Bethesda, v. 84, n. 1, p. 170-181, 2008.

JAMESON, J.; HAVRAN, W. L. Skin gammadelta T-cell functions in homeostasis and wound healing. **Immunology Reviews**, Malden, v. 215, p. 114-122, 2007.

JEONG, J. H.; SONG, M.; PARK, S. I.; CHO, K. O.; RHEE, J. H.; CHOY, H. E. *Salmonella enterica* serovar Gallinarum requires ppGpp for internalization and survival in animal cells. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 190, n. 19, p. 6340-6350, 2008.

JOHNSON, R. W. Immune and endocrine regulation of food intake in sick animals. **Domestic Animal Endocrinology**, Philadelphia, v. 15, n. 5, p. 309-319, 1998.

JONES, B. D.; GHORI, N.; FALKOW, S. *Salmonella* Typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 180, n. 1, p. 15-23, 1994.

KAHN, C. M.; LINE, S. Poultry: Salmonellosis. **The Merck Veterinary Manual**. Wiley, 2010. Disponível em: <<http://books.google.com.br/books?id=HnvpMQAACAAJ>>. Acesso em: 18 ago. 2013.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6. ed. New York: Academic Press, 2008. p. 916.

KEANE, J.; BALCEWICZ-SABLINSKA, M. K.; REMOLD, H. G.; CHUPP, G. L.; MEEK, B. B.; FENTON, M. J.; KORNFELD, H. Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 65, n. 1, p. 298-304, 1997.

KELLY, M. N.; KOLLS, J. K.; HAPPEL, K.; SCHWARTZMAN, J. D.; SCHWARZENBERGER, P.; COMBE, C.; MORETTO, M.; KHAN, I. A. Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against *Toxoplasma gondii* infection. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, n. 1, p. 617-621, 2005.

KIMIZUKA, Y.; KIMURA, S.; SAGA, T.; ISHII, M.; HASEGAWA, N.; BETSUYAKU, T.; IWAKURA, Y.; TATEDA, K.; YAMAGUCHI, K. Roles of interleukin-17 in an experimental *Legionella pneumophila* pneumonia model. **Infection and Immunity**, Washington, v. 80, n. 3, p. 1121-1127, 2012.

KINDT, T. J.; GOLDSBY, R. A.; OSBORNE, B. A. Inmunidad Innata. In: _____. (Ed.). **Inmunología de Kuby**. 6. ed. México: McGraw Hill, 2007. cap. 3, p. 51-74.

KISIELOW, J.; KOPF, M.; KARJALAINEN, K. SCART scavenger receptors identify a novel subset of adult gammadelta T cells. **Journal of Immunology**, Amsterdam, v. 181, n. 3, p. 1710-1716, 2008.

KOIZUMI, H.; LIU, C. C.; ZHENG, L. M.; JOAG, S. V.; BAYNE, N. K.; HOLOSHITZ, J.; YOUNG, J. D. Expression of perforin and serine esterases by human gamma/delta T cells. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 173, n. 2, p. 499-502, 1991.

KOKOSCHAROV, T. Changes in the protein profile in birds with experimental acute fowl typhoid. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, Stara Zagora, v. 9, p. 189-192, 2006.

KOLLER, L. D.; MULHERN, S. A.; FRANKEL, N. C.; STEVEN, M. G.; WILLIAMS, J. R. Immune dysfunction in rats fed a diet deficient in copper. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 45, n. 5, p. 997-1006, 1987.

KONIGSHOFER, Y.; CHIEN, Y. H. Gammadelta T cells - innate immune lymphocytes? **Current Opinion in Immunology**, Kidlington, v. 18, n. 5, p. 527-533, 2006.

LAHTI, J. M.; CHEN, C. L.; SOWDER, J. T.; BUCY, R. P.; COOPER, M. D. Characterization of the avian T cell receptor. **Immunologic Research**, Totowa, v. 7, n. 4, p. 303-317, 1988.

LAMONT, S. J.; KAISER, M. G.; LIU, W. Candidate genes for resistance to *Salmonella* Enteritidis colonization in chickens as detected in a novel genetic cross. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 87, n. 3-4, p. 423-428, 2002.

LANE, R. Basic techniques in pet avian clinical pathology. **The Veterinary clinics of North America Small Animal Practice**, Maryland Heights, v. 21, n. 6, p. 1157-1179, 1991.

