

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**INFECÇÃO DE AVES (*Gallus gallus domesticus*) COM
Salmonella enterica SUBESP. *enterica* SOROVAR
Enteritidis CONTENDO DELEÇÕES NOS GENES *cobS*,
cbiA, *pduC*, *pduD* E *pduE*: AVALIAÇÃO DA COLONIZAÇÃO
INTESTINAL, INVASÃO SISTÊMICA E RESPOSTA IMUNE**

Janine Denadai
Médica Veterinária

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**INFECÇÃO DE AVES (*Gallus gallus domesticus*) COM
Salmonella enterica SUBESP. *enterica* SOROVAR
Enteritidis CONTENDO DELEÇÕES NOS GENES *cobS*,
cbiA, *pduC*, *pduD* E *pduE*: AVALIAÇÃO DA COLONIZAÇÃO
INTESTINAL, INVASÃO SISTÊMICA E RESPOSTA IMUNE**

Janine Denadai

Orientador: Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior

Coorientador: Prof. Dr. Oliveira Caetano de Freitas Neto

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

D391i Denadai, Janine
Infecção de aves (*Gallus gallus domesticus*) com *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar Enteritidis contendo deleções nos genes *cobS*, *cbiA*, *pduC*, *pduD* e *pduE*: avaliação da colonização intestinal, invasão sistêmica e resposta imune. / Janine Denadai. -- Jaboticabal, 2015
xvi, 87 p. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015
Orientador: Angelo Berchieri Junior
Coorientador: Oliveira Caetano de Freitas Neto
Banca examinadora: Marcelo Brocchi, Rosemeri de Oliveira Vasconcelos, Karin Werther, Jacqueline Boldrin de Paiva
Bibliografia

1. *Salmonella* Enteritidis. 2. *cbiA*, *cobS*, *pduC*, *pduD*, *pduE*. 3. Resposta imune. 4. Aves. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.981.49:636.5

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: INFECÇÃO DE AVES (*Gallus gallus domesticus*) COM *Salmonella enterica* SUBESP. *enterica* SOROVAR Enteritidis CONTENDO DELEÇÕES NOS GENES *cobS*, *cbiA*, *pduC*, *pduD* E *pduE*: AVALIAÇÃO DA COLONIZAÇÃO INTESTINAL, INVASÃO SISTÊMICA E RESPOSTA IMUNE

AUTORA: JANINE DENADAI

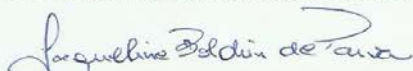
ORIENTADOR: Prof. Dr. ANGELO BERCHIERI JUNIOR

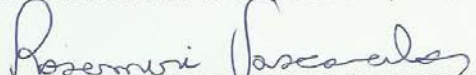
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. OLIVEIRO CAETANO DE FREITAS NETO

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


Prof. Dr. OLIVEIRO CAETANO DE FREITAS NETO
Universidade Federal da Paraíba / Areia/PB


Prof. Dr. MARCELO BROCCHI
Universidade Estadual de Campinas / Campinas/SP


Profa. Dra. JACQUELINE BOLDRIN DE PAIVA
Universidade Estadual de Campinas / Campinas/SP


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


Profa. Dra. KARIN WERTHER
Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 06 de abril de 2015.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JANINE DENADAI – nasceu em Monte Alto - SP, em 29 de dezembro de 1982. Graduiu-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Uberlândia, com colação de grau em setembro de 2007. Durante a graduação, nos anos de 2004 e 2006, foi bolsista da FAPEMIG, onde participou de vários projetos de pesquisas, enfocando principalmente o estudo da anatomia vascular da *Phrynos geofroanus* e histomorfometria da epiderme e das glândulas sudoríparas do escroto de bovinos mestiços taurino e nelore. De 2008 a 2010, realizou a pós-graduação (nível mestrado), como bolsista FAPESP, do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP) no Campus de Jaboticabal, Departamento de Patologia Animal, sob a orientação do Prof. Dr. Antônio Carlos Paulillo, com o estudo intitulado "Estudo de parâmetros clínicos e imunitários da vacinação contra a doença de Newcastle e sua importância epidemiológica em periquitosaustralianos (*Melopsittacus undulatus*)". De 2011 a 2015, realizou curso de doutorado do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP) no Campus de Jaboticabal, Departamento de Patologia Animal, sob a orientação do Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior e coorientação do Prof. Dr. Oliveira Caetano de Freitas Neto. Foi bolsista da FAPESP durante o doutorado com o estudo intitulado "Infecção de aves (*Gallus gallus domesticus*) com *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar Enteritidis contendo deleções nos genes *cobS*, *cbiA*, *pduC*, *pduD* e *pduE*: avaliação da colonização intestinal, invasão sistêmica e resposta imune."

Sem sonhos, a vida não tem brilho. Sem metas, os sonhos não têm alicerces. Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais. Melhor é errar por tentar do que errar por omitir. (Augusto Cury)

A Deus, pelo dom da vida, por sempre me guiar, abençoar e permitir que eu exerça tão nobre profissão.

Aos meus pais Salete e Paulo, meus exemplos de vida, pela compreensão e apoio durante a realização deste trabalho, meu eterno amor, respeito e admiração.

Ao meu pai Irso, que mesmo não estando mais entre nós, está sempre me guiando e abençoando, meu eterno amor e respeito.

Às minhas irmãs, Sâmia e Alissa, pelo apoio e carinho, minha mais sincera admiração e amor incondicional.

Ao meu noivo Willian, grande e eterno amor da minha vida, pelo companheirismo, dedicação e carinho em todos os momentos.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP –Jaboticabal.

Ao meu orientador Professor Dr. Angelo Berchieri Junior e ao meu coorientador Professor Dr. Oliveira Caetano de Freitas Neto, pela sabedoria transmitida, orientação, paciência e credibilidade em meu trabalho.

A todos os amigos que direta ou indiretamente me apoiaram, em especial a Priscila Diniz Lopes e Adriana Almeida.

A todos os funcionários do Departamento de Patologia Veterinária.

Aos Professores Dr. Marcelo Brocchi, Dra. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos, Dra. Karin Werther e Dra. Jacqueline Boldrin de Paiva pelo auxílio para a elaboração da Tese.

A FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro, processo nº 2011/20355-2.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Taxonomia do gênero <i>Salmonella</i>	3
2.2 Patogenicidade de <i>Salmonella</i> Enteritidis em aves	3
2.3 <i>Salmonella</i> Enteritidis e sua importância em saúde pública	5
2.4 Metabolismo energético de <i>Salmonella</i> spp	7
2.4.1 Metabolismo da glicose	8
2.4.1.1 Via Embden-Meuerhof ou glicólise	8
2.4.1.2 Via Entner-Doudoroff	10
2.4.1.3 O ciclo do ácido tricarboxílico	11
2.4.1.4 Vias alternativas para obtenção de energia por <i>Salmonella</i> spp.	13
2.5 Resposta imune desencadeada por <i>Salmonella</i> Enteritidis em aves	17
3 OBJETIVOS	22
3.1 Geral	22
3.2 Específicos	22
3.2.1. Comparar a capacidade das estirpes SE, SE $\Delta pduCDE$ e SE $\Delta cobS \Delta cbiA \Delta pduCDE$ em colonizar o ceco e invadir baço e fígado de aves de duas variedades para postura comercial	22
3.2.2 Avaliar a excreção de SE, SE $\Delta pduCDE$ e SE $\Delta cobS \Delta cbiA \Delta pduCDE$ em aves de duas variedades para postura comercial	22
3.2.3 Verificar a resposta imunológica em aves SPF infectadas com SE, SE $\Delta pduCDE$ e SE $\Delta cobS \Delta cbiA \Delta pduCDE$, por meio da caracterização das populações de linfócitos T (CD4/CD8) em fígados e tonsilas cecais e também pela quantificação da expressão dos genes responsáveis pelas quimiocinas e citocinas em tonsilas cecais (CXCLi2, CCL4, IL-6	

e IL-22) e baços (IL-6 e IL-18).....	22
4 MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Bactérias	23
4.2 Preparo dos mutantes	23
4.2.1 Escolha da sequência alvo e construção dos iniciadores.....	24
4.2.2 A amplificação dos fragmentos de DNA recombinante	25
4.2.3 Precipitação dos fragmentos de DNA recombinantes	26
4.2.4 Eletroporação	26
4.2.5 Transdução.....	26
4.2.6 Verificação da mutação nas estirpes de <i>Salmonella</i> spp	27
4.3 Experimento 1	28
4.3.1 Aves experimentais	28
4.3.2 Ensaios in vivo: Avaliação da infecção sistêmica e pesquisa de <i>Salmonella</i> Enteritidis em conteúdo cecal	28
4.3.3 Processamento das amostras	29
4.3.4 Análise estatística dos resultados	30
4.4 Experimento 2	30
4.4.1 Aves experimentais	30
4.4.2 Avaliação da excreção fecal.....	30
4.4.3 Análise estatística dos resultados	31
4.5 Experimento 3	31
4.5.1 Delineamento experimental.....	31
4.5.2 Colheita de Material.....	32
4.5.3 Ensaios in vivo: Avaliação da infecção sistêmica e pesquisa de <i>Salmonella</i> Enteritidis em conteúdo cecal	32
4.5.4 Processamento das amostras colhidas para a quantificação relativa da expressão gênica de citocinas.....	33
4.5.4.1 Extração de RNA.....	33
4.5.4.2 Transcrição reversa (RT).....	33
4.5.4.3 Construção dos iniciadores	33
4.5.4.4 PCR quantitativo em tempo real.....	34
4.5.4.5 Análise imuno-histoquímica.....	35

4.5.4.6 Análise estatística dos resultados	36
5 RESULTADOS	37
5.1 Preparo dos mutantes	37
5.2 Experimento 1	39
5.2.1 Ensaio in vivo: Avaliação da infecção sistêmica e pesquisa de <i>Salmonella</i> Enteritidis em conteúdo cecal	39
5.3 Experimento 2	50
5.3.1 Avaliação da excreção fecal	50
5.4 Experimento 3	51
5.4.1 Avaliação da infecção sistêmica e pesquisa de <i>Salmonella</i> Enteritidis em conteúdo cecal	51
5.4.2 PCR quantitativo em tempo real	54
5.4.3 Análise imuno-histoquímica	56
6 DISCUSSÃO	62
7 CONCLUSÕES	69
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

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 023482/11 do trabalho de pesquisa intitulado "**Infecção de aves (*Gallus Gallus domesticus*) por *Salmonella enterica* subesp. *Enterica* sorovar Enteritidis contendo deleções nos genes *cobS*, *CBIA*, *pduC*, *pduD* e *pduE***", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior está 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 extraordinária de 18 de novembro de 2011.

Jaboticabal, 21 de novembro de 2011.

Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi
Presidente - CEUA

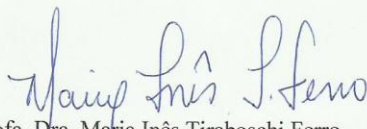
Certificado da Comissão Interna de Biossegurança

	Comissão Interna de Biossegurança	
	Ofício CIBio 002/14	
	Ref.: Certificado de Aprovação de Projeto de Pesquisa	

CERTIFICADO

Certificamos, a quem possa interessar, que o trabalho de pesquisa intitulado: “ INFEÇÃO DE AVES (*Gallus gallus domesticus*) POR *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar Enteritidis CONTENDO DELEÇÕES NOS GENES *cobS*, *cbiA*, *pduC*, *pduD* e *pduE*”, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Angelo Berchieri Júnior, foi aprovado pela CIBio da FCAV-UNESP em reunião de 10/05/2011.

Jaboticabal, 24 de setembro de 2014.


Profa. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro
- Presidente da CIBio -

**INFECÇÃO DE AVES (*Gallus gallus domesticus*) COM *Salmonella enterica*
SUBESP. *enterica* SOROVAR Enteritidis CONTENDO DELEÇÕES NOS GENES
cobS, *cbiA*, *pduC*, *pduD* E *pduE*: AVALIAÇÃO DA COLONIZAÇÃO
INTESTINAL, INVASÃO SISTÊMICA E RESPOSTA IMUNE**

RESUMO - *Salmonella* Enteritidis (SE) é responsável pela maioria dos casos de infecções alimentares em seres humanos e, geralmente, está associada ao consumo de produtos de origem avícola. Nas aves, SE coloniza o intestino, podendo sobreviver utilizando como substrato o 1,2 propanodiol (1,2-Pd) disponível neste ambiente, cujo metabolismo é viabilizado pela ação da enzima propanodiol desidratase, codificada por genes do *operon pdu*. A enzima propanodiol desidratase necessita de cianocobalamina como cofator enzimático, a qual é codificada pelos genes *cobS* e *cbiA*. Neste estudo, utilizou-se uma estirpe de SE e duas mutantes, sendo uma com os genes *pduC*, *pduD*, *pduE* defectivos (SE $\Delta pduCDE$) e outra com os genes *pduC*, *pduD*, *pduE*, *cobS* e *cbiA* (SE $\Delta cobS \Delta cbiA \Delta pduCDE$) inativados, na tentativa de avaliar a importância do 1,2-Pd para a colonização intestinal e invasão de órgãos durante a infecção de aves por SE. No primeiro experimento, estimou-se as quantidades das estirpes em baço, fígado e conteúdo cecal de aves de postura de variedades vermelha e branca. Um segundo ensaio foi realizado para verificação da excreção fecal, por meio de suabes cloacais. Aliado a isso, caracterizou-se a resposta imunológica em aves SPF desafiadas com estirpes de SE acima descritas por meio da avaliação das populações de linfócitos T CD4⁺ e TCD8⁺ em fígado e tonsilas cecais e também pela quantificação de genes responsáveis pela expressão das citocinas IL-6, CCL4, CXCLi2 e IL-22 em tonsilas cecais e IL-6 e IL-18 em baço. Observou-se que as estirpes mutantes foram capazes de colonizar o intestino e invadir o baço e fígado da mesma forma que a estirpe selvagem, sendo que as aves de postura de variedade vermelha foram mais susceptíveis a infecção sistêmica. Tanto a estirpe selvagem como as mutantes estimularam o mesmo perfil de resposta imune nas aves SPF. Portanto, os genes *pduC*, *pduD*, *pduE*, *cobS* e *cbiA* não são necessários para sobrevivência de SE em aves.

Palavras-chave: *Salmonella* Enteritidis, mutantes, genes *cbiA*, *cobS*, *pduC*, *pduD* e *pduE*, resposta imune, aves.

**INFECTION OF BIRDS (*Gallus gallus domesticus*)
WITH *Salmonella enterica* SUBSP. *enterica* SEROVAR
ENTERITIDIS CONTAINING DELETIONS IN *cobS*, *cbiA*, *pduC*, *pduD* AND *pduE*
GENES: EVALUATION OF INTESTINAL COLONIZATION, SYSTEMIC INVASION
AND IMMUNE RESPONSES.**

ABSTRACT – *Salmonella* Enteritidis (SE) is responsible for majority of the cases of foodborne diseases in humans and usually is associated with the consumption of poultry origin products. In birds, SE colonizes the intestine and can survive using 1,2 propanediol (1,2-Pd) as substrate. The metabolism of the 1,2-Pd is possible by the action of propanediol dehydratase enzyme, encoded by genes *pdu operon*. Cyanocobalamin, which is encoded by genes *cobS* and *cbiA*, is the cofactor required by propanediol dehydratase. In this study, we used one SE wild type strain and two mutants, one with mutations in *pduC*, *pduD* and *pduE* genes (SE Δ *pduCDE*) and another with mutations of *pduC*, *pduD*, *pduE*, *cobS* and *cbiA* genes (Δ *cobS* Δ *cbiA* Δ *pduCDE*) in attempt to evaluate the importance of 1,2-Pd for intestinal colonization and invasion of organs during infection of birds. In the first experiment, bacterial counts for all strains were obtained from spleen, liver and cecal content of white and brown varieties of commercial egg-layers. In the second assay, faecal shedding of the strains was assessed by cloacal swabs. Additionally, immunological responses were characterised by the assessment of T CD4⁺ and T CD8⁺ cell populations in liver and cecal tonsils from SPF (Specific Pathogen Free) chicks challenged with the three strains. Complementary transcripts of genes encoding the cytokines IL-6, CCL4, CXCL12 and IL-22 in cecal tonsils, and IL-6 and IL-18 in liver were obtained for relative quantification by qRT-PCR. It was observed that SE mutant strains were able to colonise the intestine and invade spleen and liver in the same way as the wild type strain. Brown variety of birds was more susceptible to systemic infection than white birds. Furthermore, the immune response profiles triggered by the SE wild type and the two mutants in SPF chicks were very similar. Therefore, data for the present study suggest that *pduC*, *pduD*, *pduE*, *cobS* e *cbiA* genes would not be essential to the survival of SE in the bird.

Key-words: *Salmonella* Enteritidis, mutant, genes *cbiA*, *cobS*, *pduC*, *pduD* and *pduE*, immune response, birds.

LISTA DE ABREVIATURAS

- APCs** - células apresentadoras de antígenos
- cAMP** - adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
- Cbia** - ácido carbirínico a,c-diamido sintetase
- cDNA** - Ácido desoxirribonucléico complementar
- CobS** - Adenosilcobalamina-5'-P sintetase
- CCL4** – Quimiocina C-C Ligante 4
- CD4⁺** - Grupamento de Diferenciação 4
- CD8⁺** - Grupamento de Diferenciação 8
- Cf^r** - resistência ao cloranfenicol
- Cra** - *catabolite repressor activator*
- CXCLi1** - CXC - quimiocina ligante um
- CXCLi2** - CXC - quimiocina ligante dois
- DDTHA/CVE** - Divisão de doenças de transmissão hídrica e alimentar/centro de vigilância epidemiológica
- DMSO** - dimetil sulfóxido
- GALT** - tecido linfoide associado ao intestino
- HCO₂⁻** - formiato
- IFN-γ** - Interferon Gamma
- IgA** - Imunoglobulina A
- IgM** - Imunoglobulina M
- IgY** - Imunoglobulina Y
- IL-1β** - Interleucina um beta
- IL-6** - Interleucina seis
- IL-18** - Interleucina dezoito
- IL-22** - Interleucina vinte e dois
- LPS** - lipopolissacarídeos
- MHC** - complexo principal de histocompatibilidade
- NK** - células *Natural killer*
- PAMPs**: *Pathogen associated molecular patterns*

PBS: Tampão fosfato-salino

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PRRs - receptores de reconhecimento padrão

RNA: Ácido ribonucleico

SE – *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar Enteritidis

SE $\Delta cobS \Delta cbiA$ - *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar Enteritidis contendo os genes *cobS* e *cbiA* defectivos

SE $\Delta pduCDE$ - *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar Enteritidis contendo os genes *pduC*, *pduD* e *pduE* defectivos

SE $\Delta cobS \Delta cbiA \Delta pduCDE$ - *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar Enteritidis contendo os genes *cobS*, *cbiA*, *pduC*, *pduD* e *pduE* defectivos

SG - *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Gallinarum biotipo Gallinarum

SG $\Delta cobS \Delta cbiA$ - *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Gallinarum biotipo Gallinarum contendo os genes *cobS* e *cbiA* defectivos

SPF - *Specific Pathogen Free*

SPI-1- *Salmonella pathogenicity islands 1*

SPI-2 - *Salmonella pathogenicity islands 2*

SSTT - sistema de secreção do tipo três

STM - *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar Typhimurium

STM $\Delta cobS \Delta cbiA$ - *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar Typhimurium contendo os genes *cobS* e *cbiA* defectivos

1,2 - PD - 1,2 propanodiol

T_H1 - células efectoras T helper um

T_H2 - células efectoras T helper dois

T_H17 - células efectoras T helper dezessete

T_H22 - células efectoras T helper vinte e dois

TLR - *Toll-like receptor*

TMAO - N-óxido de trimetilamina

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Identificação da sequência dos iniciadores utilizados no preparo dos mutantes SE $\Delta pduCDE$ e SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$	25
Tabela 2. Sequência dos iniciadores utilizados para avaliação de citocinas por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real.....	34
Tabela 3. Alterações macroscópicas observadas em aves de postura de variedade branca, desafiadas experimentalmente com as estirpes SE (grupo A), SE $\Delta pduCDE$ (grupo B) e SE $cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo C); e vermelha, desafiadas com SE (grupo D), SE $\Delta pduCDE$ (grupo E) e SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo F), após necropsia.....	48
Tabela 4. Porcentagem de amostras positivas examinadas por suabe cloacal de aves de variedade branca desafiadas experimentalmente com as estirpes SE (grupo A), SE $\Delta pduCDE$ (grupo B) e SE $cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo C); e aves de variedade vermelha, desafiadas com SE (grupo D), SE $\Delta pduCDE$ (grupo E) e SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo F), para avaliação da excreção fecal.....	50
Tabela 5. Alterações macroscópicas observadas em aves SPF desafiadas experimentalmente com as estirpes SE (grupo G), SE $\Delta pduCDE$ (grupo H) e SE $cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo I).....	52

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1.** Ilustração da via metabólica Embden-Meuerhof ou glicólise.....9
- Figura 2.** Ilustração da via metabólica Entner- Doudoroff.....11
- Figura 3.** Ilustração do ciclo do ácido tricarboxílico.....12
- Figura 4.** Eletroforograma em gel de agarose 1%. MM: marcador de tamanho molecular (GeneRuler 1 kb DNA Ladder), 1: fragmento de DNA recombinante do gene *cbiA*, 2: fragmento de DNA recombinante do gene *cobS*, 3: fragmento de DNA recombinante do gene *pduCDE*.....37
- Figura 5.** Eletroforograma em gel de agarose 1%. MM: marcador de tamanho molecular (GeneRuler 1 kb DNA Ladder). 1, 2, 5, 6, 9 e 10 correspondem à estirpe SE $\Delta cobS$; 3, 7 e 11 correspondem à estirpe SE (selvagem); 4, 8 e 12 seriam controles negativos da reação.....38
- Figura 6.** Eletroforograma em gel de agarose 1%. MM: marcador de tamanho molecular (GeneRuler 1 kb DNA Ladder). 1, 4 e 7 correspondem à estirpe SE $\Delta cbiA$; 2, 5 e 8 correspondem à estirpe SE (selvagem); 3, 6 e 9 são os controles negativos de cada reação.....38
- Figura 7.** Eletroforograma em gel de agarose 1%. MM: marcador de tamanho molecular (1kb DNA Ladder, Invitrogen™). 1, 2, 3, 7, 8, 9, 10, 11 e 12 correspondem à estirpe SE $\Delta pduCDE$; 4, 9 e 14 correspondem à estirpe SE (selvagem); 5,10 e 15 são os controles negativos das

eações.....39

Figura 8. Comparativo entre as médias ($\log_{10}$) de células bacterianas viáveis (UFC/g) em amostras de fígado de aves de postura de variedade branca, desafiadas com *Salmonella* Enteritidis (SE) (grupo A), SE $\Delta pduCDE$ (grupo B) e SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo C); e de variedade vermelha, desafiadas com *Salmonella* Enteritidis (SE) (grupo D), SE $\Delta pduCDE$ (grupo E) e SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo F), no primeiro dia de vida. Asterisco indica diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).....41

Figura 9. Comparativo entre as médias ($\log_{10}$) de células bacterianas viáveis (UFC/g) em amostras de baço de aves de postura de variedade branca, desafiadas com *Salmonella* Enteritidis (SE) (grupo A), SE $\Delta pduCDE$ (grupo B) e SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo C); e de variedade vermelha, desafiadas com *Salmonella* Enteritidis (SE) (grupo D), SE $\Delta pduCDE$ (grupo E) e SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo F), no primeiro dia de vida. Asterisco indica diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).....43

Figura 10. Comparativo entre as médias ($\log_{10}$) de células bacterianas viáveis (UFC/g) em amostras de conteúdo cecal de aves de postura de variedade branca, desafiadas com *Salmonella* Enteritidis (SE) (grupo A), SE $\Delta pduCDE$ (grupo B) e SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo C); e de variedade vermelha, desafiadas com *Salmonella* Enteritidis (SE) (grupo D), SE $\Delta pduCDE$ (grupo E) e SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo F), no primeiro dia de vida. Asterisco indica diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).....45

Figura 11. Média ($\log_{10}$) de células bacterianas viáveis (UFC/g) em amostras de baço, fígado e conteúdo cecal de aves de postura de variedade branca desafiadas com *Salmonella* Enteritidis (SE) (grupo A), SE $\Delta pduCDE$ (grupo B) e SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo C). Asterisco indica diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).....46

Figura 12. Média ($\log_{10}$) de células bacterianas viáveis (UFC/g) em amostras de baço, fígado e conteúdo cecal de aves de postura de variedade vermelha desafiadas com *Salmonella* Enteritidis (SE) (grupo D), SE $\Delta pduCDE$ (grupo E) e SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo F). Asterisco indica diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).....47

Figura 13. Alterações macroscópicas observadas em aves desafiadas experimentalmente com SE, SE $\Delta pduCDE$ e SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$. (1) Notar deposição de filamentos de fibrina sobre a cápsula hepática (seta) em ave da variedade vermelha desafiadas com SE (grupo D) aos sete dpi. (2) Fígado de ave branca sete dpi com SE $\Delta pduCDE$ (grupo B) apresentando áreas pálidas (seta). (3) Notar áreas pontos brancos multifocais (seta) em fígado de ave da variedade branca aos 21 dpi com SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo C).....49

Figura 14. Alterações macroscópicas observadas em fígados de aves sete dias após o desafio com SE (grupo G), SE $\Delta pduCDE$ (grupo H) e SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo I). (1) Notar fígado difusamente amarelado e com pontos brancos multifocais (setas) em fígado de ave SPF desafiada com SE (grupo G). (2) Notar amarelamento difuso (*) em fígado de ave SPF desafiada com SE $\Delta pduCDE$ (grupo H). (3) Fígado de ave SPF desafiada com SE

cobSΔcbiAΔpduCDE (grupo I) apresentando pontos brancos multifocais (setas). (4) Fígado de aspecto normal (ave não infectada).....53

Figura 15. Média ($\log_{10}$) de células bacterianas viáveis (UFC/g) em amostras de conteúdo cecal e fígado após o desafio com SE (grupo G), SE $\Delta pduCDE$ (grupo H) e SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo I) em aves SPF. Teste de Tukey ($P < 0,05$).....54

Figura 16. Média dos valores da expressão de genes relacionados às citocinas IL-22, IL-6, CXCLi2 e CCL4 em tonsila cecal de aves SPF desafiadas com SE (grupo G), SE $\Delta pduCDE$ (grupo H) e SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo I) e aves não infectadas (grupo J). Letras minúsculas distintas representam diferença estatística entre as médias dos níveis de expressão gênica submetidas ao teste de Tukey ($P < 0,05$).....55

Figura 17. Média dos valores da expressão de genes relacionados às interleucinas IL-18 e IL-6 em baço de aves SPF desafiadas com SE (grupo G), SE $\Delta pduCDE$ (grupo H) e SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo I) e aves não infectadas (grupo J). Letras minúsculas distintas representam diferença estatística entre as médias dos níveis de expressão gênica quando submetidas ao teste de Tukey ($P < 0,05$).....56

Figura 18. Quantificação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em amostras de fígado e tonsila de aves SPF desafiadas com culturas de SE (grupo G), SE $\Delta pduCDE$ (grupo H) e SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo I) pelo método de Imuno-histoquímica, três, sete e 14 dias pós-infecção. Letras minúsculas distintas indicam diferença estatística segundo teste de Tukey

($P < 0,05$).....57

Figura 19. Fotomicrografia das imunomarcações de linfócitos T CD4⁺ (seta amarela) em tecido de fígado de aves SPF, aos sete dias pós-infecção. (1) Ave desafiada com cultura de SE (grupo G); (2) Ave desafiada com cultura de SE $\Delta pduCDE$ (grupo H); (3) Ave desafiada com cultura de SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo I) e ave não infectada (grupo J). Complexo estreptavidina peroxidase. Objetiva de 10X (* / objetiva de 40X).....58

Figura 20. Fotomicrografia das imunomarcações de linfócitos T CD4⁺ (seta amarela) em tecido de tonsila cecal de aves SPF, no primeiro dia pós-infecção. (1) Ave desafiada com cultura de SE (grupo G); (2) Ave desafiada com cultura de SE $\Delta pduCDE$ (grupo H); (3) Ave desafiada com cultura de SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo I) e ave não infectada (grupo J). Complexo estreptavidina peroxidase. Objetiva de 10X (* / objetiva de 40X).....59

Figura 21. Fotomicrografia das imunomarcações de linfócitos T CD8⁺ (seta amarela) em tecido de fígado de aves SPF, aos sete dias pós-infecção. (1) Ave desafiada com cultura de SE (grupo G); (2) Ave desafiada com cultura de SE $\Delta pduCDE$ (grupo H); (3) Ave desafiada com cultura de SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo I) e ave não infectada (grupo J). Complexo estreptavidina peroxidase. Objetiva de 10X (* / objetiva de 40X).....60

Figura 22. Fotomicrografia das imunomarcações de linfócitos T CD8⁺ (seta amarela) em tecido de tonsila cecal de aves SPF, no primeiro dia pós-infecção. (1) Ave desafiada com cultura de SE (grupo G); (2) Ave desafiada com cultura de SE $\Delta pduCDE$ (grupo H); (3) Ave desafiada com cultura de SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo I) e ave não infectada (grupo J). Complexo estreptavidina peroxidase.

Objetiva de 10X (* /objetiva de 40X).....	61
---	----

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que 80,3 milhões dos casos anuais de doenças transmitidas por alimentos aos seres humanos sejam decorrentes de infecções por bactérias pertencentes ao gênero *Salmonella* (MAJOWICZ et al., 2010). Os sorotipos *S. Enteritidis* (SE) e *S. Typhimurium* (STM) são os mais frequentes, representando 57-67% dos sorotipos isolados anualmente (WHO, 2013).

A maioria dos casos de infecções alimentares em seres humanos por SE está relacionada a produtos de origem avícola, ocorrendo pelo consumo de ovos crus ou semicozidos, consumo de carne de frango cuja carcaça foi contaminada com fezes durante o processo industrial ou ainda, por contaminação cruzada no ambiente, envolvendo vegetais e utensílios domésticos que entraram em contato com produtos avícolas contaminados.

A alta densidade dos plantéis avícolas torna o ambiente favorável à propagação de agentes patogênicos. Assim, medidas sanitárias como desinfecção das instalações, programas de vacinação e controle de roedores são fundamentais para impedir a transmissão de micro-organismos.

SE é um dos sorotipos causadores do paratifo aviário, acometendo, principalmente, aves jovens, as quais podem apresentar sinais como diarreia, penas arrepiadas e mortalidade (BARROW; WALLIS, 2000). Em aves adultas o quadro clínico pode passar despercebido ou inaparente, podendo ocorrer sinais menos graves, tais como inapetência, queda de postura e diarreia. As aves podem tornar-se portadoras (GAST; HOLT, 1998; GAMA; BERCHIER JR; FERNANDES, 2003).

Nas aves, SE passa pelo proventrículo e pela moela indo colonizar o intestino (CHAPPELL et al., 2009). SE consegue invadir a mucosa intestinal e realizar infecção sistêmica, sobrevivendo no interior de fagócitos (OKAMURA et al., 2005), adaptando-se conforme as condições encontradas e a disponibilidade de substratos. No hospedeiro, o ambiente é predominantemente anaeróbico, ocorrendo, portanto, alteração no metabolismo respiratório de SE de aeróbico para anaeróbico.

Um dos substratos utilizados por SE como fonte de energia no ambiente intestinal do hospedeiro seria o 1-2 propanodiol (1,2-Pd) (JETER, 1990; WARREN et

al., 2002).. Esta via metabólica é viabilizada pela ação da enzima propanodiol desidratase, codificada por genes do *operon pdu*, a qual requer a cianocobalamina, como co-fator (JETER, 1990). SE é capaz de produzir cianocobalamina em anaerobiose, sintetizando-a por meio da expressão de genes do *operon cob* (RICHTER-DAHLFOR; RAVNUM; ANDERSON, 1994).

No intuito de melhor compreender os mecanismos de sobrevivência de SE no organismo da ave, realizou-se o presente estudo. Para isso, avaliou-se o comportamento (capacidade de colonização intestinal e realização de infecção sistêmica) de estirpes de SE contendo deleções nos genes *cobS*, *cbiA*, *pduC*, *pduD* e *pduE*, comparativamente a selvagem em *Gallus gallus domesticus*. A resposta imune também foi mensurada com o propósito de relacionar possíveis alterações de comportamento das estirpes com o tipo e a intensidade da resposta imune nas aves.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Taxonomia do gênero *Salmonella*

As salmoneloses aviárias são causadas por bactérias do gênero *Salmonella*, o qual, por sua vez, inclui as espécies *enterica* e *bongori*. *Salmonella enterica* é subdividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*; sendo que *Salmonella enterica* subespécie *enterica* inclui os sorotipos Gallinarum, Enteritidis e Typhimurium. Na classificação atual, S. Gallinarum e S. Pullorum são considerados como biotipos de um mesmo sorotipo (*Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Gallinarum biotipo Gallinarum e biotipo Pullorum) (GRIMONT; WEILL, 2007).

Os sorotipos são identificados baseando-se na reação de antissoros com antígenos presentes na parede celular bacteriana, envolvendo: antígeno somático (O), antígeno flagelar (H) e o antígeno capsular de virulência (Vi). São reconhecidos 2.610 sorotipos, tendo a seguinte distribuição: *Salmonella enterica* subesp. *enterica* (1.547 sorotipos); *Salmonella enterica* subesp. *salamae* (513); *Salmonella enterica* subesp. *arizonae* (100); *Salmonella enterica* subesp. *diarizonae* (341); *Salmonella enterica* subesp. *houtenae* (73); *Salmonella enterica* subesp. *indica* (13); *Salmonella bongori* (23) (GUIBOURDENCHE et al., 2010).

2.2 Patogenicidade de *Salmonella* Enteritidis em aves

Aves recém-eclodidas, cujo sistema imune é imaturo, podem apresentar sinais clínicos: diarreia, penas arrepiadas e mortalidade (BARROW, 2007). Aves com mais de 14 dias de vida, geralmente, não apresentam sinais clínicos, apenas uma enterite sem muitas complicações. Porém, a morbidade e a mortalidade dependerão da intensidade da infecção e da condição imunológica do hospedeiro (GAST; HOLT, 1998; GAMA; BERCHIERI JUNIOR; FERNANDES, 2003).

A transmissão de SE para aves pode ocorrer de forma horizontal, a partir do contato com ração, água, veículos contaminados, além de outras aves, seres

humanos, moscas e roedores infectados pela bactéria (BERCHIERI; FREITAS NETO, 2009) ou vertical, durante a formação dos ovos, uma vez que o micro-organismo coloniza os folículos pré-ovulatórios (THIAGARAJAN et al. 1994).

SE atravessa o proventrículo e a moela até atingir o intestino, colonizando-o. Em aves com o sistema imune comprometido, o micro-organismo pode invadir a mucosa intestinal, provocando bacteremia, disseminando-se por diversos órgãos internos (BERCHIERI; FREITAS NETO, 2009).

Em um estudo realizado por Matulova et al. (2013) foi observado que o pico de colonização no ceco por SE foi atingido 24 horas após a infecção por via oral em galinhas e foi diminuindo gradativamente. A contagem de SE em fígado e baço apresentou-se mais alta 24 horas após a infecção por via oral e manteve-se constante por até 12 dias e, em seguida, diminuiu gradualmente.

Fatores de virulência como os lipopolissacarídeos (LPS) da parede celular da bactéria, os flagelos e as fímbrias atuam como iniciadores na adesão e/ou invasão do epitélio (GUARD-PETTER et al., 1996; WILSON et al., 2000; MIZUMOTO et al., 2005).

Ao atingir a superfície basolateral do epitélio intestinal, inicia-se uma resposta inflamatória por meio do receptor de flagelina bacteriana, o *Toll-like receptor* (TLR) 5, localizado na membrana de células do epitélio intestinal e em populações de células do sistema imune (GEWIRTZ et al., 2001). Macrófagos e células dendríticas possuem receptores especiais, como o TLR4, que interagem com o LPS.

Salmonella spp. é um agente patogênico intracelular facultativo, sendo capaz de sobreviver no interior das células hospedeiras infectadas, incluindo fagócitos pela sua adaptação ao ambiente intracelular (OKAMURA et al., 2005). A capacidade de sobreviver e multiplicar-se dentro de macrófagos é fundamental para o estabelecimento da infecção sistêmica (BARROW; HUGGINS; LOVELL, 1994; CHAPPELL et al., 2009).

Estudos anteriores demonstram a influencia genética na susceptibilidade das aves às salmoneloses (POMEROY; NAGARAJA, 1991; BUMSTEAD; BARROW, 1993, BERCHIERI JUNIOR et al., 2001; FREITAS NETO et al., 2007;). Sugere-se que a resistência nas diferentes linhagens de aves a salmoneloses esteja relacionada com o sistema fagocítico mononuclear, pelo número elevado de células

fagocíticas no início da infecção e eliminação intracelular de *Salmonella* spp. nos macrófagos (WIGLEY et al., 2002).

Os macrófagos são células fagocíticas, responsáveis pela liberação de substâncias nocivas aos agentes patogênicos. Podem atuar como células apresentadoras de antígenos (APCs) para os linfócitos B e T e, quando ativados, são capazes de produzir vários mediadores imunológicos para controlar infecções (QURESHI; HEGGEN; HUSSAIN, 2000; TAYLOR et al., 2005).

Nas aves, o tecido linfóide associado ao intestino (GALT) inclui estruturas linfóides organizadas, tais como, bolsa cloacal, tonsilas cecais, placas de Peyer e agregados linfóides espalhados ao longo da lâmina própria, no epitélio do trato gastrointestinal. A tonsila cecal possui linfócitos T e B presentes em seus centros germinativos (LILLEHOJ; TROUT, 1996).

SE consegue invadir o epitélio intestinal e sobreviver no interior de fagócitos, devido à existência de genes de virulência localizados em regiões cromossômicas denominadas “ilhas de patogeniciade” ou “*Salmonella* pathogenicity islands” (SPI). SPI-1 codifica o sistema de secreção do tipo três (SSTT), que é responsável pelo transporte de proteínas efetoras para o interior das células do hospedeiro, permitindo, assim, a entrada de *Salmonella* spp. nas células intestinais (KANIGA et al., 1995). SPI-2 é induzida quando *Salmonella* spp. está no interior dos fagossomos e possui a função de estabelecer o trânsito de proteínas bacterianas no ambiente intracelular e inativar a enzima NADPH-oxidase, tornando o meio intracelular favorável à sobrevivência de *Salmonella* spp. (CIRILLO et al., 1998; HENSEL et al., 1998).

Rychlik et al. (2009) demonstraram que SPI-1 e SPI-2 são fundamentais para a virulência de SE em aves. Ambas auxiliam na colonização de baço e fígado.