LATIMER, K. S. Proteins, lipids, and carbohydrates. In: _____. (Ed.). **Duncan and Prasse's veterinary laboratory medicine: clinical pathology**. 5. ed. [S.l.]: John Wiley Sons, 2011. cap. 6, p. 524.

LI, Z.; ZHANG, C.; ZHOU, Z.; ZHANG, J.; TIAN, Z. Small intestinal intraepithelial lymphocytes expressing CD8 and T cell receptor gammadelta are involved in bacterial clearance during *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. **Infection and Immunity**, Washington, v. 80, n. 2, p. 565-74, 2012.

LIEBERMAN, J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 3, n. 5, p. 361-370, 2003.

LILLARD JR, J. W.; SINGH, U. P.; BOYAKA, P. N.; SINGH, S.; TAUB, D. D.; MCGHEE, J. R. MIP-1alpha and MIP-1beta differentially mediate mucosal and systemic adaptive immunity. **Blood**, Washington, v. 101, n. 3, p. 807-814, 2003.

LILLEHOJ, H. S.; TROUT, J. M. Avian gut-associated lymphoid tissues and intestinal immune responses to *Eimeria* parasites. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 9, n. 3, p. 349-360, 1996.

LIU, W.; KAISER, M. G.; LAMONT, S. J. Natural resistance-associated macrophage protein 1 gene polymorphisms and response to vaccine against or challenge with *Salmonella* Enteritidis in young chicks. **Poultry Science**, Cary, v. 82, n. 2, p. 259-266, 2003.

LOCKHART, E.; GREEN, A. M.; FLYNN, J. L. IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Journal of Immunology**, Amsterdam, v. 177, n. 7, p. 4662-4669, 2006.

LUMEIJ, J. T. Avian clinical biochemistry. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W. (Ed.). **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997. cap. 30, p. 857-883.

LUMEIJ, J. T.; OVERDUIN, L. M. Plasma chemistry references values in psittaciformes. **Avian Pathology**, Abingdon, v. 19, n. 2, p. 235-244, 1990.

MACKAY, C. R.; HEIN, W. R. Analysis of gamma delta T cells in ruminants reveals further heterogeneity in gamma delta T-cell features and function among species. **Research in Immunology**, Issy les Moulineaux, v. 141, n. 7, p. 611-614, 1990.

MATTAPALLIL, J. J.; SMIT-MCBRIDE, Z.; MCCHESENEY, M.; DANDEKAR, S. Intestinal intraepithelial lymphocytes are primed for gamma interferon and MIP-1beta expression and display antiviral cytotoxic activity despite severe CD4(+) T-cell depletion in primary simian immunodeficiency virus infection. **Journal of Virology**, Washington, v. 72, n. 8, p. 6421-6429, 1998.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. Innate Immunity. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 343, n. 5, p. 338-344, 2000.

MEEKS, K. D.; SIEVE, A. N.; KOLLS, J. K.; GHILARDI, N.; BERG, R. E. IL-23 is required for protection against systemic infection with *Listeria monocytogenes*. **Journal of Immunology**, Amsterdam, v. 183, n. 12, p. 8026-34, 2009.

MERKLE, H.; CIHAK, J.; LOSCH, U. The cytotoxic T lymphocyte response in reticuloendotheliosis virus-infected chickens is mediated by alpha beta and not by gamma delta T cells. **Immunobiology**, Jena, v. 186, n. 3-4, p. 292-303, 1992.

METKAR, S. S.; MENAA, C.; PARDO, J.; WANG, B.; WALLICH, R.; FREUDENBERG, M.; KIM, S.; RAJA, S. M.; SHI, L.; SIMON, M. M.; FROELICH, C. J. Human and mouse granzyme A induce a proinflammatory cytokine response. **Immunity**, Cambridge, v. 29, n. 5, p. 720-733, 2008.

MEYER, D. L.; COLES, E. H.; RICH, L. J. **Medicina de laboratório veterinária: interpretação e diagnóstico**. São Paulo: Roca, 1995. 320 p.

MICHEL, M. L.; KELLER, A. C.; PAGET, C.; FUJIO, M.; TROTTEIN, F.; SAVAGE, P. B.; WONG, C. H.; SCHNEIDER, E.; DY, M.; LEITE-DE-MORAES, M. C. Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 204, n. 5, p. 995-1001, 2007.