2.3 *Salmonella* Enteritidis e sua importância em saúde pública

SE representa um dos principais agente causadores de infecções alimentares em seres humanos. A enfermidade, geralmente, caracteriza-se por febre, dor abdominal, diarreia, náuseas e às vezes vômitos. Milhões de casos de salmoneloses

em seres humanos ocorrem no mundo, resultando em mais de cem mil mortes por ano (WHO, 2013).

Normalmente a transmissão de SE ao ser humano está relacionada com produtos de origem avícola (COLIN, 1996; TAVECHIO et al., 1996). A associação de *Salmonella* spp. com estes produtos iniciou-se em meados dos anos 80, quando SE fagotipo 4 foi responsável por diversos surtos de infecção alimentar na Inglaterra devido a ingestão de alimentos contendo ingredientes de origem avícola (BAXTER-JONES, 1996; COLIN, 1996).

SE e STM são os sorotipos mais isolados em alimentos, sendo responsáveis por 57-67% das amostras colhidas anualmente (WHO, 2013). Na Europa, SE foi isolada em 85% dos casos de salmonelose em seres humanos. Na Ásia representou 38% e 31% na América Latina e Caribe (GALANIS et al., 2006).

No Brasil, provavelmente, SE foi introduzida no final da década de 80, por aves reprodutoras infectadas adquiridas de países europeus (IRINO et al., 1996).

Um estudo feito pela Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar, do Centro de Vigilância Epidemiológica “Professor Alexandre Vranjac” (DDTHA/CVE), com base em notificações de surtos de doenças transmitidas por alimentos e levantamentos de diagnósticos laboratoriais entre 1999 e 2007, demonstrou que grande parte dos surtos de diarreia causados por bactérias no Estado de São Paulo foram ocasionados por *Salmonella* spp, sendo SE responsável por 43,2% deles (CVE, 2014).

Investigações de infecções alimentares ocorridas em diferentes regiões do Brasil, envolvendo alimentos variados, demonstram que SE era o principal sorotipo responsável por salmonelose em seres humanos (PERESI; ALMEIDA; CARVALHO, 1998; GELLI; JAKABI; SAKATA, 1998). Segundo o Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo, durante o período de janeiro de 1996 a dezembro de 2000, SE correspondeu a 32% do total dos isolamentos. Maionese caseira, por exemplo, a qual inclui o ovo cru como ingrediente, representou 95% das ocorrências relacionadas a este micro-organismo (TAVECHIO et al., 2002).

Destaca-se ainda a dificuldade da erradicação de SE, uma vez que é uma bactéria ubíqua que pode sobreviver várias semanas em um ambiente seco e vários meses na água. A mesma é capaz de colonizar o trato intestinal de diversas

espécies de aves e mamíferos. Além disso, o uso indiscriminado de antibióticos aumentou significativamente a resistência deste patógeno a este tipo de medicamento desde o início da década de 90 (WHO, 2013).

A incidência de SE em alimentos pode provocar prejuízos para a indústria, mercado interno e exportação, podendo ocasionar até mesmo embargos comerciais por alguns países compradores (MUNIZ, 2012).

2.4 Metabolismo energético de *Salmonella* spp.

Salmonella spp. são micro-organismos heterotróficos, ou seja, seu metabolismo é dependente de uma fonte exógena para a produção de energia e biossíntese. São bactérias capazes de sobreviver em ambientes aeróbicos e anaeróbicos e para garantir sua sobrevivência no organismo hospedeiro (intracelular ou no trato entérico), onde o ambiente é predominantemente anaeróbico, estes micro-organismos utilizam-se de artifícios, como a alteração no seu metabolismo respiratório, para a obtenção de energia, conforme as condições encontradas e a disponibilidade de substratos (ERNST; DOMBROSKI; MERRICK, 1990; CONTRERAS et al., 1997).

Os micro-organismos anaeróbios facultativos como *E. coli* e *Salmonella* spp. produzem energia por processos respiratórios ou fermentativos. A via metabólica Embden-Meuerhof ou glicólise, por exemplo, é importante para a sobrevivência de *Salmonella* spp. no hospedeiro (BOWDEN et al., 2009), cujos produtos podem ser utilizados em processos respiratórios aeróbicos e anaeróbicos (FRAENKEL, 1996).

Bowden et al. (2009) em um estudo envolvendo mutantes de STM contendo deleções em genes responsáveis pela utilização da glicose, encontraram uma diminuição na replicação das mesmas dentro dos macrófagos, sugerindo a importância deste substrato no processo de replicação e sobrevivência de *Salmonella* spp. Além da glicose, STM faz uso de outras fontes de carboidratos como glicose, maltose, trealose, salicina e N-acetil-D-glucosamina (SAIER JR.; FEUCHT, 1975). Além disso, utilizam citrato (DICKEL, 2004) e xilose (BERCHIERI; FREITAS NETO, 2009) como fonte de carbono.

Estudos relacionados com as vias metabólicas utilizadas por *Samonella* spp. em aves são realizados utilizando-se STM como modelo experimental (SAIER JR.; FEUCHT, 197; BOWDEN et al., 2009) . Porém, ainda não há um mapa metabólico energético preciso para SE.

2.4.1. Metabolismo da glicose

Três vias são responsáveis pelo metabolismo da glicose: a via Embden-Meuerhof ou glicólise, a via da pentose-fosfato e a via Entner-Doudoroff (TORTORA; FUNK; CASE, 2012).

A proteína Cra (*catabolite repressor activator*) é responsável pela regulação do metabolismo de carbono em *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*. Esta proteína irá ativar genes que codificam enzimas chaves no desvio glicoxilato, gliconeogênese, ciclo do ácido tricarboxílico e transporte de elétrons, além de inibir a expressão de genes que codificam enzimas-chave nas vias Embden-Meyerhof e Entner-Doudoroff (SAIER; RAMSEIER, 1996).

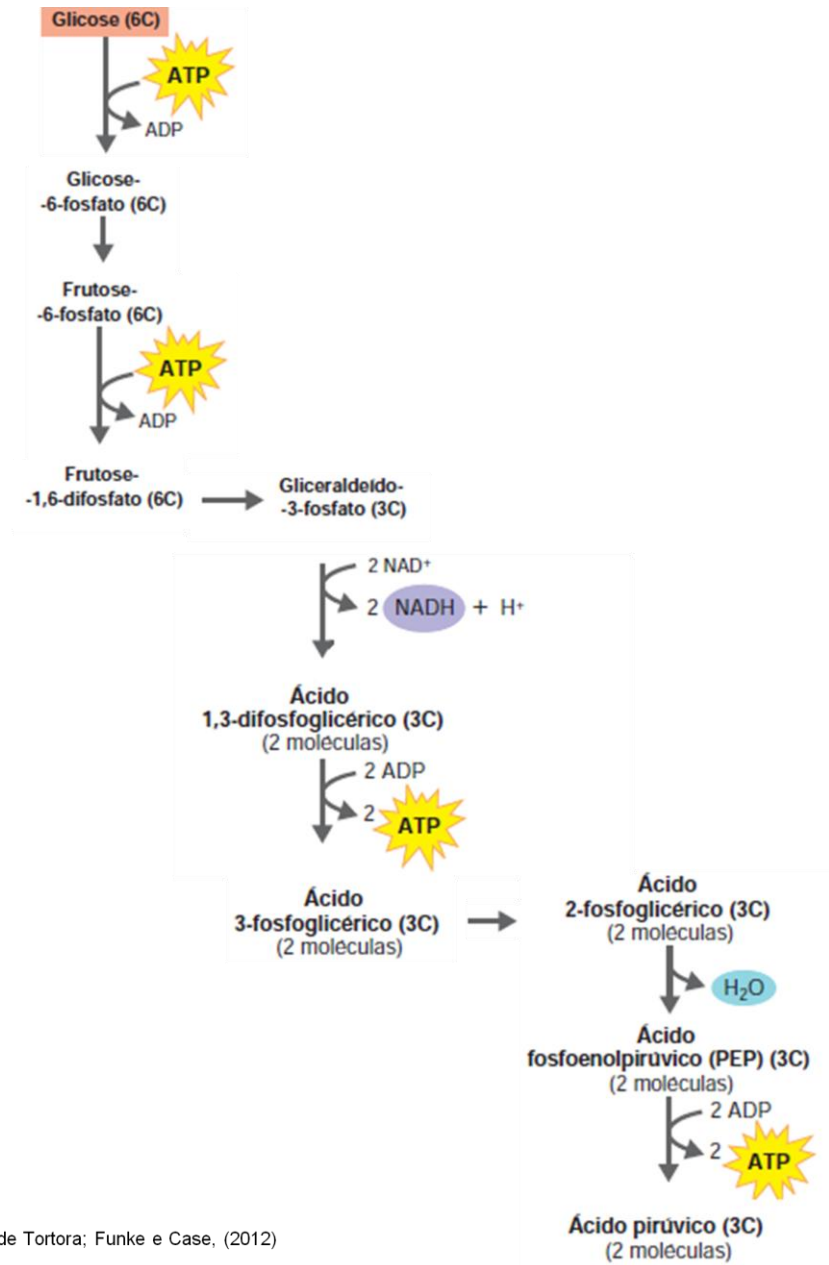
Estudos tem comprovado a importância desta proteína para a patogenicidade de STM. Foi demonstrado que mutante de STM SR-11 contendo o gene *cra* defectivo tornou-se apatogênico em ratos BALB/c, quando administrado por via oral, porém permaneceu patogênico quando administrado intraperitonealmente (UTLEY et al., 1998; ALLEN et al., 2000).

2.4.1.1. Via Embden-Meuerhof ou glicólise

Um estudo demonstrou a habilidade de STM de se replicar em cultivo celular utilizando a glicose como substrato e fonte de carbono. Mutações em genes referentes à glicólise (*ptsG*, *manXYZ* e *uhpT*) em STM, promoveu uma replicação ineficiente em células Caco-2 (BOWDEN et al., 2009). Por outro lado, Bowden et al. (2014), demonstraram que a glicólise foi necessária, mas não essencial para a replicação intracelular e invasão de STM em células HeLa.

A glicólise (Figura 1) inicia-se com a fosforilação da glicose pela enzima hexocinase gerando a glicose-6-fosfato, a qual sofre um rearranjo e se transforma

em frutose-6 fosfato pela ação da enzima fosfoglicoisomerase; além disso, a frutose-6 fosfato recebe um grupo fosfato, por meio da enzima fosfofrutocinase, transformando-se em frutose-1,6-difosfato, que é clivada em dois açúcares pela enzima aldolase: di-hidroxicetona-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).



Fonte: Adaptada de Tortora; Funke e Case, (2012)

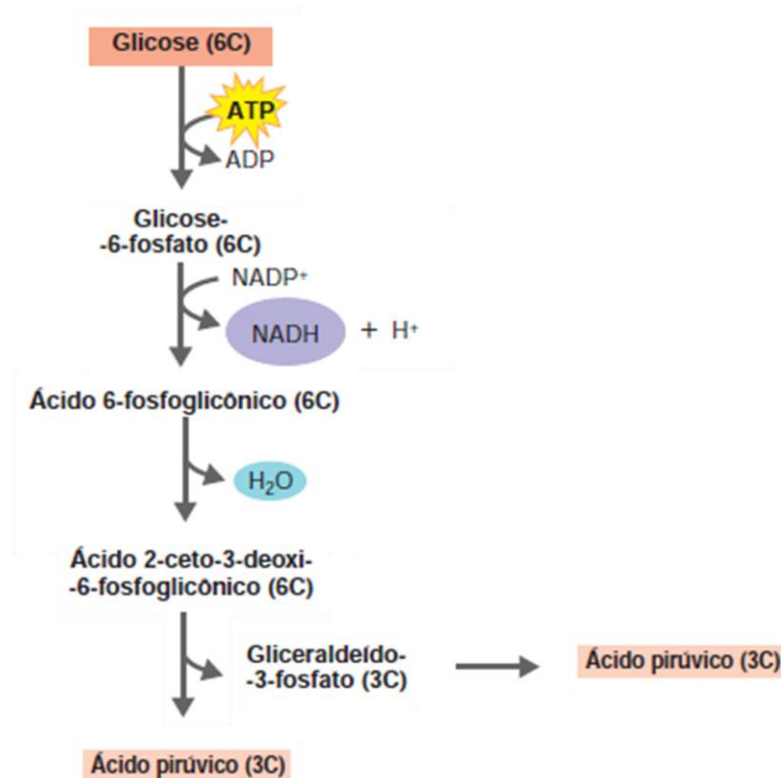
Figura 1. Ilustração da via metabólica Embden-Meuerhof ou glicólise.

O gliceraldeído-3-fosfato é utilizado como substrato pela enzima triose-fosfato-desidrogenase, a qual gera uma ligação altamente energética com um fosfato. Os produtos desta ligação são $\text{NADH} + \text{H}^+$ e ácido 1,3-difosfoglicérico, que é transformado em ácido 3-fosfoglicérico e, posteriormente, em ácido 2-fosfoglicérico, que, por sua vez, pela ação da enzima enolase, forma o ácido fosfoenolpirúvico (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

A última reação da glicólise é a transformação do ácido fosfoenolpirúvico em ácido pirúvico pela piruvato cinase. Assim, por meio da via Embden-Meuerhof, o micro-organismo é capaz de produzir para cada molécula de glicose, duas moléculas de ácido pirúvico, duas moléculas de $\text{NADH} + \text{H}^+$ e duas moléculas de ATP. O ácido pirúvico é utilizado no processo de fermentação em anaerobiose (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

2.4.1.2 Via Entner-Doudoroff

Outra via alternativa para o metabolismo da glicose é a via Entner-Doudoroff (Figura 2), a qual não está relacionada com a glicólise. Nesta via há produção de uma molécula de NADPH, uma molécula de ATP e ácido pirúvico para cada molécula de glicose (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).



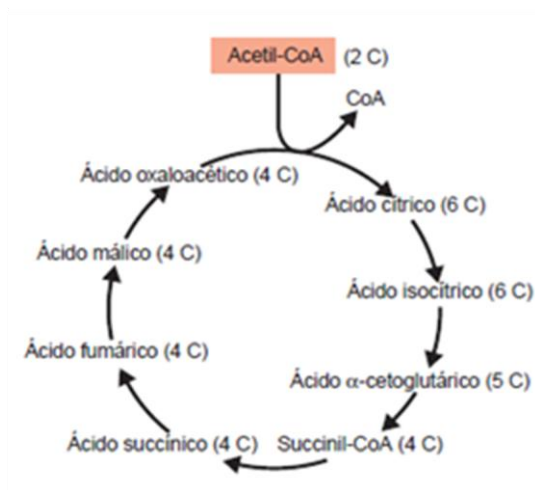
Fonte: Adaptada de Tortora; Funke e Case, (2012)

Figura 2. Ilustração da via metabólica Entner-Doudoroff.

Alguns estudos tem demonstrado a importância de alguns genes na multiplicação intracelular de STM. Os genes que codificam enzimas para a glicólise e para a via Entner-Doudoroff mostraram-se relevantes, já a maioria dos genes que codificam enzimas do ciclo do ácido tricarboxílico foram reprimidos (LUCCHINI et al., 2005).

2.4.1.3 O ciclo do ácido tricarboxílico

O acetato é utilizado como fonte de carbono durante o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (Figura 3), e a conversão oxidativa final resulta em duas moléculas acetil e uma molécula de succinato. Este último, por sua vez, é utilizado para biossíntese pelo micro-organismo após a conversão em oxalacetato, α -cetoglutarato, fosfoenolpiruvato e glicose-6-fosfato (LEVINSON, 2010).



Fonte: Adaptada de Tortora; Funke e Case, (2012)

Figura 3. Ilustração do ciclo do ácido tricarboxílico

Segundo Yimga et al. (2006), o crescimento de STM em fagócitos é dependente de um ciclo completo do ácido tricarboxílico em camundongos da linhagem BALB/c, sendo fundamental a conversão de malato em piruvato para a virulência deste sorotipo. Além disso, uma estirpe de STM incapaz de converter malato em oxaloacetato via malato desidrogenase (VOGEL; ENTIAN; MECKE, 1987; CRONAN; LAPORTE, 1996) também se tornou atenuada, bem como outras mutações que os incapacitaram de converter succinato em oxaloacetato os tornaram avirulentos (MERCADO-LUBO et al., 2009).

Em anaerobiose, este ciclo sofre algumas modificações, ocorre uma diminuição das enzimas iniciais do ciclo: citrato sintase, aconitase e isocitrato-desidrogenase, (GRAY; WIMPENNY; MOSSMAN, 1966; FORGET; PICHINOTY, 1967; SMITH; NEIDHARDT, 1983a; SMITH; NEIDHARDT, 1983b; SPENCER; GUEST, 1985), ficando assim comprometida a produção de α -cetoglutarato e impedindo a formação de succinato (AMARASINGHAM; DAVIS, 1965; THOMAS et al., 1972; MACGREGOR; SCHNAITMAN, 1973; KEEVIL; HOUGH; COLE, 1979; SMITH; NEIDHARDT, 1983b,). Todavia, a produção de succinato pode ocorrer a partir das enzimas glutamato-oxaloacetato transaminase, aspartase e fumarato redutase (COURTRIGHT; HENNING, 1970, INGRAHAM; MAALØE; NEIDHARDT, 1983). Além disso, succinato também é formado em condições anaeróbias via isocitrato liase (CREAGHAN; GUEST, 1978).

2.4.1.4 Vias alternativas para obtenção de energia por *Salmonella* spp.

Outros substratos são, ainda, utilizados por *Salmonella* spp. como fontes de carbono em macrófagos, como: frutose, D-manitol e D-sorbitol (KIM et al., 2013).

Aerobicamente, o oxigênio serve como aceptor terminal e elétrons na cadeia respiratória, já em anaerobiose o patógeno utiliza aceptores de elétrons alternativos como: nitrato, fumarato, dimetil sulfóxido (DMSO) e N-óxido de trimetilamina (TMAO) (LIN, 1987; POOLE; INGLEDEW, 1987; CONTRERAS et al., 1997; UNDEN; BONGAERTS, 1997). Segundo Taylor et al., (2005), os aceptores alternativos mais utilizados pelas bactérias são o nitrato e o fumarato.

A clivagem do piruvato em anaerobiose forma o formiato (HCO_2^-). STM metaboliza piruvato por meio de dois mecanismos distintos. Na ausência de aceptores de elétrons exógenos, o formiato é convertido em dióxido de carbono e di-hidrogênio pela enzima formiato-piruvato liase. Na presença de aceptor de elétron exógeno, a oxidação do formiato para dióxido de carbono é acoplada à redução do aceptor, formando a cadeia respiratória anaeróbica (GENNIS; STEWART, 1996).

A expressão da formiato desidrogenase é induzida durante o crescimento anaeróbico com nitrato (LESTER; DEMOSS, 1971), mas não é estimulada por outros aceptores de elétrons como nitrito e TMAO (BERG; STEWART, 1990).

A redução anaeróbica do nitrato por *Salmonella* spp. é a via respiratória mais importante para esses micro-organismos (PAYNE, 1973; NEUBAUER; GOTZ, 1996). Além disso, neste processo, o formiato pode ser o maior doador de elétrons para o nitrato (STOUTHAMER, 1969; BARRETT; RIGGS, 1982).

A combinação da respiração utilizando as enzimas nitrato redutase e NADH-nitrito-redutase permite que enterobactérias multipliquem anaerobicamente utilizando nitrato como única fonte de nitrogênio (BLASCO et al., 1990).

Bactérias entéricas são capazes de se multiplicarem anaerobicamente em substratos não fermentáveis se o fumarato participar como um aceptor de elétrons, utilizando a enzima fumarato redutase (CREAGHAN; GUEST, 1978).

Esta enzima contém quatro subunidades catalíticas (frdABCD). A frdA e a frdB são proteínas extrínsecas da membrana, já frdC e frdD são proteínas

intrínsecas. As quatro subunidades são necessárias para que a bactéria possa respirar em anaerobiose utilizando fumarato (COLE et al., 1985, CECCHINI et al., 1986).