MODLIN, R. L.; SIELING, P. A. Immunology. Now presenting: gammadelta T cells. **Science**, Washington, v. 309, n. 5732, p. 252-253, 2005.

MOGENSEN, T. H. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 22, n. 2, p. 240-273, 2009.

MONACK, D. M.; RAUPACH, B.; HROMOCKYJ, A. E.; FALKOW, S. *Salmonella* Typhimurium invasion induces apoptosis in infected macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 18, p. 9833-9838, 1996.

MOSLEH, N.; NAZIFI, S.; ALAEDDINI, A. Changes in serum acute phase reactants, inflammatory mediators and gangliosides in Japanese quail (*Coturnix japonica*) with retained yolk sac. **Pakistan Veterinary Journal**, Faisalabad, v. 32, n. 2, p. 251-254, 2011.

MURDOCH, J. R.; LLOYD, C. M. Resolution of allergic airway inflammation and airway hyperreactivity is mediated by IL-17-producing gamma delta T cells. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 182, n. 4, p. 464-476, 2010.

NAGATA, S.; GOLSTEIN, P. The Fas death factor. **Science**, Washington, v. 267, n. 5203, p. 1449-1456, 1995.

NAKATA, M.; SMYTH, M. J.; NORIHISA, Y.; KAWASAKI, A.; SHINKAI, Y.; OKUMURA, K.; YAGITA, H. Constitutive expression of pore-forming protein in peripheral blood gamma/delta T cells: implication for their cytotoxic role in vivo. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 172, n. 6, p. 1877-1880, 1990.

NATT, M. P.; HERRICK, C. A. A New Blood Diluent for Counting the Erythrocytes and Leucocytes of the Chicken. **Poultry Science**, Cary, v. 31, n. 4, p. 735-738, 1952.

OBERHOLZER, C.; OBERHOLZER, A.; CLARE-SALZLER, M.; MOLDAWER, L. L. Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 15, n. 6, p. 879-892, 2001.

O'BRIEN, R. L.; ROARK, C. L.; BORN, W. K. IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 39, n. 3, p. 662-666, 2009.

OIE. Organization International des Epizooties. **World animal health information database (WAHID)**. 2012. Disponível em: <http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail>. Acesso em: 19 dez. 2013.

PASSMORE, J. S.; GLASHOFF, R. H.; LUKEY, P. T.; RESS, S. R. Granule-dependent cytolysis of *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages by human gammadelta+ T cells has no effect on intracellular mycobacterial viability. **Clinical & Experimental Immunology**, Chichester, v. 126, n. 1, p. 76-83, 2001.

PENHA FILHO, R. A.; FREITAS NETO, O. C.; BERCHIERI JUNIOR, A. **Imunidade das aves contra Salmoneloses**. AVEWORLD: 132 p. 2013.

PENHEITER, K. L.; MATHUR, N.; GILES, D.; FAHLEN, T.; JONES, B. D. Non-invasive *Salmonella* Typhimurium mutants are avirulent because of an inability to enter and destroy M cells of ileal Peyer's patches. **Molecular Microbiology**, Chichester, v. 24, n. 4, p. 697-709, 1997.

PIEPER, J.; METHNER, U.; BERNDT, A. Heterogeneity of avian gammadelta T cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 124, n. 3-4, p. 241-252, 2008.

PIEPER, J.; METHNER, U.; BERNDT, A. Characterization of avian gammadelta T-cell subsets after *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection of chicks. **Infection and Immunity**, Washington, v. 79, n. 2, p. 822-829, 2011.

POPOFF, M. Y.; BOCKEMUHL, J.; BRENNER, F. W.; GHEESLING, L. L. Supplement 2000 (no. 44) to the Kauffmann-White scheme. **Research in Microbiology**, Issy les Moulineaux, v. 152, n. 10, p. 907-909, 2001.

QIN, G.; MAO, H.; ZHENG, J.; SIA, S. F.; LIU, Y.; CHAN, P. L.; LAM, K. T.; PEIRIS, J. S.; LAU, Y. L.; TU, W. Phosphoantigen-expanded human gammadelta T cells display potent cytotoxicity against monocyte-derived macrophages infected with human and avian influenza viruses. **Journal of Infectious Diseases**, Cary, v. 200, n. 6, p. 858-865, 2009.

RESCIGNO, M.; URBANO, M.; VALZASINA, B.; FRANCOLINI, M.; ROTTA, G.; BONASIO, R.; GRANUCCI, F.; KRAEHENBUHL, J. P.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. **Nature Immunology**, New York, v. 2, n. 4, p. 361-367, 2001.

ROARK, C. L.; SIMONIAN, P. L.; FONTENOT, A. P.; BORN, W. K.; O'BRIEN, R. L. gammadelta T cells: an important source of IL-17. **Current Opinion in Immunology**, Kidlington, v. 20, n. 3, p. 353-357, 2008.

ROJAS, M.; BARRERA, L. F.; PUZO, G.; GARCIA, L. F. Differential induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in resistant and susceptible murine macrophages: role of nitric oxide and mycobacterial products. **The Journal of Immunology**, Amsterdam, v. 159, n. 3, p. 1352-1361, 1997.

RYDSTROM, A; WICK, M. J. Monocyte and neutrophil recruitment during oral *Salmonella* infection is driven by MyD88-derived chemokines. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 39, n. 11, p. 3019-3030, 2009.

SCHMIDT, E.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; SANTIN, E.; PAULILLO, A. Patologia clínica em aves de produção—uma ferramenta para monitorar a sanidade avícola—revisão. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 12, n. 3, p. 9-20, 2007.

SCHULZ, S. M.; KOHLER, G.; HOLSCHER, C.; IWAKURA, Y.; ALBER, G. IL-17A is produced by Th17, gammadelta T cells and other CD4- lymphocytes during infection with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and has a mild effect in bacterial clearance. **International Immunology**, Oxford, v. 20, n. 9, p. 1129-1138, 2008.

SETTA, A. M.; BARROW, P. A.; KAISER, P.; JONES, M. A. Early immune dynamics following infection with *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Infantis, Pullorum and Gallinarum: cytokine and chemokine gene expression profile and cellular changes of chicken cecal tonsils. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, London, v. 35, n. 5, p. 397-410, 2012.

SHAH, S. N.; KAMIL, S. A.; DARZI, M. M.; MIR, M. S.; BHAT, S. A. Haematological and some biochemical changes in experimental fowl typhoid infection in broiler chickens. **Comparative Clinical Pathology**, Guildford, v. 22, n. 1, p. 83-91, 2013.

SHEN, Y.; ZHOU, D.; QIU, L.; LAI, X.; SIMON, M.; SHEN, L.; KOU, Z.; WANG, Q.; JIANG, L.; ESTEP, J.; HUNT, R.; CLAGETT, M.; SEHGAL, P. K.; LI, Y.; ZENG, X.; MORITA, C. T.; BRENNER, M. B.; LETVIN, N. L.; CHEN, Z. W. Adaptive immune response of Vgamma2Vdelta2+ T cells during mycobacterial infections. **Science**, Washington, v. 295, n. 5563, p. 2255-2258, 2002.

SHIBATA, K.; YAMADA, H.; HARA, H.; KISHIHARA, K.; YOSHIKAI, Y. Resident Vdelta1+ gammadelta T cells control early infiltration of neutrophils after *Escherichia coli* infection via IL-17 production. **Journal of Immunology**, Amsterdam, v. 178, n. 7, p. 4466-4472, 2007.

SHIRES, J.; THEODORIDIS, E.; HAYDAY, A. C. Biological insights into TCRgammadelta+ and TCRalphabeta+ intraepithelial lymphocytes provided by serial analysis of gene expression (SAGE). **Immunity**, Cambridge, v. 15, n. 3, p. 419-434, 2001.

SHIVAPRASAD, H. L. Fowl typhoid and pullorum disease. **Revue Scientifique et Technique**, Paris, v. 19, n. 2, p. 405-424, 2000.

SHIVAPRASAD, H. L.; BARROW, P. A. Salmonella infections. In: SAIF, Y. M.; FADLY, A. M. **Diseases of poultry**. 12. ed. Ames, 2008. cap. 16, p. 620-636.

SIEGEMUND, S.; SCHUTZE, N.; SCHULZ, S.; WOLK, K.; NASILOWSKA, K.; STRAUBINGER, R. K.; SABAT, R.; ALBER, G. Differential IL-23 requirement for IL-22 and IL-17A production during innate immunity against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **International Immunology**, Oxford, v. 21, n. 5, p. 555-565, 2009.