A enzima fumarato redutase é codificada pelo *operon* frdABCD e sua síntese enzimática requer condições de crescimento anaeróbicas, podendo ser inibida pela presença de nitrato (JONES; TURNER, 1984). A fumarato redutase pode ser semelhante à succinato desidrogenase sobre muitos aspectos, exceto pela catalisação reversa, a qual reduz fumarato a succinato, sendo este um passo pertencente ao ciclo do ácido tricarboxílico (VANHELLEMOND; TIELENS, 1994).

Alguns substratos permitem ao micro-organismo uma vantagem seletiva em nichos competitivos, como o propanodiol e a etanolamina. Três bactérias patogênicas são capazes de usá-los como fonte de carbono, nitrogênio e energia: *S. enterica*, *Clostridium perfringens* e *Listeria monocytogenes* (KORBEL et al., 2005).

A etanolamina é convertida em acetaldeído e amônia pela etanolamina amônia liase (BRADBEER, 1965a; BRADBEER, 1965b) e sua utilização como fonte de carbono e nitrogênio (ROOF; ROTH, 1988; ROTH et al., 1993) é regulada pelos genes *eutB* e *eutC*. A amônia é utilizada pelo micro-organismo como fonte de nitrogênio e o acetaldeído é transformado em acetil-CoA (JONES; TURNER, 1984), sendo utilizado em vários processos metabólicos.

Salmonella enterica é capaz de utilizar 1,2 propanodiol (1,2-Pd) como fonte de energia por uma via que requer cianocobalamina (JETER, 1990; WARREN et al., 2002). A cianocobalamina faz parte de uma família de compostos denominados genericamente de cobalaminas (ZAGO; MALVEZZI, 2001). É uma vitamina hidrossolúvel, sintetizada exclusivamente por microrganismos aeróbios, anaeróbios e anaeróbios facultativos, como *Salmonella enterica* (GILLHAM; PAPACHRISTODOULOU; THOMAS, 1997). A mesma é encontrada praticamente em todos os tecidos animais e estocada primariamente no fígado na forma de adenosilcobalamina (HENRY, 1999).

O gene *cbiA* codifica a enzima CbiA (ácido cabirínico a,c-diamido sintetase), que está envolvida na produção da porção inicial da molécula de cianocobalamina (ROTH et al., 1993). Ela é a primeira glutamina aminotransferase na via anaeróbia

para a biossíntese da cianocobalamina, além de ser responsável, indiretamente, pela regulação negativa de todo o *operon cob* (RICHTER-DAHLFORS et al., 1994).

O gene *cobS* codifica a enzima CobS (Adenosilcobalamina-5'-P sintase), que está localizada na membrana celular e catalisa o penúltimo passo da produção de cianocobalamina (MAGGIO-HALL; CLAAS; ESCALANTE-SEMERENA, 2004). A via biossintética é completamente dependente desta enzima (MAGGIOHALL; ESCALANTE-SEMERENA, 1999; ANDERSON et al., 2007).

A expressão do *operon cob* é regulada por pelo menos seis agentes efetores: potencial óxido-redução, AMP cíclico (cAMP), propanodiol, etanolamina, tetrionato e cianocobalamina (ESCALANTE-SEMERENA; ROTH, 1987; RICHTER-DAHLFORS; RAVNUM; ANDERSSON, 1994; PRICE-CARTER et al., 2001).

O *operon pdu* codifica enzimas para a utilização de propanodiol e está localizado ao lado do *operon cob* no genoma de STM (JETER; OLIVERA; ROTH, 1984; JETER; ROTH, 1987). Acredita-se que a principal finalidade da cianocobalamina para *Salmonella* spp. seja atuar como cofator da enzima propanodiol desidratase, a qual catalisa o primeiro passo da via de degradação de propanodiol.

Esta afirmação se baseia nas evidências de que o *operon cob* e o *operon pdu* são induzidos na presença de propanodiol e são co-regulados sob as mesmas condições, respondendo a uma proteína de regulação positiva (PocR) (RONDON; ESCALANTE-SEMERENA, 1992).

O biotipo *S. Gallinarum*, estirpe 287/91, por outro lado, é capaz de utilizar etanolamina, embora não o propanodiol, independentemente da presença ou ausência de cianocobalamina, uma vez que possui o *operon pdu* incompleto (SRIKUMAR; FUCHS, 2011).

A via de degradação começa com a conversão de 1,2-Pd em propionaldeído pela enzima propanodiol desidratase que é dependente da cianocobalamina (Ado-CBL) (BOBIK et al., 1997). Subsequentemente, propionaldeído é convertido em propanol e propionato pela coenzima A (CoA), dependente da aldeído desidrogenase, fosfotransacilase, propionato quinase e álcool desidrogenase (TSANG; HORSWILL; ESCALANTE-SEMERENA, 1998). Além disso, a respiração

anaeróbica realizada por SE utilizando 1,2-propanodiol faz uso, essencialmente, do tetrionato como aceptor de elétrons (BRADBEER, 1965).

Segundo Bobik et al. (1997), o locus *pdu* de *S. enterica* inclui 23 genes: *pocR*, *pduF* e *pdu*ABCDEFGHIJKLMNPOQSTUVWX. O gene *pduA* está envolvido na formação de organelas poliédricas presentes em *Salmonella* spp., as quais são formadas durante crescimento anaeróbio na presença de propanodiol (BOBIK et al., 1999) e possuem a função de regular a produção de aldeído, minimizando sua toxicidade (HAVEMANN; SAMPSON; BOBIK, 2002). O gene *pduG* é necessário para a conversão de cianocobalamina em adenosilcobalamina (WALTER; AILION; ROTH, 1997). Além disso, estudos comprovaram que os genes *pduC*, *pduD* e *pduE* são fundamentais para a expressão da atividade da enzima propanodiol desidratase (BOBIK et al., 1997).

Esta via de degradação sugere que o propanodiol atuaria como uma fonte de energia na forma de ATP, utilizado pela bactéria em condições anaeróbias. O propanodiol é sabidamente disponível no trato gastrointestinal de aves e mamíferos, pois é produzido durante o catabolismo anaeróbio de duas pentoses muito comuns, rhamnose e fucose, encontradas em glicoconjugados do epitélio intestinal (SAMPSON, 2004).

A habilidade para degradar propanodiol confere vantagem seletiva em nichos anaeróbios, como o trato intestinal do hospedeiro e o interior dos macrófagos (LIN, 1987; OBRADORS et al., 1988). Evidências sugerem que o propanodiol influencia a patogênese de *Salmonella* spp. A tecnologia de expressão *in vivo* (IVET) mostrou que a degradação de propanodiol é importante para STM multiplicar-se em tecidos do hospedeiro (CONNER et al., 1998). Estudos em camundongos mostraram que deleções no *operon pdu*, mas não no *cob* conferem defeito de virulência em STM (CONNER et al., 1998; HEITHOFF et al., 1999). Foi observada ainda em camundongos deficiência na capacidade de invasão por STM contendo mutação no *cluster cob-cbi-pdu*, o que faz acreditar que esse *cluster* aumenta a capacidade de sobrevivência intracelular de *Salmonella* spp. (KLUMPP; FUCHS, 2007). Mais recentemente Harvey et al. (2011) demonstraram que genes do *operon pdu* são super expressos em STM durante a colonização intestinal de aves, enquanto genes *cob* e *cbi* estavam subexpressos.

A deleção dos genes *cobS* e *cbiA* ($\Delta cobS\Delta cbiA$) em *Salmonella* spp., impossibilita a utilização de cianocobalamina em condições anaeróbias (RICHTER-DAHLFORS; RAVNUM; ANDERSSON, 1994). Ensaios realizados com aves têm demonstrado que a deleção de genes do *operon cob* produz ação variada em *Salmonella* spp. Sierra et al. (2009) observaram que STM $\Delta cobS\Delta cbiA$ apresentou atenuação parcial, enquanto Paiva et al. (2009) verificaram que SG $\Delta cobS\Delta cbiA$ tornou-se atenuada e não causou mortalidade. Entretanto, estudo feito por Paiva (2010) demonstrou que SE $\Delta cobS\Delta cbiA$ apresentou multiplicação normal sob condições aeróbias e anaeróbias e manteve a habilidade de colonizar o trato intestinal das aves e produzir infecção sistêmica tão eficientemente quanto a estirpe selvagem de SE.

Dois sistemas regulatórios globais, Crp/cAMP e ArcA/ArcB, são importantes na indução e controle dos *operons cob* e *pdu*. Durante o crescimento aeróbio em piruvato, deleções nos genes *cya* e *crp* não permitiram a indução dos *operons cob* e *pdu* por propanodiol, já mutações nos genes *arcA* e *arcB* não causaram mudanças.

Em anaerobiose, ambos os sistemas são importantes na indução dos *operons cob* e *pdu*, uma vez que eles regulam a expressão do gene *pocR*, aumentando o nível da proteína PocR (AILION; BOBIK; ROTH, 1993).

Ailion; Bobik e Roth (1993) avaliaram a capacidade de STM de multiplicar-se em um gradiente de oxigênio tendo propanodiol como fonte de carbono exclusiva, sem adição de cianocobalamina. O crescimento ocorreu a uma concentração intermediária de oxigênio. Aparentemente, baixos níveis de oxigênio podem permitir a síntese de cianocobalamina e ainda fornecer receptor de elétrons suficientes para proporcionar a respiração por meio do propanodiol. STM, assim como outras bactérias entéricas, pode frequentemente se deparar com ambientes microaeróbicos no epitélio intestinal, formados a partir do oxigênio do sangue que passam através do epitélio (SAVAGE, 1977).

2.5 Resposta imune desencadeada por *Salmonella* Enteritidis em aves

A resposta imune das aves é dividida em inata e adaptativa (JEURISSEN et al., 2002). A imunidade inata é representada por fagócitos, células exterminadoras

naturais (NK), citocinas derivadas dos macrófagos e células polimorfonucleares como os heterófilos (JEURISSEN et al., 2002; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012; JUUL-MADSEN et al., 2008). A imunidade adaptativa abrange principalmente linfócitos T e B e as citocinas produzidas por essas células (OUYANG; VALDEZ, 2008).

Sabe-se que o reconhecimento de patógenos específicos pelas células (fagócitos) do sistema imune inato é realizado por meio de receptores, denominados receptores de reconhecimento padrão - PRRs, que permitem o reconhecimento de diferentes padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) presentes nos micro-organismos como: lipopolissacarídeos (LPS - bactérias Gram-negativas), ácido lipoteicóico (Gram-positivas), flagelina, peptidoglicano (bactérias Gram-positivas), ácido nucleico microbiano (fita simples e fita dupla), receptor de manose e de debris celulares (KAISER, 2010; BROWNLIE; ALLAN, 2011).

Após o reconhecimento dos PAMPs pelos PRRs, a resposta imune inata será regulada pela estimulação da produção de citocinas, proteínas e peptídeos com atividade antimicrobiana, ocorrendo opsonização bacteriana pelas proteínas do sistema complemento e o processo de fagocitose pelos heterófilos e macrófagos (KAISER, 2010).

A resposta imune adaptativa inicia-se após a captura de antígenos e/ou micro-organismos pelas células apresentadoras de antígenos (APCs). Em seguida, os linfócitos T são capazes de reconhecê-los por meio do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) presente nas membranas das APCs (KAISER, 2010; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

A resposta imune celular, também conhecida como imunidade mediada por células, é caracterizada pela participação de linfócitos T, os quais podem ser do tipo auxiliar ou citotóxico. Os linfócitos T auxiliares ou T CD4⁺ possuem importante ação na ativação de macrófagos e os auxilia em na sua ação microbicida. São, portanto, capazes de causar a morte de micro-organismos fagocitados, recrutando e ativando fagócitos por meio do receptor CD40 e da produção de IFN- γ (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012). As células T CD4⁺ podem se diferenciar em células efectoras T_H1, T_H2, T_H17 e T_H22. A resistência em camundongos a infecção por *Salmonella* spp. está relacionada com as respostas T_H1 e T_H17 (SCHULZ et al., 2008). É possível

encontrar um aumento de T_H1 após uma semana de infecção com STM e esta pode continuar por até três semanas após o desafio (SRINIVASAN; FOLEY; MCSORLEY, 2004), sendo uma resposta essencial para eliminação sistêmica pela produção de citocinas (SCHULZ et al., 2008; MCSORLEY, 2014), principalmente INF- γ , que irá estimular macrófagos (MURPHY, 1994). As células T_H17 e T_H22 , por sua vez, irão participar do recrutamento de neutrófilos e da produção de citocinas, como a IL-22, a qual participa da manutenção da integridade epitelial (SANTOS et al. 2009).

Os linfócitos T citotóxicos, ou T $CD8^+$, reconhecem antígenos em qualquer tipo de célula nucleada, sendo capazes de matar a célula (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012). Um estudo realizado por Berndt e Methner (2001) demonstrou a presença de grandes quantidades de linfócitos T $CD8^+$ citotóxicos após infecção primária por *Salmonella* Enteritidis em aves. Além disso, Withanage et al. (2005) encontraram uma associação de lesões foliculares no fígado com o aumento de $CD4^+$ e $CD8^+$ em galinhas infectadas com STM, como resultado de uma resposta imune pró-inflamatória.

Na região do íleo, foi observado em aves livres de patógenos específicos (Specific Pathogen Free – SPF) desafiadas com SE uma indução significativa na expressão das quimiocinas CXCLi1 e CXCLi2. Além disso, ocorreu um aumento no número de macrófagos e heterófilos associados à lesão (CHAPPELL et al., 2009). Estudos tem mostrado a capacidade destas quimiocinas de atrair heterófilos nas aves. Entretanto, evidências de outros estudos sugerem que os macrófagos, monócitos e linfócitos são os alvos quimiotáticos para CXCLi1 e CXCLi2 (MARTINS-GREEN; FEUGATE, 1998; MARTINS-GREEN, 2001; WITHANAGE, 2004). A atração de macrófagos atua de forma benéfica na propagação da infecção por SE (VAZQUEZ-TORRES; FANG, 2001), uma vez que este micro-organismo é capaz de sobreviver no interior de fagócitos.

Outra importante quimiocina, expressa algumas horas após infecção intestinal por SE, em pintos de um dia, é a CCL4 (BERNDT et al., 2007), a qual tem a capacidade de atrair linfócitos T, linfócitos B, eosinófilos e macrófagos, sendo considerada crucial na iniciação e manutenção da resposta inflamatória (OPPENHEIM et al., 1991; MURPHY, 1994).

A resposta imune produzida por citocinas pró-inflamatórias, na presença de SE no intestino, resulta em lesões nas microvilosidades intestinais, sendo este o mesmo mecanismo que produz a gastroenterite em mamíferos (DARWIN; MILLER, 1999). Estudos tem demonstrado um aumento na expressão de genes responsáveis pela codificação das interleucinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6 após desafio com SE (KAISER et al., 2000).

IL-6 é uma citocina que possui atividade pró-inflamatória pela indução da síntese de proteínas de fase aguda de inflamação. Além disso, é importante para o desenvolvimento de respostas imunes adaptativas levando a diferenciação dos linfócitos B e linfócitos T citotóxicos (HIRANO, 1994).

IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória, produzida por macrófagos e células dendríticas. Um aumento em seus níveis, no início da invasão, provoca inflamação em células endoteliais, podendo inibir a invasão do epitélio por *Salmonella* spp. através de mecanismos como o recrutamento de neutrófilos para sítios inflamatórios, ativação de moléculas de adesão endoteliais, indução de citocinas e quimiocinas e estimulação da resposta T_H17 (SAHOO et al., 2011).

IL-18 é outra importante citocina que atua na eliminação de *Salmonella* spp. no hospedeiro, promovendo a produção de IFN- γ a partir de células T e NK, além de outras citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-8 e GM-CSF, aumentando a expansão, a migração e a ativação de neutrófilos durante infecções. Além disso, a IL-18 aumenta a atividade citotóxica e a proliferação de células T CD8⁺. Durante infecções bacterianas, ao induzir IFN- γ , IL18 promove atividade microbicida a partir dos macrófagos, através de indução da produção de óxido nítrico (SAHOO et al., 2011)

Após o estímulo das respostas imunes inatas e adaptativas por SE e inflamação do epitélio intestinal, há um aumento da expressão de genes responsáveis pela produção da citocina IL-22 por células T_H17 em aves de um dia (CRHANNOVA et al., 2011). A principal função de IL-22 é manter a integridade epitelial pela estimulação da proliferação celular, cicatrização, produção de peptídeos anti-microbianos, além de estimular a produção de outras citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias pelas células epiteliais (WOLK, et al., 2006; OUYANG, VALDEZ, 2008)

A eliminação de SE pelo hospedeiro envolve, ainda, a resposta imune humoral (SASAI et al., 2000), caracterizada pela produção de anticorpos (IgA, IgM e IgY). Seo et al. (2003) encontraram um aumento significativo de IgA em papo e intestino de aves SPF após desafio com SE. Lee et al. (2002) sugere que IgY se liga às moléculas da superfície de SE, as quais são críticas para o crescimento bacteriano, conduzindo à disfunção funcional desses componentes. Além disso, estudos *in vivo* têm demonstrado o efeito de prevenção de infecção por *Salmonella* spp. por IgY (PERALTA et al., 1994; YOKOYAMA et al., 1998).

Em aves com um sistema imune hígido, a resposta imunológica decorrente da colonização bacteriana no epitélio intestinal e processo inflamatório inicial seriam suficientes para impedir a infecção sistêmica (DESMIDT et al., 1998; FARNELL et al., 2001). Porém, os mecanismos envolvidos na infecção sistêmica por SE em aves ainda necessitam ser esclarecidos.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a infecção de aves com estirpes de SE contendo deleções em genes relacionados à produção de cianocobalamina e propanodiol (SE $\Delta pduCDE$ e SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$) em comparação à estirpe original (SE), investigando a presença das estirpes em baço, fígado e conteúdo cecal e caracterizando aspectos da resposta imune.

3.2 Específicos

3.2.1. Comparar a capacidade das estirpes SE, SE $\Delta pduCDE$ e SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ em colonizar o ceco e invadir baço e fígado de aves de duas variedades para postura comercial.

3.2.2 Avaliar a excreção de SE, SE $\Delta pduCDE$ e SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ em aves de duas variedades para postura comercial.

3.2.3 Verificar a resposta imunológica em aves SPF infectadas com SE, SE $\Delta pduCDE$ e SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$, por meio da caracterização das populações de linfócitos T (CD4/CD8) em fígados e tonsilas cecais e também pela quantificação da expressão dos genes responsáveis pelas quimiocinas e citocinas em tonsilas cecais (CXCLi2, CCL4, IL-6 e IL-22) e baços (IL-6 e IL-18).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Bactérias

Foi utilizada a estirpe *Salmonella* Enteritidis P125109 (SE), que sabidamente coloniza extensivamente o trato entérico e é invasiva, isolada de aves e mantida pelo Dr. Paul Andrew Barrow na “School of Veterinary Medicine and Science” da “The University of Nottingham”, Inglaterra. O bacteriófago ØP22 e os plasmídeos pKD46, pKD3, pKD4 e pCP20 também foram gentilmente doados pelo Dr. Barrow.

4.2 Preparo dos mutantes

Os mutantes de SE foram preparados no Laboratório de Ornitopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho - Câmpus de Jaboticabal".