SMITH, A. L.; GOBEL, T. W. Avian T Cells: antigen recognition and lineages. In: SCHAT, K. A.; KASPERS, B. (Ed.). **Avian immunology**. [S. l.]: Elsevier Science, 2012. cap. 5, p. 91-102.

SOEJARDI, A. S.; RUFNER, R.; SNOEYENBOS, G. H.; WEINACK, O. M. Adherence of Salmonellae and native gut microflora to the gastrointestinal mucosa of chicks. **Avian Diseases**, Jacksonville, v. 26, n. 3, p. 576-584, 1982.

SOWDER, J. T.; CHEN, C. L.; AGER, L. L.; CHAN, M. M.; COOPER, M. D. A large subpopulation of avian T cells express a homologue of the mammalian T gamma/delta receptor. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 167, n. 2, p. 315-322, 1988.

STINCHCOMBE, J. C.; BOSSI, G.; BOOTH, S.; GRIFFITHS, G. M. The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. **Immunity**, Cambridge, v. 15, n. 5, p. 751-761, 2001.

STOBER, C. B.; BRODE, S.; WHITE, J. K.; POPOFF, J. F.; BLACKWELL, J. M. Slc11a1, formerly Nramp1, is expressed in dendritic cells and influences major histocompatibility complex class II expression and antigen-presenting cell function. **Infection and Immunity**, Washington, v. 75, n. 10, p. 5059-5067, 2007.

SUTTON, C. E.; MIELKE, L. A.; MILLS, K. H. G. IL-17 producing $\gamma\delta$ T cells and innate lymphoid cells. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 42, n. 9, p. 2221-2231, 2012.

TANG, W. R.; SHIOYA, N.; EGUCHI, T.; EBATA, T.; MATSUI, J.; TAKENOUCHI, H.; HONMA, D.; YASUE, H.; TAKAGAKI, Y.; ENOSAWA, S.; ITAGAKI, M.; TAGUCHI, T.; KIYOKAWA, N.; AMEMIYA, H.; FUJIMOTO, J. Characterization of new monoclonal antibodies against porcine lymphocytes: molecular characterization of clone 7G3, an antibody reactive with the constant region of the T-cell receptor delta-chains. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 103, n. 1-2, p. 113-127, 2005.

TAUB, D. D.; SAYERS, T. J.; CARTER, C. R.; ORTALDO, J. R. Alpha and beta chemokines induce NK cell migration and enhance NK-mediated cytotoxicity. **Journal of Immunology**, Amsterdam, v. 155, n. 8, p. 3877-3888, 1995.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Doenças Microbianas do Sistema Digestório. **Microbiologia**. 10. ed. [S. l.]: Artmed Editora, 2012. cap. 25, p. 584-765.

TULLY, T. N.; DORRESTEIN, G. M.; JONES, A. K. O exame físico. **Clínica de aves**. 2. ed. [S. l.]: Elsevier Health Sciences Editora, 2011. cap. 3.

TRAPANI, J. A. Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases. **Genome Biology**, London, v. 2, n. 12, p. 3014, 2001.

UNDERWOOD, E. J. **Trace elements in human and animal nutrition**. 4. ed. New York: Academic Press 2012. cap. 3, p. 66-67.

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

VAN ASTEN, A. J.; KONINKX, J. F.; VAN DIJK, J. E. *Salmonella* entry: M cells versus absorptive enterocytes. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 108, n. 1-2, p. 149-152, 2005.

VIDAL, S. M.; MALO, D.; VOGAN, K.; SKAMENE, E.; GROS, P. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. **Cell**, Cambridge, v. 73, n. 3, p. 469-485, 1993.

VIDAL, S. M.; TREMBLAY, M. L.; GOVONI, G.; GAUTHIER, S.; SEBASTIANI, G.; MALO, D.; SKAMENE, E.; OLIVIER, M.; JOTHY, S.; GROS, P. The Ity/Lsh/Bcg locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the Nramp1 gene. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 182, n. 3, p. 655-666, 1995.

VINEY, J.; MACDONALD, T. T.; SPENCER, J. Gamma/delta T cells in the gut epithelium. **Gut**, London, v. 31, n. 8, p. 841-844, 1990.

WEBER, K.; OSBORN, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 244, n. 16, p. 4406-4412, 1969.

WEINTRAUB, B. C.; ECKMANN, L.; OKAMOTO, S.; HENSE, M.; HEDRICK, S. M.; FIERER, J. Role of alphabeta and gammadelta T cells in the host response to *Salmonella* infection as demonstrated in T-cell-receptor-deficient mice of defined Ity genotypes. **Infection and Immunity**, Washington, v. 65, n. 6, p. 2306-2312, 1997.

WIGLEY, P.; HULME, S. D.; BUMSTEAD, N.; BARROW, P. A. In vivo and in vitro studies of genetic resistance to systemic salmonellosis in the chicken encoded by the SAL1 locus. **Microbes and Infection**, Issy les Moulineaux, v. 4, n. 11, p. 1111-1120, 2002.

WIGLEY, P.; HULME, S.; ROTHWELL, L.; BUMSTEAD, N.; KAISER, P.; BARROW, P. Macrophages isolated from chickens genetically resistant or susceptible to systemic salmonellosis show magnitudinal and temporal differential expression of cytokines and chemokines following *Salmonella enterica* challenge. **Infection and Immunity**, Washington, v. 74, n. 2, p. 1425-1430, 2006.

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

XU, S.; HAN, Y.; XU, X.; BAO, Y.; ZHANG, M.; CAO, X. IL-17A–Producing $\gamma\delta$ T Cells Promote CTL Responses against *Listeria monocytogenes* infection by enhancing dendritic cell cross-presentation. **The Journal of Immunology**, Amsterdam, v. 185, n. 10, p. 5879-5887, 2010.

ZANCAN, F. T.; BERCHIERI JUNIOR, A.; FERNANDES, S. A.; GAMA, N. M. S. Q. *Salmonella* spp. investigation in transport boxes of day-old birds. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 31, p. 229-232, 2000.

ZHAO, H.; NGUYEN, H.; KANG, J. Interleukin 15 controls the generation of the restricted T cell receptor repertoire of gamma delta intestinal intraepithelial lymphocytes. **Nature Immunology**, New York, v. 6, n. 12, p. 1263-1271, 2005.

ZYCHLINSKY, A.; KENNY, B.; MÉNARD, R.; PRÉVOST, M. C.; HOLLAND, I. B.; SANSONETTI, P. J. IpaB mediates macrophage apoptosis induced by *Shigella flexneri*. **Molecular Microbiology**, Chichester, v. 11, n. 4, p. 619-627, 1994.

APÊNDICES

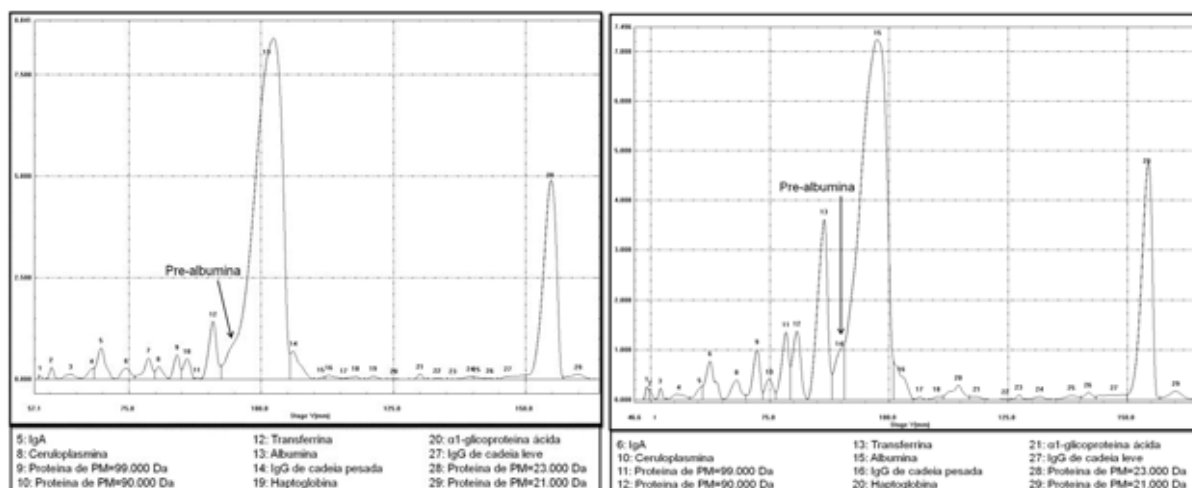


Figura 1A. Exemplo do traçado eletroforético do proteinograma sérico de ave sem infecção (esquerda) e de ave infectada (direita) experimentalmente com SG NaI^r 287/91, mostrando as 12 frações de proteínas selecionadas neste estudo.