Para a construção das estirpes mutantes SE $\Delta pduCDE$ e SE $\Delta cobS \Delta cbiA \Delta pduCDE$, inicialmente deletou-se individualmente os genes *pduC*, *pduD*, *pduE*, *cobS* e *cbiA* utilizando-se a técnica Lambda-red (DATSENKO; WANNER, 2000), cujas etapas estão descritas nos itens subsequentes. Nessa técnica, as células de SE receberam o plasmídeo pKD46 por eletroporação, tornando-se competentes para recombinação de fragmentos de DNA também por eletroporação. Para a produção dos fragmentos de DNA, foram utilizados iniciadores de mutagênese e os plasmídios pKD3 e pKD4, os quais conferem resistência ao cloranfenicol (Cf^r) e a canamicina (Kn^r), respectivamente. Para a mutação do gene *cobS*, foi utilizado o plasmídeo pKD4 e para as mutações nos genes *cbiA*, *pduC*, *pduD* e *pduE*, o plasmídeo pKD3.

A técnica do *Lambda-Red* permite que ocorra, ocasionalmente, recombinação dos fragmentos de DNA em outras partes do genoma bacteriano, além da região-alvo. Por isso, adotou-se a técnica de transdução com o bacteriófago ØP22 (vide

item 5.2.4) para a finalização das mutantes SE $\Delta cobS$, SE $\Delta cbiA$ e SE $\Delta pduCDE$. Esta técnica permitiu ainda a construção da mutante dupla SE $\Delta cobS\Delta cbiA$.

SE $\Delta pduCDE$ e SE $\Delta cobS\Delta cbiA$ possuem a mesma resistência ao cloranfenicol, assim, faz-se necessário a retirada do cassete Cf^r da mutante SE $\Delta cobS\Delta cbiA$, antes da formação da mutante tripla SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$. A retirada do gene de resistência ao cloranfenicol foi realizada com auxílio do plasmídeo pCP20 (doado Dr. Paul Barrow em seu laboratório na Universidade de Nottingham, Inglaterra). A região não codificadora da sequência do cassete Cf^r possui sítios de restrição para a enzima *FLP-recombinaSE*, a qual é sintetizada pelo pCP20. Porém, as estirpes SE $\Delta cobS\Delta cbiA$ SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ permaneceram com a marcação que confere resistência ao cloranfenicol.

4.2.1 Escolha da sequência-alvo e construção dos iniciadores

Para inativação dos genes *cobS*, *cbiA* e *pdu*, selecionaram-se as primeiras 50 bases nitrogenadas da sequência alvo e as últimas 50 da fita complementar. A sequência das 50 primeiras bases juntamente com 20 bases da sequência do cassete do antibiótico (sequência que antecede o código de início do cassete) formaram o iniciador direto de mutagênese. As 50 últimas bases da fita complementar e 20 bases da fita complementar do cassete do antibiótico (sequência posterior ao código de parada) formaram o iniciador reverso de mutagênese. Iniciadores direto e reverso (denominados de controle), utilizados para verificação da correta inserção dos cassetes, foram construídos tendo como alvo as sequências anterior e posterior ao local de inserção dos cassetes. Também com o objetivo de verificar a inserção dos cassetes, foram construídos iniciadores direto (C2 e K2) e reverso (C1 e K1), tendo como alvo a sequência central dos cassetes de cloranfenicol ou canamicina. Para construção dos iniciadores foram utilizados os softwares CLC *Sequence viewer* 6.3 (CLC BIO), Artemis v11 (CARVER et al., 2005) e Primer premier 5 (PREMIER BIOSOFT INTERNATIONAL). A Tabela 1 contém as sequências dos iniciadores utilizados.

Tabela 1. Identificação da sequência dos iniciadores utilizados no preparo dos mutantes SE $\Delta pduCDE$ e SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$.

Número	Identificação dos iniciadores	Sequência (5'-3')
1	C1*	ttatacgcaaggcgacaagg
2	C2*	gatcttccgtcacaggtagg
3	K1*	cagtcatagccgaatagcct
4	K2*	ggtgccctgaatgaactgc
5	CBIA CTR D*	cggtgggaagtgggttcga
6	CBIA CTR R*	ggccagtgttgagggtcgcc
7	2 COBS D*	gcagcggcgcatgaggtctg
8	2 COBS R*	gccaggtcgaggtgtagcg
9	PDU CTR D*	ggtccgtcaggcggtgacct
10	PDU CTR R*	agccctgccgcttcacgaac
11	CBIA 50D**	ttaaagttgggccagattaccttgataccggctggcataccgctatctgtggtgtaggctggagctgcttc
12	CBIA 50R**	gtctgccagccgccagtcattcctgtaacacgcggccatcgcaaccta ~~catatgaatatcctccttag~~
13	PDU CDE 50D**	tgaagcactggcgaaacgccctgtgaatcaggacggctttgttaagga ~~gtgtgtaggctggagctgcttc~~
14	PDU CDE 50R**	atctttgcctgataacgggtttcgagatcgtcggcgatagcgagcagctct ~~catatgaatatcctccttag~~
15	COBS 50D**	atgctcgctttattagccgcttgcccgtcacgctggtcgagggaggtgtaggctggagctgcttc
16	COBS 50R**	caagttcgatcgccgcgccagcgatatcgccggttgaccgccaagcgta ~~catatgaatatcctccttag~~

*iniciadores utilizados para verificação da inserção dos marcadores de antibióticos

** iniciadores utilizados para produção de fragmento de DNA recombinante

4.2.2 A amplificação dos fragmentos de DNA recombinante

A amplificação dos fragmentos de DNA recombinante foi realizada por meio da PCR convencional, a solução consistia de: 34 μ L de água ultrapura (SIGMA, W4502), 5 μ L de tampão (10X) para PCR, 2 μ L de $MgCl_2$ (50mM); 2 μ L de dNTP 10 mM, 0,5 μ L de iniciador de mutagênese 1; 0,5 μ L de iniciador de mutagênese 2, 1 μ L de Taq DNA polimerase convencional (5 U/ μ L) e 2 μ L de DNA plasmidial.

Foi utilizando um termociclador convencional (BIO-RAD, MyCycler) com a seguinte programação: um ciclo de 94°C por três minutos; 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 68°C por 120 segundos; um ciclo final de alongação de 68°C por sete minutos e o resfriamento da amostra a 4°C por 30 minutos.

4.2.3 Precipitação dos fragmentos de DNA recombinantes

Os produtos da PCR de cada fragmento (total 250 µL por fragmento) foram colocados em microtubos de 2 mL e precipitados utilizando-se o kit comercial Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (ThermoScientific, K0513, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. O DNA foi então suspenso em 20 µL de água ultrapura (SIGMA, W4502) e armazenado a – 20°C até o momento da eletroporação.

4.2.4 Eletroporação

A eletroporação foi utilizada para inserção dos fragmento de DNA recombinante ou plasmidial, sendo um procedimento no qual pulsos curtos de alta voltagem ultrapassam a barreira da membrana celular, promovendo um rearranjo estrutural desta membrana, tornando-a altamente permeável a moléculas exógenas presentes no meio externo. Para tanto, utilizou-se uma mistura contendo 80 µL de uma suspensão de SE (aproximadamente 1×10^9 bactérias) e 10 µL da solução contendo DNA (plasmidial ou fragmentos de DNA recombinante). A eletroporação foi realizada em eletroporador Gene Pulser Xcell (BIO-RAD), utilizando-se cubetas de 2 mm de largura, voltagem de 2,5 kV, capacitância de 25 µF e resistência de 200 mΩ.

4.2.5 Transdução

O preparo das mutantes (SE $\Delta cobS$, SE $\Delta cbiA$, SE $\Delta pduCDE$ e SE $\Delta cobS\Delta cbiA$) foi finalizado empregando-se a técnica de transdução com o bacteriófago ØP22 (WING, 1968; SAMBROOK; RUSSEL, 2001), multiplicado na estirpe SE. Preparou-se a cultura de SE em caldo nutriente (oxid: CM0001)

incubado a 37°C/24 horas em agitação. Dessa cultura, contendo aproximadamente $1,0 \times 10^9$ UFC/mL, transferiu-se 1 mL para tubo contendo 10 mL de caldo nutriente (oxoid: CM0001), juntamente com 1 mL de uma solução de bacteriófago, contendo cerca de $1,0 \times 10^{10}$ ØP22/mL. Após incubação a 37°C/24 horas em agitação, centrifugou-se a cultura a 4000 Xg por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi filtrado (filtro Millipore 0,45 µm) e procedeu-se a contagem em ágar nutriente com camada de SE.

As estirpes SE $\Delta cobS$, SE $\Delta cbiA$ e SE $\Delta pduCDE$ foram cultivadas em 10 mL de caldo nutriente, com incubação a 37°C/24 horas estaticamente. As culturas apresentaram, em torno de $5,0 \times 10^8$ UFC/mL. A essas culturas adicionou-se a solução do bacteriófago ØP22 na proporção de 0,03 ØP22/1 bactéria. A mistura foi incubada a 37°C/24 horas em agitação. A seguir, centrifugou-se o cultivo a 4000 Xg/20 minutos/4°C, filtrou-se o sobrenadante (filtro Millipore 0,45 µm) e procedeu-se à contagem das placas de lise do ØP22 em ágar nutriente (oxoid: CM0003) com camada de SE.

A solução de bacteriófago cultivada em cada estirpe foi adicionada à cultura da bactéria receptora seguindo-se a proporção de 0,8 ØP22/1 bactéria. Para a obtenção de bactérias em quantidade desejável, a cultura (10 mL de caldo nutriente) foi centrifugada a 4000 Xg/4°C/20 minutos e o sedimento ressuspendido em 1 mL de caldo nutriente. A mistura foi incubada a 37°C por 30 min, estaticamente e depois espalhada em placas de ágar nutriente (oxoid: CM0003) contendo cloranfenicol e/ou canamicina na concentração de 20 µg/mL, que foram incubadas a 37°C/24 horas. Por fim, as colônias foram ainda testadas com acrilflavina, para verificação do LPS e submetidas à técnica da PCR para confirmação dos resultados

4.2.6 Verificação da mutação nas estirpes de *Salmonella* spp.

A verificação da mutação nas estirpes de *Salmonella* spp. foi realizada pela PCR das regiões do genoma onde os cassetes foram inseridos. Para cálculo do tamanho dos "amplicons", foram utilizados os softwares Artemis v11 (CARVER et al., 2005) e CLC SEquence viewer 6.3 (CLC BIO). O DNA genômico das estirpes mutantes foi extraído pelo método de fervura. A PCR foi realizada com três

combinações de iniciadores: direto controle + reverso controle, direto controle + C1 ou K1 (a depender do cassete que foi inserido) e reverso controle + C2 ou K2. As concentrações de reagentes utilizadas para a amplificação dos fragmentos de DNA consistiam de 17 µL de água ultrapura (SIGMA, W4502); 2,5 µL de tampão (10X) para PCR; 1 µL de MgCl₂ (50 mM) (Invitrogen, y02016b); 1 µL de dNTP (10 mM) (Fermentas, R0191); 1 µL de iniciador 1; 1µL de iniciador 2; 0,5 µL de Taq DNA polimerase 500 U (Thermo Scientific, EP0402) e 1 µL de DNA.

A PCR foi realizada em termociclador convencional (BIO-RAD, MyCycler) com a seguinte programação: um ciclo de 94°C por três min; 35 ciclos de 94°C por 20 segundos, 62°C por 30 segundos e 72°C por 120 segundos; um ciclo final de extensão de 72°C por cinco minutos e o resfriamento da amostra a 4°C por 30 minutos.

Amostras dos *amplicons* foram submetidas à eletroforese em gel de agarose para verificação dos tamanhos (Aparelho: *Consort* E863, 600 V 250 mA, cuba *Horizon* 11-14 CE, *Life Technology*). Utilizou-se 30 mL de gel composto por agarose a 1%, diluída em solução tampão TAE (4,84 g de TRIS base, 1 mL de ácido acético glacial, 2 mL de EDTA 0,5 M e água qsp 1000mL, pH 8,0). Nas amostras, juntamente com o marcador de peso molecular (1 µL de GeneRuler 1 kb DNA Ladder, 1 µL de solução corante), foi acrescentado 1 µL de solução GelRed (Biotium) e submetidos a uma corrente elétrica de 40 V por duas horas. O gel foi colocado sob luz ultravioleta e fotografado para visualização das bandas.

4.3 Experimento 1

4.3.1 Aves experimentais

Foram utilizadas 105 aves de variedade branca e 105 aves de variedade vermelha, de linhagem comercial para postura de ovos de mesa, com um dia de vida, instaladas em baterias contendo água e ração *ad libitum*.

4.3.2 Ensaios *in vivo*: Avaliação da infecção sistêmica e pesquisa de *Salmonella* Enteritidis em conteúdo cecal

O ensaio *in vivo* foi realizado no aviário experimental do Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Câmpus de Jaboticabal/SP.

Aves de postura de variedade branca foram desafiadas com *Salmonella* Enteritidis (SE) (grupo A), SE $\Delta pduCDE$ (grupo B) e SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo C); e de variedade vermelha foram desafiadas com *Salmonella* Enteritidis (SE) (grupo D), SE $\Delta pduCDE$ (grupo E) e SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo F),. Cada grupo foi composto por 35 aves. Com um dia de idade, as aves receberam, oralmente, 0,1 mL de cultura da estirpe selvagem e das estirpes mutantes (contendo aproximadamente 2×10^8 UFC/mL), preparadas em Caldo Lennox (LB) (BD, 240230) e incubadas a 37°C/16 horas em agitação.

Cinco aves, de cada grupo, foram eutanasiadas, por deslocamento cervical, aos dois, três, cinco, sete, 14, 21 e 28 dias pós-infecção (dpi) para contagem de bactérias em fígado, baço e conteúdo cecal.

4.3.3 Processamento das amostras

As amostras de tecido e conteúdo cecal foram colhidas e colocadas em solução salina tamponada com fosfatos, pH 7,4 (PBS) na proporção de 1:10. O baço e o fígado foram macerados e o conteúdo cecal foi homogeneizado, em seguida procedeu-se à diluição seriada decimalmente em PBS. De cada diluição foi retirado 0,1 mL, espalhando em placas contendo ágar verde brilhante (Brilhante Green Agar, oxoid, CM0263) com espectinomicina (100 µg/mL) e ácido nalidíxico (25 µg/mL) para a estirpe selvagem e cloranfenicol (20 µg/mL) para as estirpes mutantes. As placas foram incubadas 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 colônias, aos respectivos frascos contendo as amostras homogeneizadas em PBS (1:10), adicionou-se igual volume de caldo selenito (Selenite Broth Base, oxoid, CM0395) contendo novobiocina (0,04%), preparado em concentração dupla, utilizando incubação a 37°C por 24 horas. Após incubação, as

amostras foram semeadas em ágar verde brilhante contendo seus respectivos antibióticos e incubadas a 37°C por 24 horas.

4.3.4 Análise estatística dos resultados

As contagens da estirpe selvagem e das estirpes mutantes em órgãos e conteúdo cecal ($\log_{10}$) das aves foram estatisticamente analisadas pelo teste de Tukey (Assistat 7.7 beta) com nível de significância de 5% ($P < 0,05$) (DANIEL, 1991).

4.4 Experimento 2

4.4.1 Aves experimentais

Foram utilizadas 108 aves de variedade branca e 108 aves de variedade vermelha, de linhagem comercial para postura de ovos de mesa, com um dia de vida, instaladas em baterias contendo água e ração *ad libitum*. O experimento foi conduzido no aviário experimental do Departamento de Patologia Veterinária, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Câmpus de Jaboticabal/SP.

4.4.2 Avaliação da excreção fecal

As aves foram distribuídas em seis grupos, contendo 36 aves cada. No primeiro dia de vida, as aves receberam, via oral, 0,1 mL de cultura microbiana preparada em caldo Difco™ LB Broth, Lennox (BD, 240230) e incubadas a 37°C/24 horas, em agitação, contendo aproximadamente 2×10^8 UFC/mL). Aves de postura de variedade branca foram desafiadas com *Salmonella* Enteritidis (SE) (grupo A), SE $\Delta pduCDE$ (grupo B) e SE $\Delta cobS \Delta cbiA \Delta pduCDE$ (grupo C); e de variedade vermelha foram desafiadas com *Salmonella* Enteritidis (SE) (grupo D), SE $\Delta pduCDE$ (grupo E) e SE $\Delta cobS \Delta cbiA \Delta pduCDE$ (grupo F). As aves foram observadas durante quatro semanas, procedendo-se à pesquisa da excreção fecal de SE por meio da colheita de fezes cloacais com suabes estéreis de algodão, nos

dias um, seis, oito, 13, 15, 20, 22 e 27 pós-infecção. Os suabes foram colocados em tubos contendo 2 mL de caldo SN e, após agitação, as estirpes mutantes foram semeadas em ágar verde brilhante contendo cloranfenicol (20 µg/mL). A estirpe selvagem foi semeada em ágar verde brilhante contendo espectinomicina (100 µg/mL) e ácido nalidíxico (25 µg/mL). Os tubos e as placas foram incubados a 37°C por 24 horas.

4.4.3 Análise estatística dos resultados

Os dados obtidos pela avaliação da excreção fecal foram analisados estatisticamente pelo teste não paramétrico de qui-quadrado (GraphPad Prism, versão 5.01) com nível de significância de 5% (GREENWOOD; NIKULIN, 1996).

4.5 Experimento 3

4.5.1 Delineamento experimental

Foram utilizadas 72 aves livres de patógenos específicos (Specific Pathogen Free – SPF) com um dia vida, instaladas em baterias contendo água e ração *ad libitum*. O experimento foi conduzido no aviário experimental do Departamento de Patologia Veterinária, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Câmpus de Jaboticabal/SP.

As aves foram divididas em quatro grupos, contendo 18 aves cada. No primeiro dia de vida, as aves receberam, via oral, 0,1 mL de cultura da estirpe selvagem e das estirpes mutantes (contendo aproximadamente 2×10^8 UFC/mL), preparadas em caldo Lennox (LB) (BD, 240230) e incubadas a 37°C por 24 horas em agitação (contendo aproximadamente 1×10^9 UFC/mL). As aves do grupo G receberam a estirpe SE, do grupo H, a estirpe SE $\Delta pduCDE$, do grupo I a estirpe SE $\Delta cobS \Delta cbiA \Delta pduCDE$. As aves pertencentes ao grupo J não foram desafiadas.

4.5.2 Colheita de Material

Três aves de cada grupo foram eutanasiadas para a colheita do material aos um, três, sete e 14 dpi. Amostras de baço e tonsilas cecais foram colhidas assepticamente e submergidas imediatamente em RNA later (Qiagen), para a estabilização do RNA, armazenadas a -80°C até o momento do processamento. Nos mesmos períodos, foram colhidas amostras de fígado e tonsilas cecais, os fragmentos foram imersos em solução crioprotetora de N-hexano (Synth), congelados imediatamente em nitrogênio líquido e estocados em freezer -80°C , onde permaneceram até serem cortados em micrótomo criostato (CM1950; Leica Microsystems, Alemanha). Os cortes foram armazenados a -20°C até a realização da técnica de imuno-histoquímica. Amostras de fígado e conteúdo cecal foram colhidas das aves para estimativa das estirpes, de acordo o item 4.5.3.