Tabela 1A. Média e desvio padrão dos teores séricos de quatro frações proteicas (mg/dL) obtidas por fracionamento em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de aves comerciais de variedade branca e vermelha infectadas experimentalmente por SG NaI^r 287/91.

Proteínas	6 HPI	1 DPI	3 DPI	5 DPI
IgA	V. Ref			
Grupo A (controle)	73,71 ± 8,97 ^{aA}	59,82 ± 10,65 ^{aA}	72,80 ± 6,97 ^{aA}	58,05 ± 6,19 ^{abA}
Grupo B	68,42 ± 7,55 ^{aA}	76,65 ± 8,34 ^{aA}	81,99 ± 11,13 ^{aA}	71,42 ± 11,45 ^{aA}
Grupo C (controle)	53,16 ± 16,85 ^{aA}	53,90 ± 10,65 ^{aA}	62,25 ± 8,00 ^{aA}	65,73 ± 4,54 ^{abA}
Grupo D	62,73 ± 9,50 ^{aA}	62,22 ± 14,62 ^{aA}	66,11 ± 5,13 ^{aA}	49,44 ± 1,28 ^{ba}
IgG total	V. Ref			
Grupo A (controle)	107,99 ± 18,72 ^{aA}	94,88 ± 13,54 ^{aA}	86,07 ± 8,34 ^{aA}	89,76 ± 15,57 ^{ba}
Grupo B	107,70 ± 24,48 ^{aA}	95,90 ± 0,89 ^{aA}	190,71 ± 160,32 ^{aA}	125,58 ± 34,04 ^{abA}
Grupo C (controle)	95,91 ± 20,44 ^{aA}	93,57 ± 18,34 ^{aA}	97,22 ± 3,31 ^{aA}	123,78 ± 23,19 ^{abA}
Grupo D	104,05 ± 2,91 ^{aA}	102,39 ± 23,91 ^{aA}	116,13 ± 31,58 ^{aA}	212,15 ± 54,24 ^{aA}
23.000 Da	V. Ref			
Grupo A (controle)	623,02 ± 96,43 ^{aA}	616,55 ± 27,83 ^{aA}	548,90 ± 33,28 ^{aA}	533,01 ± 59,15 ^{aA}
Grupo B	619,37 ± 29,42 ^{aA}	649,65 ± 42,76 ^{aA}	600,89 ± 40,18 ^{aA}	534,61 ± 95,94 ^{aA}
Grupo C (controle)	508,94 ± 59,33 ^{aA}	503,95 ± 91,21 ^{aA}	514,94 ± 21,74 ^{aA}	519,46 ± 44,74 ^{aA}
Grupo D	558,79 ± 36,97 ^{aA}	604,19 ± 85,58 ^{aA}	490,50 ± 101,25 ^{aA}	359,01 ± 65,63 ^{aA}
21.000 Da	V. Ref			
Grupo A (controle)	20,61 ± 6,94 ^{abAB}	20,92 ± 1,16 ^{aA}	19,16 ± 2,51 ^{baB}	21,09 ± 4,43 ^{ab}
Grupo B	22,44 ± 3,49 ^{ca}	20,42 ± 5,04 ^{aA}	27,45 ± 1,45 ^{abAB}	28,40 ± 11,03 ^{ab}
Grupo C (controle)	19,13 ± 6,41 ^{ba}	21,75 ± 0,41 ^{aA}	20,45 ± 4,88 ^{aA}	25,23 ± 4,23 ^{aA}
Grupo D	23,01 ± 0,57 ^{aA}	19,10 ± 4,84 ^{aA}	19,93 ± 4,83 ^{aA}	28,61 ± 8,87 ^{aA}

A= Grupo controle negativo das aves de variedade branca; B= Grupo de aves de variedade branca desafiadas oralmente com SG; C= Grupo controle negativo das aves de variedade vermelha; D= Grupo de aves de variedade vermelha desafiadas oralmente com SG. HPI= horas pós infecção; DPI= dias pós a infecção. Médias seguidas por letras minúsculas foram comparadas na mesma coluna e por letras maiúsculas foram comparadas na mesma linha pelo teste de Tukey (p<0,05).