4.5.3 Ensaios *in vivo*: Avaliação da infecção sistêmica e pesquisa de *Salmonella* Enteritidis em conteúdo cecal

Para possíveis alterações da resposta imune induzidas pelas estirpes de SE utilizadas no desafio, com a eliminação tecidual ou intestinal desses micro-organismos, estimaram-se paralelamente suas quantidades em fígado e conteúdo cecal. Para isso, três aves de cada grupo foram eutanasiadas para colheita de amostras de fígado e conteúdo cecal aos um, três, sete, 14, 21 e 28 dias dpi. Os fragmentos foram colocadas em solução salina tamponada com fosfatos, pH 7,4 (PBS) na proporção de 1:10. O fígado foi macerado e o conteúdo cecal foi homogeneizado. Em seguida, procedeu-se à diluição seriada decimalmente em PBS. De cada diluição, retirou-se 0,1 mL que foi semeado em placas contendo ágar verde brilhante com ácido nalidíxico (25 $\mu\text{g/mL}$) para a estirpe selvagem e cloranfenicol (20 $\mu\text{g/mL}$) para as estirpes mutantes. As placas foram incubadas a $37^{\circ}\text{C}/24$ horas. O número de colônias por grama de órgão foi transformado em $\log_{10}$ para análise dos resultados.

Na ausência de colônias, aos respectivos frascos contendo as amostras homogeneizadas em PBS (1:10), adicionou-se igual volume de caldo selenito

(Selenite Broth Base, oxoid, CM0395) contendo novobiocina (0,04%), preparado em concentração dupla, utilizando incubação a 37°C por 24 horas. Após incubação, as amostras foram semeadas em ágar verde brilhante contendo seus respectivos antibióticos e incubadas a 37°C por 24 horas.

4.5.4 Processamento das amostras colhidas para a quantificação relativa da expressão gênica de citocinas

4.5.4.1 Extração de RNA

O procedimento de extração do RNA total das amostras de baço e tonsilas cecais foi realizado utilizando-se o kit RNeasy Mini Kit (QIAGEN 74106), seguindo as recomendações do fabricante. Para a quantificação da concentração de RNA extraído das amostras, foi utilizado o equipamento NanoDrop® (Thermo Scientific), em seguida as amostras de RNA foram armazenadas -80 °C, até serem utilizadas para obtenção de cDNA pela reação da transcrição reversa.

4.5.4.2 Transcrição reversa (RT)

Para a síntese do cDNA, a reação de transcrição reversa foi realizada em um Termociclador PTC – 200 Peltier Thermal Cyclor (MJ Research) utilizando-se o QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN 205313). O cDNA foi então armazenado a -20 °C até a utilização para a PCR em tempo real.

4.5.4.3 Construção dos iniciadores

Para construção dos iniciadores, primeiramente foram obtidas as sequências dos genes (IL-6, CCL4, CXCLi2, IL-18 e IL-22) na base de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>). Em seguida, os iniciadores foram desenhados utilizando-se o software IDT Integrater, DNA Technologies (<http://www.idtdna.com/site>) e analisadas pelos softwares UCSC Genome Bioinformatics (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgblat>) e *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A Tabela 2 contém as sequências dos iniciadores utilizados.

Tabela 2. Sequência dos iniciadores utilizados para avaliação de citocinas por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real.

Iniciadores	Sequencia (5' → 3')	pb	Eficiência (%)
IL-6 D	GATCCGGCAGATGGTGATAAA	142	94,6
IL-6 R	CGAAGTAAAGTCTCGGAGGATG	142	94,6
CCL4 D	GCAGTTGTTCTCGCTCTTCT	113	109,3
CCL4 R	CGCGGGATCTTGTGTGTTAT	113	109,3
CXCLi2 D	ATGAACGGCAAGCTTGAGCT	94	91,6
CXCLi2 R	GCAGCTCATTCCCCATCTT	94	91,6
IL-22 D	CAGACTCATCGGTCAGCAAA	122	111,2
IL-22 R	GGTACCTCTCCTTGGCCTCT	122	111,2
GAPDH D	CCTGCATCTGCCCATT	61	101,8
GAPDH R	GGCACGCCATCACTATC	61	101,8
IL-18 D	ACGTGGCAGCTTTTGAAGAT	88	112,6
IL-18 R	GCGGTGGTTTTGTAACAGTG	88	112,6

D = iniciador direto; R = iniciador reverso. pb = pares de base.

4.5.4.4 PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

Três aves de cada grupo foram eutanasiadas para colheita de fragmentos de tonsilas cecais e baço (item 4.5.2). As amostras foram colocadas diretamente em RNAlater (Sigma-Aldrich, UK) e armazenadas a -80°C até a sua utilização. O RNA

total foi extraído utilizando RNeasy Mini Kit (Qiagen, US), seguindo as instruções do fabricante e armazenado em seguida a -80°C até à sua utilização. Posteriormente, as amostras de RNA foram transformadas em cDNA utilizando-se o QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, US), seguindo as instruções do fabricante e mantidas a -20°C até a realização da qRT-PCR.

Os níveis de CXCLi2, CCL4, IL-6 e IL-22 foram medidos em tonsilas cecais nos dias um, três e sete dpi e IL-6 e IL-18, em baços, nos dias três, sete e 14 dpi, utilizando-se o termociclador Real-CFX96 TouchTM termocycler (Bio-Rad). A reação foi realizada usando 6,25 uL de SYBR Green Jump Start Taq Ready Mix (Sigma-Aldrich, UK), 0,6 pmol de cada iniciador, 50 ng de cDNA e água ultrapura (SIGMA, W4502) completando um volume final de 12,5 mL. A sequência de ciclos utilizada foi: 94°C durante 2 min, seguido de 39 ciclos a 94°C durante 15 segundos e 58 °C durante 1 min. Os iniciadores utilizados estão descritos na Tabela 1 e GAPDH foi escolhido como gene de referência. Os valores do threshold cycle (C_T) dos genes alvos foram normalizados a partir de um valor médio de C_T do gene de referência e a expressão relativa de cada um foi calculada como descrito por Livak e Schmittgen (2001), considerando-se as eficiências de cada iniciador.

4.5.4.5 Análise imuno-histoquímica

As amostras de fígado e tonsila cecal foram usadas para preparar seções de tecido congelado (10 µm) em um micrótomo criostato a -20°C (CM1950; Leica Microsystems, Alemanha). Os cortes foram fixados em acetona gelada durante 10 minutos antes de serem utilizados para a imuno-histoquímica. Inicialmente, as lâminas foram secas ao ar, e os cortes foram incubados com solução de peróxido de hidrogênio 4% durante 10 minutos em temperatura ambiente. Depois de lavar as lâminas durante 5 minutos com solução tampão PBS (pH 7,4), os cortes foram bloqueados com solução Protein Block® (Dako, EUA) durante 20 min à temperatura ambiente, em seguida, as lâminas foram incubadas por 18 horas a 4°C com os anticorpos monoclonais CD8⁺ ou CD4⁺ de galinha, ambos diluídos na razão 1:200 (8220-01 e 8210-01, Southern Biotechnology, EUA). Após incubação, os cortes foram lavados com PBS durante cinco minutos e incubadas durante 30 minutos com

o anticorpo secundário biotinilado (DCMT-999, REVEAL Complement, Spring Bioscience, CA, USA) e 30 minutos utilizando substrato estreptavidina-biotina peroxidase (DHRR-999, REVEAL HRP Conjugate, Spring Bioscience, California, USA). O cromógeno utilizado foi o 3,3'-diaminobenzidina (DAB; Merck; Alemanha). A contracoloração foi feita com hematoxilina de Harris. Posteriormente, os cortes foram desidratados, diafanizados e montados utilizando Entellan (Merck, Alemanha). Para cada corte, quatro regiões de interesse foram aleatoriamente fotografadas em microscópio de luz (Eclipse E200, Moticam 2300; Nikon, Japão) em objetiva 40x (área de 0,19625 mm²). A porcentagem de linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺ marcados foi calculada com o software de análise de imagem (ImageProPlus; MediaCybernetics, EUA).

4.5.4.6 Análise estatística dos resultados

As contagens de Salmonella em fígado e conteúdo cecal (log10) das aves, os valores do *threshold cycle* (CT) dos genes alvos normalizados foram estatisticamente analisadas pelo teste de Tukey com nível de significância de 5% (DANIEL, 1991). A porcentagem de linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺ marcados foram estatisticamente analisadas pela análise de variância, sendo necessário passarem por uma transformação angular = $\arcsen(\sqrt{\text{proporção}})$, sendo analisados, em seguida, pelo teste de Tukey com nível de significância de 5% (DANIEL, 1991). Os testes foram realizados com auxílio do programa estatístico “R” (CHAMBERS, 2008).

5 RESULTADOS

5.1 Preparo dos mutantes

A Figura 4 contém os produtos da amplificação dos fragmentos de DNA recombinante utilizados para provocar mutação nos genes *cbiA*, *cobS* e *pduCDE*.

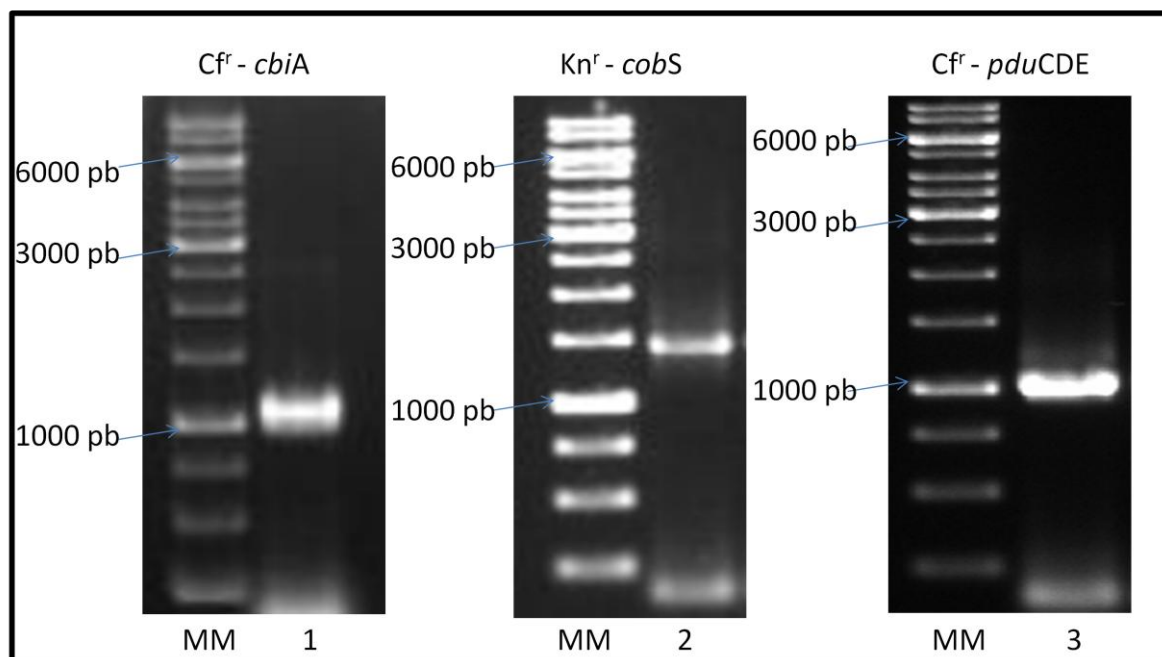


Figura 4. Eletroforograma em gel de agarose 1%. MM: marcador de tamanho molecular (GeneRuler 1 kb DNA Ladder), 1: fragmento de DNA recombinante do gene *cbiA*, 2: fragmento de DNA recombinante do gene *cobS*, 3: fragmento de DNA recombinante do gene *pduCDE*.

As Figuras 5, 6 e 7 apresentam os produtos amplificados dos cassetes de antibióticos que substituíram parte dos genes *cobS*, *cbiA* e *pduCDE* na estirpe SE.

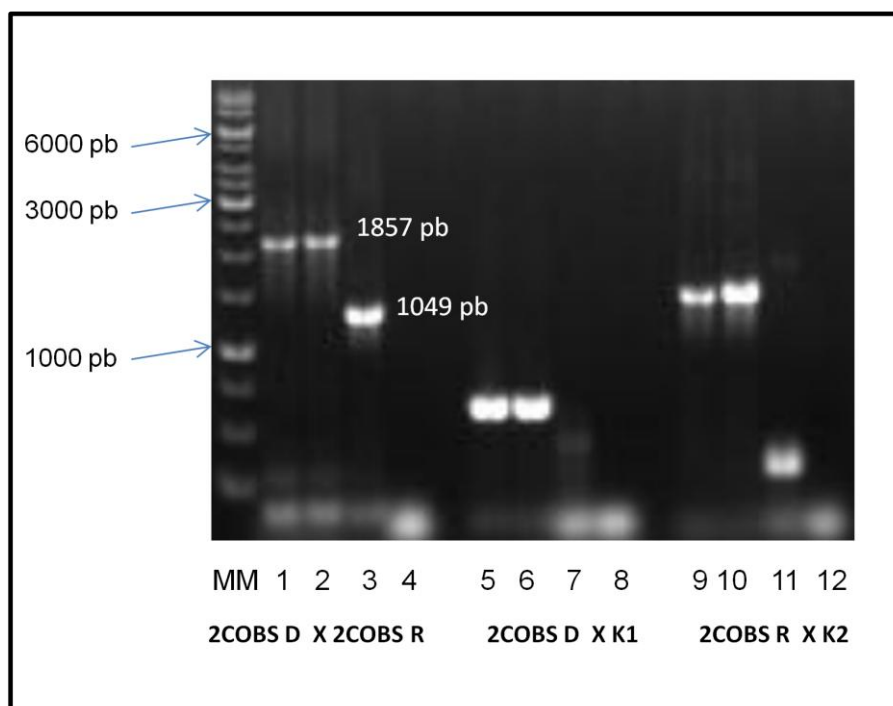


Figura 5. Eletroforograma em gel de agarose 1%. MM: marcador de tamanho molecular (GeneRuler 1 kb DNA Ladder). 1, 2, 5, 6, 9 e 10 correspondem à estirpe SE $\Delta cobS$; 3, 7 e 11 correspondem à estirpe SE (selvagem); 4, 8 e 12 seriam controles negativos da reação.

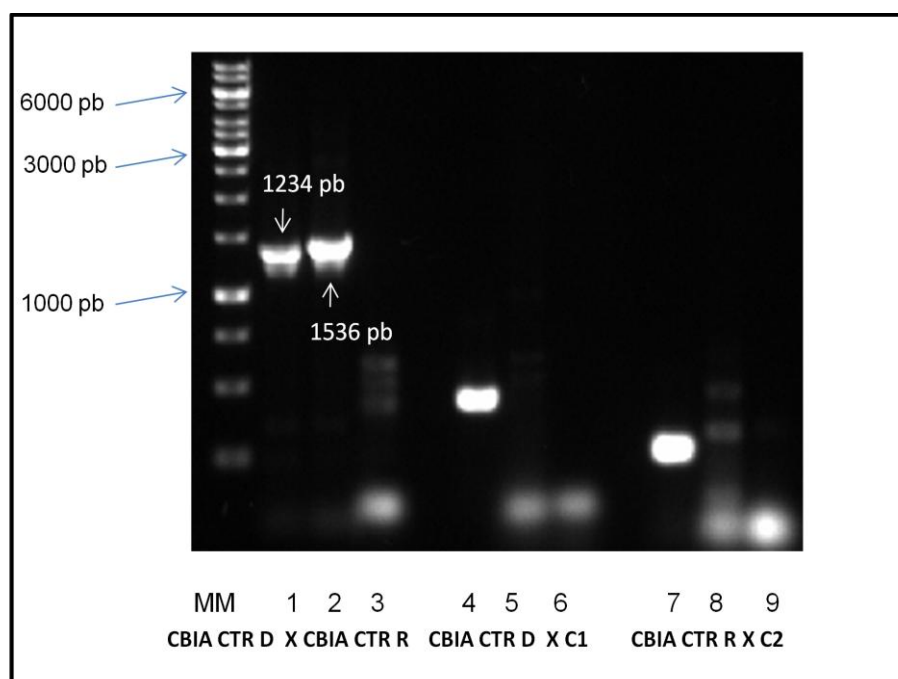


Figura 6. Eletroforograma em gel de agarose 1%. MM: marcador de tamanho molecular (GeneRuler 1 kb DNA Ladder). 1, 4 e 7 correspondem à estirpe SE $\Delta cbiA$; 2, 5 e 8 correspondem à estirpe SE (selvagem); 3, 6 e 9 são os controles negativos de cada reação.

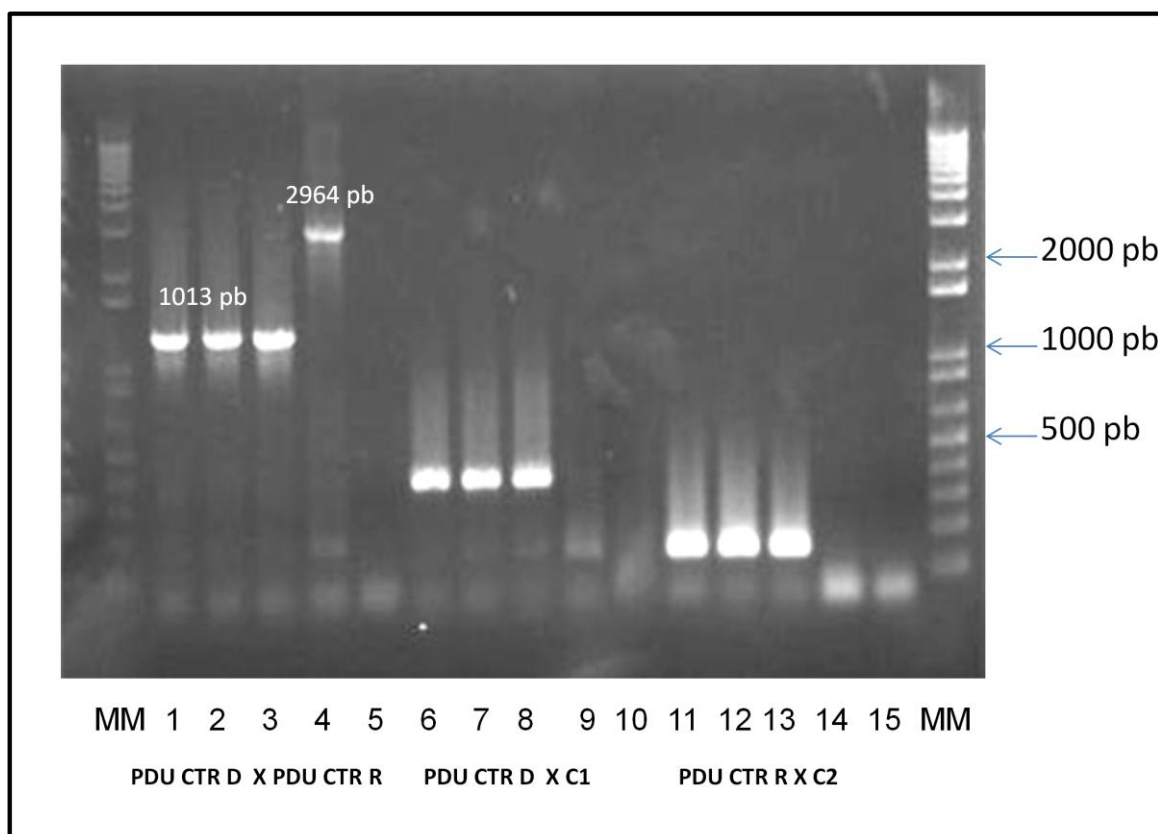


Figura 7. Eletroforograma em gel de agarose 1%. MM: marcador de tamanho molecular (1kb DNA Ladder, Invitrogen™). 1, 2, 3, 7, 8, 9, 10, 11 e 12 correspondem à estirpe SE $\Delta pduCDE$; 4, 9 e 14 correspondem à estirpe SE (selvagem); 5, 10 e 15 são os controles negativos das reações.

A partir das Figuras 5, 6 e 7 confirmou-se a correta inserção dos fragmentos de DNA recombinantes em SE.

5.2 Experimento 1

5.2.1 Ensaio *in vivo*: Avaliação da infecção sistêmica e pesquisa de *Salmonella* Enteritidis em conteúdo cecal

Durante toda a fase experimental não foi observada mortalidade em aves dos diferentes grupos. Os sinais clínicos iniciaram-se aos três dias pós-infecção (dpi), ocasião em que as aves pertencentes aos grupos A, B, C, D, E e F (infectadas)

começaram a apresentar diarreia com traços de sangue, sendo que esse sinal persistiu até o 12º dpi.

As Figuras 8, 9 e 10 apresentam os resultados das médias das contagens bacterianas em fígado, baço e conteúdo cecal de aves das variedades branca, pertencentes aos grupos A, B e C; e vermelha, pertencentes aos grupos D, E e F. Ao comparar as contagens bacterianas em fígado de aves das duas variedades (Figura 8), pode-se notar que houve maior recuperação de SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo F) aos sete dpi e de SE (grupo D) e SE $\Delta pduCDE$ (grupo E) aos 14 dpi em aves da variedade vermelha ($P < 0,05$).

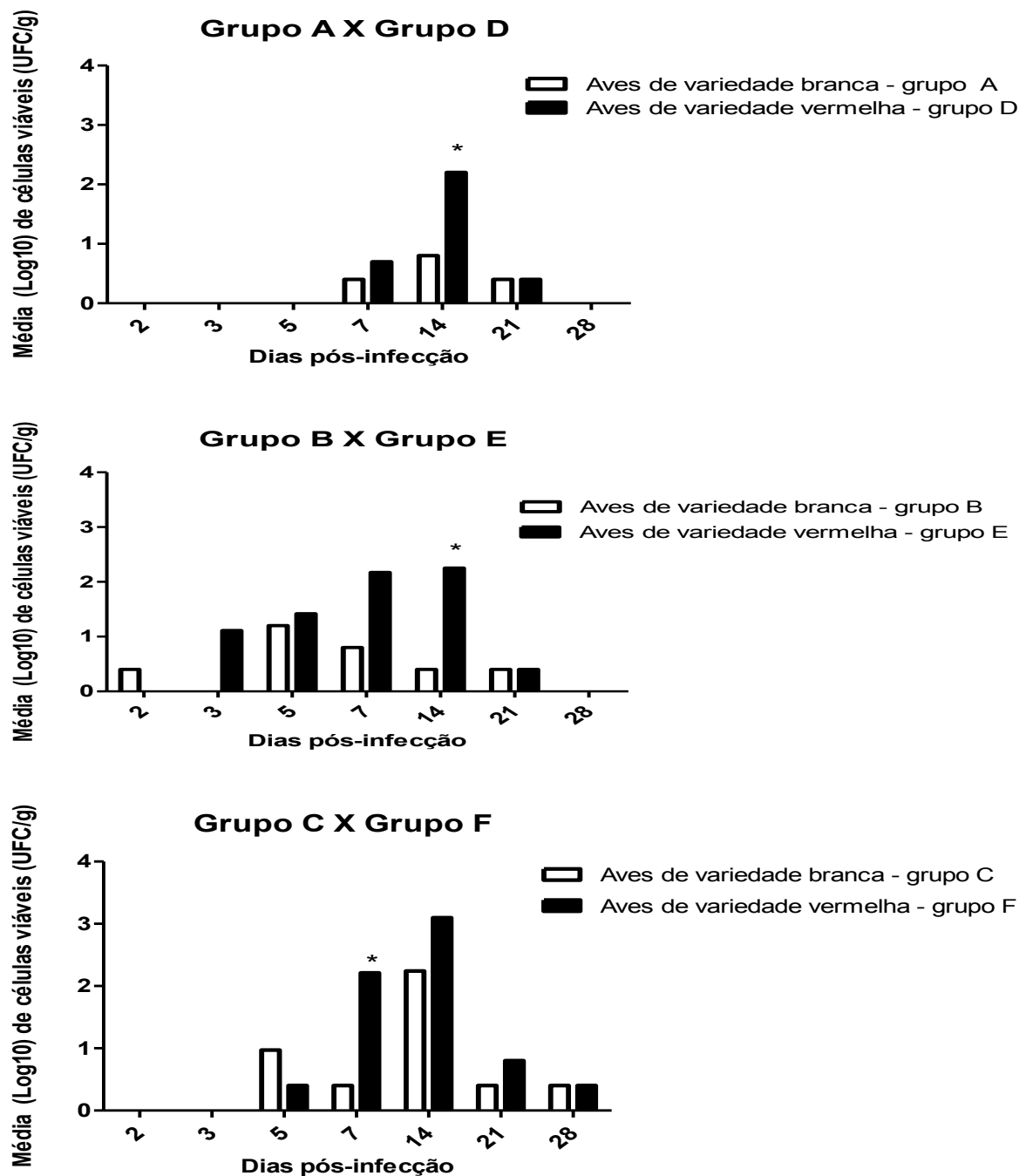


Figura 8. Comparativo entre as médias ($\log_{10}$) de células bacterianas viáveis (UFC/g) em amostras de fígado de aves de postura de variedade branca, desafiadas com *Salmonella* Enteritidis (SE) (grupo A), SE $\Delta pduCDE$ (grupo B) e SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo C); e de variedade vermelha, desafiadas com *Salmonella* Enteritidis (SE) (grupo D), SE $\Delta pduCDE$ (grupo E) e SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo F), no primeiro dia de vida. Asterisco indica diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

As contagens bacterianas de SE $\Delta pduCDE$ em baço de aves da variedade vermelha (grupo E), foram superiores ($P < 0,05$) as encontradas em aves brancas (grupo B) aos três e cinco dpi. Além disso, aos 28 dpi, SE $\Delta cobS \Delta cbiA \Delta pduCDE$ foi recuperada em maior quantidade em baço de aves vermelhas (grupo F, Figura 9).

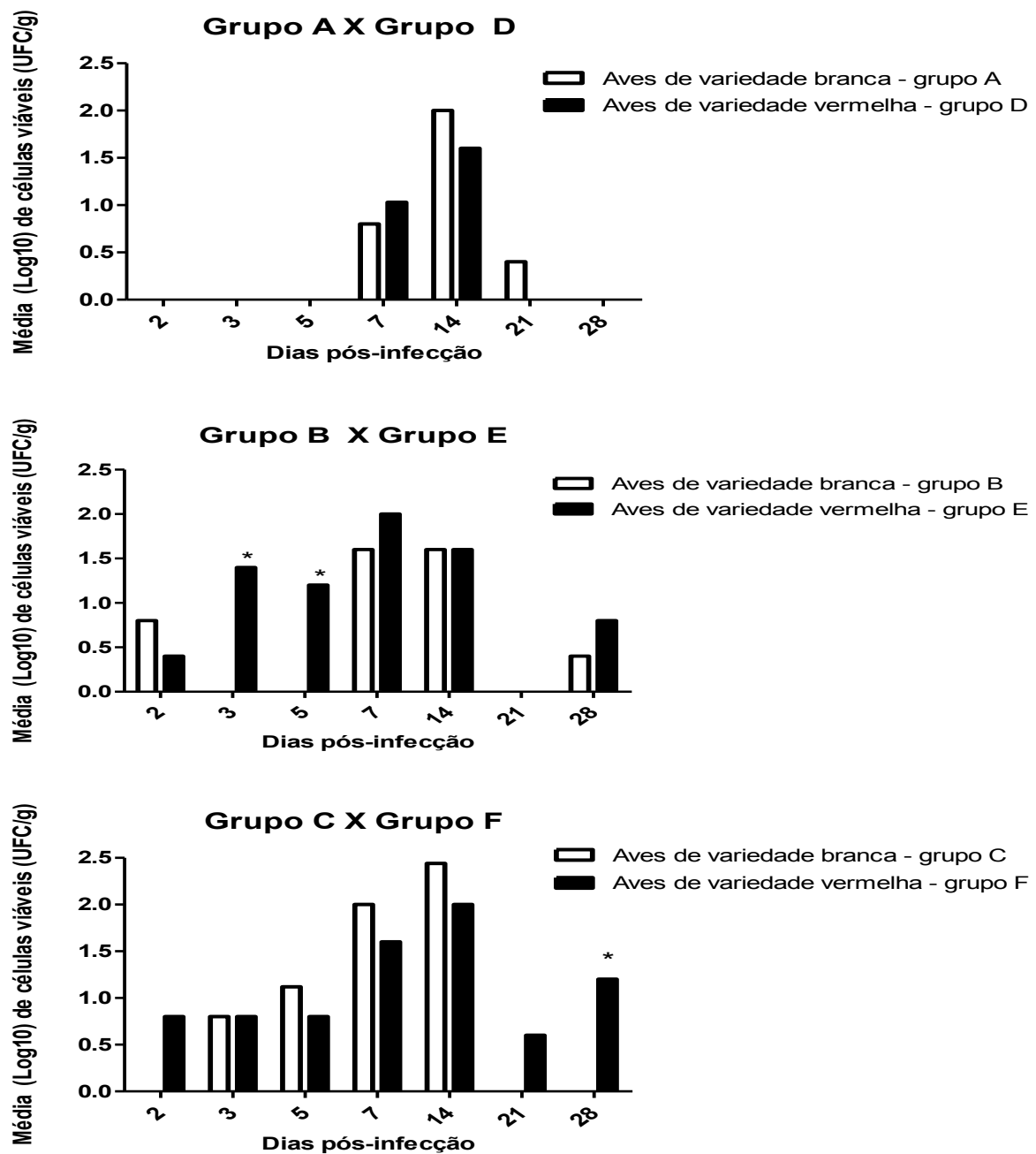


Figura 9. Comparativo entre as médias ($\log_{10}$) de células bacterianas viáveis (UFC/g) em amostras de baço de aves de postura de variedade branca, desafiadas com *Salmonella* Enteritidis (SE) (grupo A), SE $\Delta pduCDE$ (grupo B) e SE $\Delta cobS \Delta cbiA \Delta pduCDE$ (grupo C); e de variedade vermelha, desafiadas com *Salmonella* Enteritidis (SE) (grupo D), SE $\Delta pduCDE$ (grupo E) e SE $\Delta cobS \Delta cbiA \Delta pduCDE$ (grupo F), no primeiro dia de vida. Asterisco indica diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Não houve diferença significativa entre a recuperação das estirpes SE, SE $\Delta pduCDE$ e SE $\Delta cobS \Delta cbiA \Delta pduCDE$ em conteúdo cecal de aves das duas variedades ($P > 0,05$) (Figura 10) .

CONTEÚDO CECAL

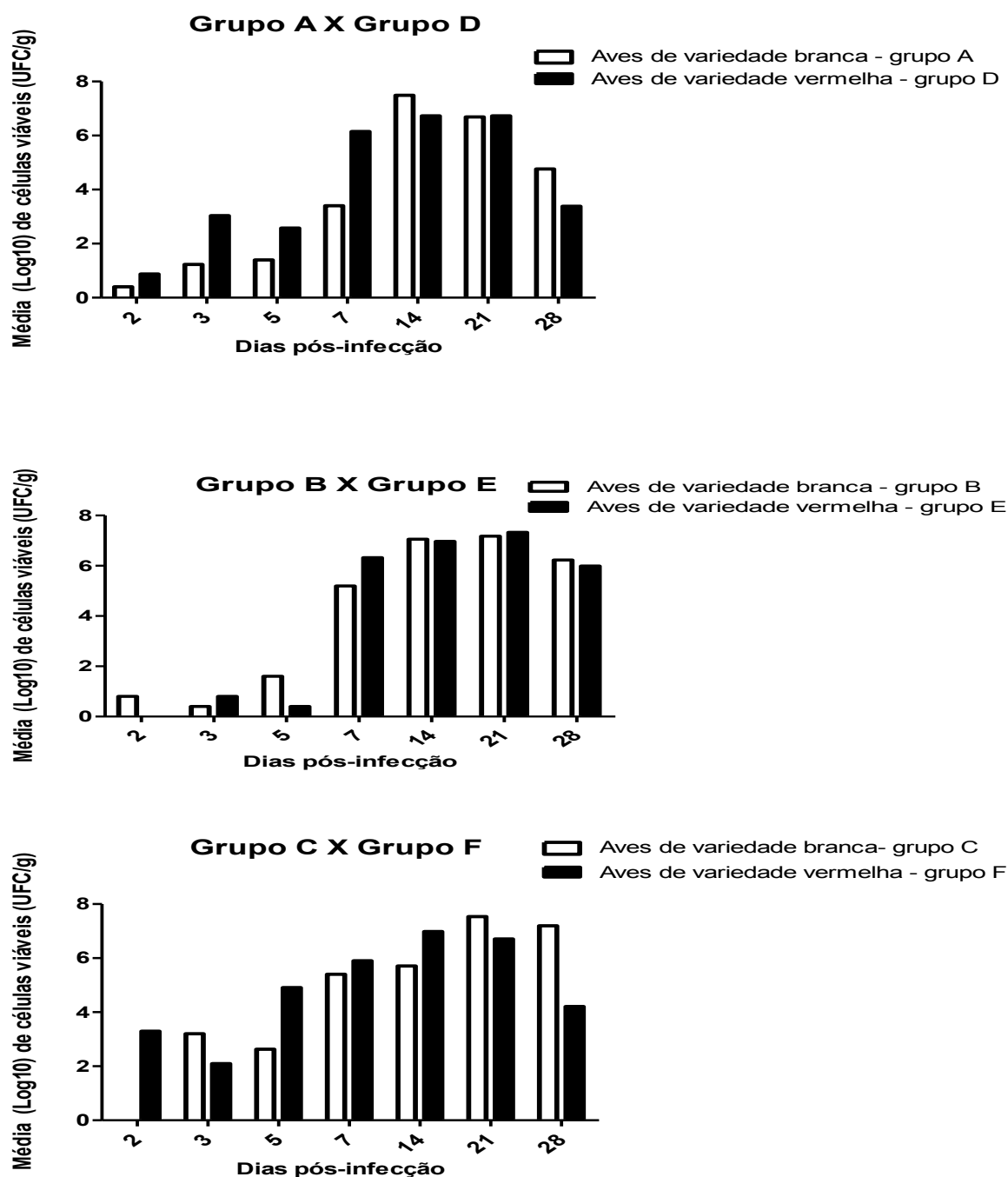


Figura 10. Comparativo entre as médias (log10) de células bacterianas viáveis (UFC/g) em amostras de conteúdo cecal de aves de postura de variedade branca, desafiadas com *Salmonella* Enteritidis (SE) (grupo A), SE $\Delta pduCDE$ (grupo B) e SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo C); e de variedade vermelha, desafiadas com *Salmonella* Enteritidis (SE) (grupo D), SE $\Delta pduCDE$ (grupo E) e SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo F), no primeiro dia de vida. Asterisco indica diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

As Figuras 11 e 12 apresentam a comparação das médias das contagens das estirpes recuperadas em fígado, baço e conteúdo cecal nas duas variedades de aves. A contagem das estirpes mutantes em fígado de aves de variedade branca foram superiores as de SE aos 14 dpi (Figura 11).

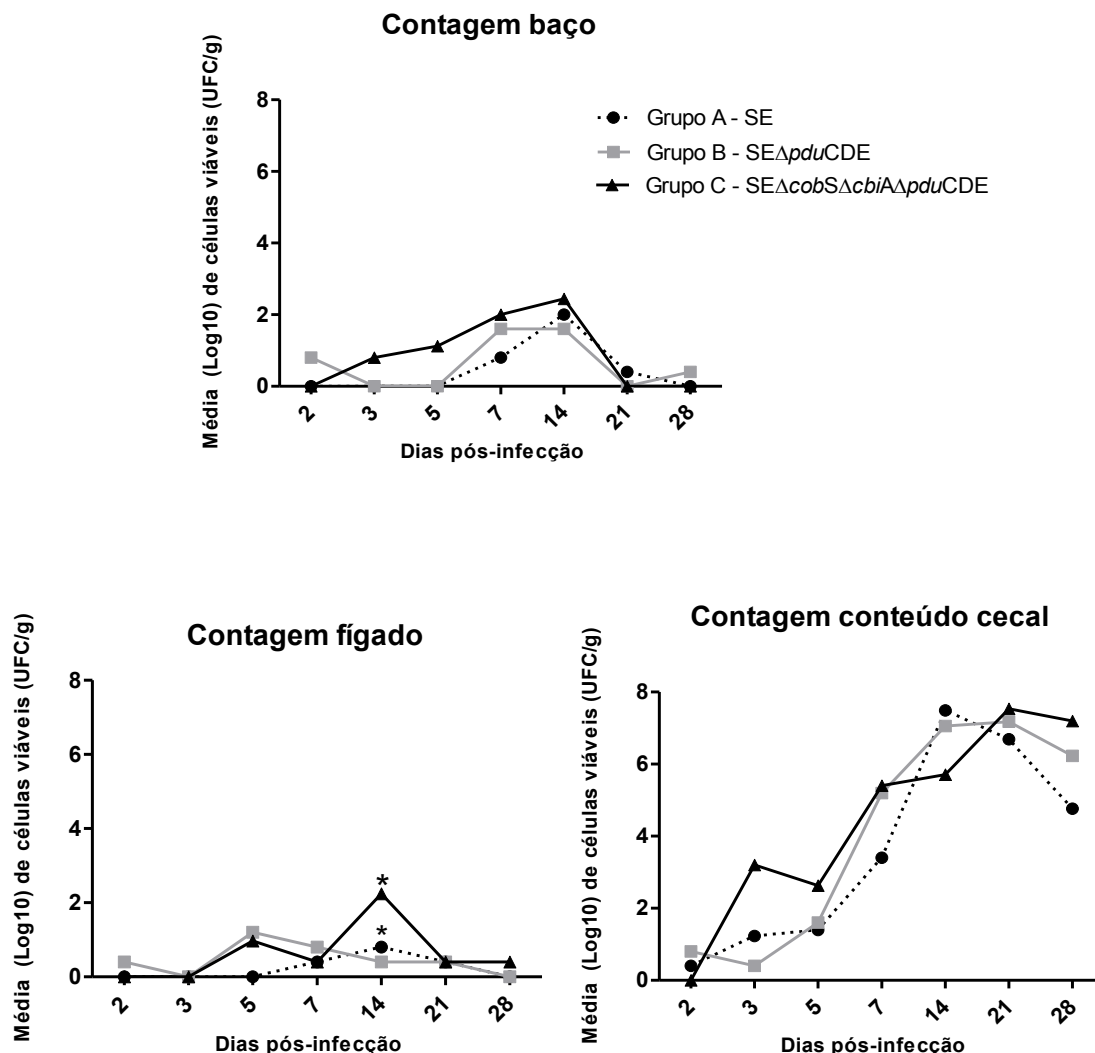


Figura 11. Média ($\log_{10}$) de células bacterianas viáveis (UFC/g) em amostras de baço fígado e conteúdo cecal de aves de postura de variedade branca desafiadas com *Salmonella* Enteritidis (SE) (grupo A), SE Δ pduCDE (grupo B) e SE Δ cobS Δ cbiA Δ pduCDE (grupo C). Asterisco indica diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Aos cinco dpi, as estirpes mutantes foram recuperadas em maior quantidade que a estirpe selvagem (SE) em conteúdo cecal de aves da variedade vermelha (Figura 12).

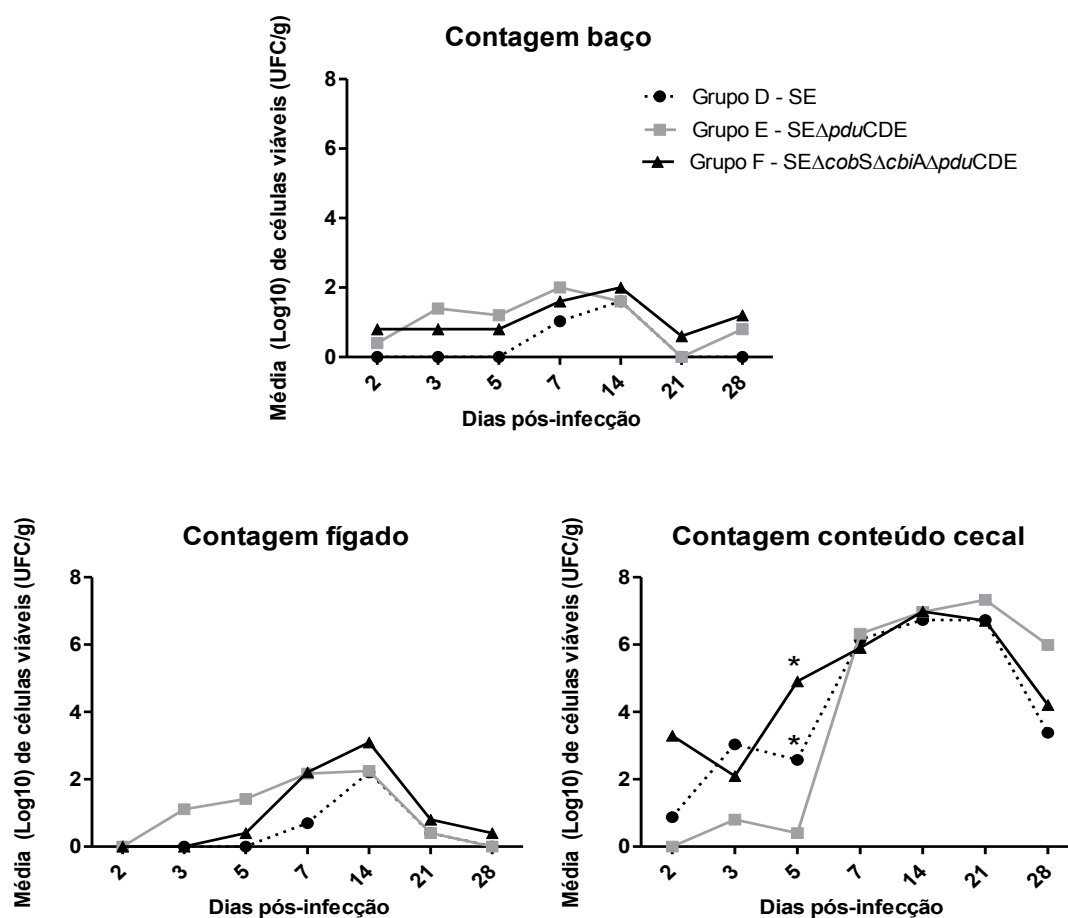


Figura 12. Média ($\log_{10}$) de células bacterianas viáveis (UFC/g) em amostras de baço fígado e conteúdo cecal de aves de postura de variedade vermelha desafiadas com *Salmonella* Enteritidis (SE) (grupo D), SE Δ pduCDE (grupo E) e SE Δ cobS Δ cbiA Δ pduCDE (grupo F). Asterisco indica diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

As alterações macroscópicas observadas durante a necropsia das aves das duas variedades estão presentes na Tabela 3 e ilustradas na Figura 13. De maneira geral, foram encontradas lesões como hepatomegalia e esplenomegalia, com congestão em ambos os órgãos, a partir do terceiro dia pós-infecção.

Tabela 3. Alterações macroscópicas observadas em aves de postura de variedade branca, desafiadas experimentalmente com as estirpes SE (grupo A), SE $\Delta pduCDE$ (grupo B) e SE $cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo C); e vermelha, desafiadas com SE (grupo D), SE $\Delta pduCDE$ (grupo E) e SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo F), após necropsia.

ALTERAÇÕES MACROSCÓPICAS OBSERVADAS								
GRUPOS	LINHAGENS	Dias pós-infecção						
		2	3	5	7	14	21	28
A	Branca	-		Fígado com pontos brancos (1/5)	Fígado congesto com pontos brancos (1/5); Baçocongesto (3/5)	Fígado congesto (1/5)	Mucosa do ceco avermelhado (1/5)	-
B	Branca	-	Fígado congesto (1/5)	-	Retenção da gema (1/5)	Retenção da gema (1/5)	-	Retenção da gema (1/5)
C	Branca	-	Fígado congesto (1/5)	-	Ceco hemorrágico (1/5)	Retenção da gema (1/5)	Retenção da gema (1/5)	Retenção da gema (1/5)
D	Vermelha	Ceco avermelhado (1/5)	Baço congesto (1/5)	-	Baçocongesto (3/5)	-	-	-
E	Vermelha	-	Fígado congesto (1/5)	-		-	-	-
F	Vermelha	-	Fígado congesto (1/5)	-	Fígado congesto com áreas de coloração esverdeada (1/5); Baçocongesto (2/5) Ceco hemorrágico (1/5)	-	-	-

--Ausência de alterações macroscópicas; (número de aves com lesão/número total de aves examinadas).

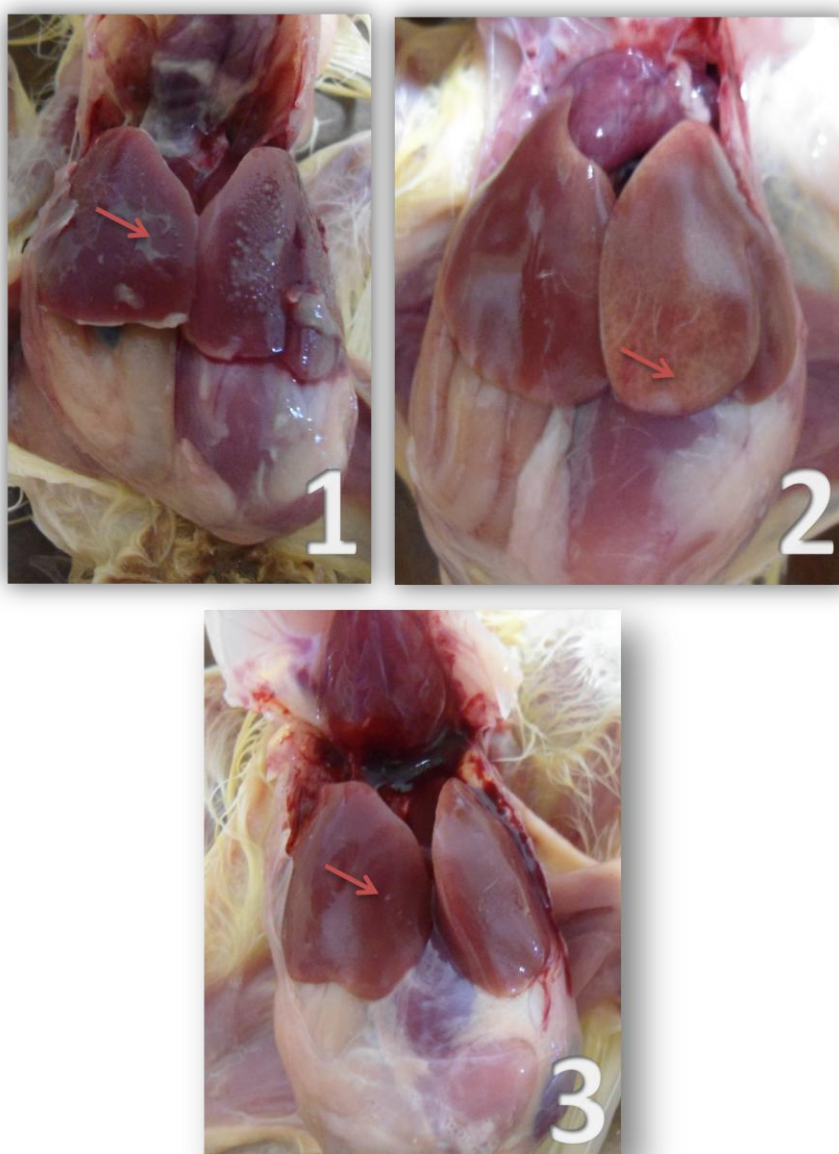


Figura 13. Alterações macroscópicas observadas em aves desafiadas experimentalmente com SE, SE $\Delta pduCDE$ e SE $cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$. (1) Notar deposição de filamentos de fibrina sobre a cápsula hepática (seta) em ave da variedade vermelha desafiadas com SE (grupo D) aos sete dpi. (2) Fígado de ave branca sete dpi com SE $\Delta pduCDE$ (grupo B) apresentando áreas pálidas (seta). (3) Notar áreas pontos brancos multifocais (seta) em fígado de ave da variedade branca aos 21 dpi com SE $cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo C).

5.3 Experimento 2

5.3.1 Avaliação da excreção fecal

Os resultados da avaliação de amostras de suabes cloacais realizados para avaliação da excreção fecal das estirpes inoculadas estão presentes na Tabela 4. SE $\Delta pduCDE$ e SE $cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ foram isoladas de um número maior de aves vermelhas que a estirpe SE ($P < 0,05$). Não houve diferença entre as quantidades das três estirpes recuperadas por suabes cloacais de aves da variedade branca ($P > 0,05$).

Tabela 4. Porcentagem de amostras positivas examinadas por suabe cloacal de aves de variedade branca desafiadas experimentalmente com as estirpes SE (grupo A), SE $\Delta pduCDE$ (grupo B) e SE $cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo C); e aves de variedade vermelha, desafiadas com SE (grupo D), SE $\Delta pduCDE$ (grupo E) e SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo F), para avaliação da excreção fecal.

dpi	Variedade Branca (%)			Variedade Vermelha (%)		
	GRUPO A	GRUPO B	GRUPO C	GRUPO D	GRUPO E	GRUPO F
1	94,5	77,8	69,5	58,4	55,6	91,7
6	62,5	78,3	56,5	78,9	100	100
8	85,7	83,4	16/18	76,9	100	83,4
13	94,7	100	94,5	100	100	100
15	100	92,3	92,3	87,5	100	90
20	85,7	92,3	100	75	100	90
22	77,8	100	100	100	100	80
27	77,8	100	100	66,7	85,7	80
Total (%)	85,6 a	86,8 a	81,5 a	74,8 b	86,9 a	91,6 a

dpi: dias pós-infecção; letras diferentes nas linhas indicam diferença pelo teste do Qui-quadrado ($P < 0,05$);

5.4 Experimento 3

5.4.1 Avaliação da infecção sistêmica e pesquisa de *Salmonella* Enteritidis em conteúdo cecal

Os suabes de fundo de caixa realizados no momento da chegada das aves foram negativos para *Salmonella* spp.

Os sinais clínicos iniciaram-se um dpi. e foi observada diarreia contendo traços de sangue nas aves dos grupos G, H e I. Aos cinco dpi, as aves apresentavam-se apáticas. Aves do grupo controle (J) não apresentaram nenhum sinal clínico.

A necropsia foi realizada nas aves eutanasiadas e as alterações macroscópicas observadas para cada grupo estão presentes na Tabela 5 e ilustradas na Figura 14. Após sete dias de infecção, as lesões se tornaram mais evidentes, sendo encontrados hepatomegalia, congestão hepática, presença de pontos brancos multifocais em fígado e esplenomegalia.

Tabela 5. Alterações macroscópicas observadas em aves SPF desafiadas experimentalmente com as estirpes SE (grupo G), SE $\Delta pduCDE$ (grupo H) e SE $cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo I).

GRUPOS	Dias pós-infecção					
	1	3	7	14	21	28
G	Tonsilas de coloração avermelhada (2/3)	Ceco de coloração avermelhada (1/3)	Fígado apresentando pontos esbranquiçados (1/3);	Fígado apresentando regiões de coloração esbranquiçada (2/3); Congestão hepática (2/3);	Fígado apresentando regiões de coloração esbranquiçada (1/3)	
H	-	Fígado congesto (1/3); Baço congesto (1/3)	Fígado apresentando regiões de coloração esverdeada (2/3);	Fígado apresentando regiões de coloração esbranquiçada (1/3); Esplenomegalia (2/3); Retenção da gema (3/3)	Retenção da gema (1/3)	Fígado apresentando regiões esbranquiçadas (1/3); Congestão hepática (1/3); Retenção da gema (1/3).
I	-		Fígado apresentando regiões de coloração esbranquiçada (2/3); Congestão hepática (2/3)	Fígado apresentando regiões de coloração esverdeada (1/3); Retenção da gema (1/3)	Fígado apresentando regiões de coloração esbranquiçada (1/3); Retenção da gema (1/3)	
J	-	-	-	-	-	-

- = Ausência de alterações macroscópicas; (número de aves com lesão/número total de aves examinadas)

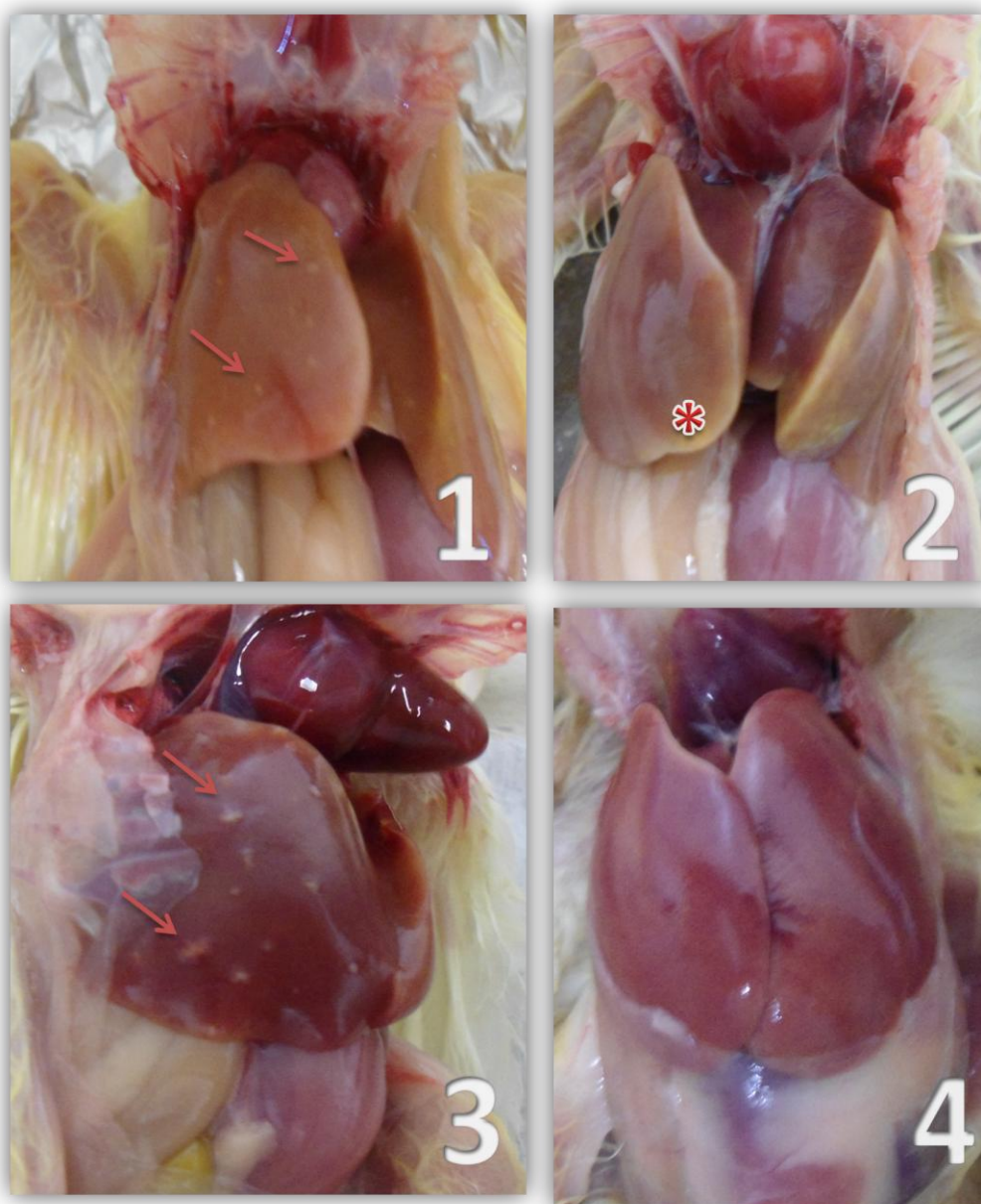


Figura 14. Alterações macroscópicas observadas em fígados de aves sete dias após o desafio com SE (grupo G), SE $\Delta pduCDE$ (grupo H) e SE $cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo I). (1) Notar fígado difusamente amarelado e com pontos brancos multifocais (setas) em fígado de ave SPF desafiada com SE (grupo G). (2) Notar amarelamento difuso (*) em fígado de ave SPF desafiada com SE $\Delta pduCDE$ (grupo H). (3) Fígado de ave SPF desafiada com SE $cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo I) apresentando pontos brancos multifocais (setas). (4) Fígado de aspecto normal (ave não infectada).

A dinâmica das médias das contagens das estirpes em conteúdo cecal e fígado está disposta na Figura 15. No conteúdo cecal, houve recuperação de SE (grupo G), SE $\Delta pduCDE$ (grupo H) e SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo I) desde o primeiro dpi, sendo que as contagens foram registradas até 28 dpi. No entanto, não houve diferença entre as médias das contagens das estirpes ao longo do experimento ($P > 0,05$). O mesmo pôde ser observado com a contagem das estirpes em fígado ($P > 0,05$).

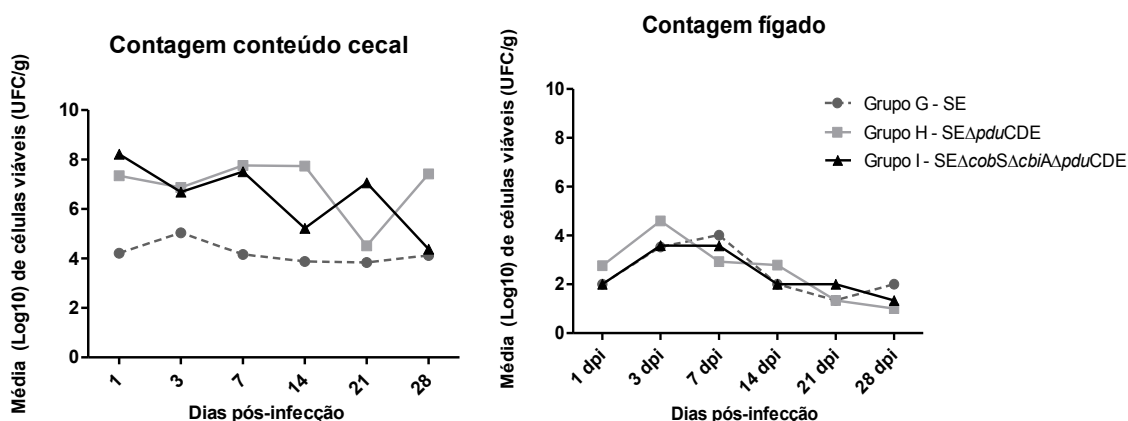


Figura 15. Média ($\log_{10}$) de células bacterianas viáveis (UFC/g) em amostras de conteúdo cecal e fígado após o desafio com SE (grupo G), SE $\Delta pduCDE$ (grupo H) e SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo I) em aves SPF. Teste de Tukey ($P < 0,05$).

5.4.2 PCR quantitativo em tempo real

A Figura 16 contém os valores médios da quantificação da expressão de mRNA de genes responsáveis pelas interleucinas IL-22 e IL-6 e quimiocinas CXCLi2 CCL4 em tonsila cecal de aves SPF. Aos três dpi observou-se níveis mais elevados da expressão de genes responsáveis por IL-22, IL-6, CXCLi2 e CCL4 em aves desafiadas com SE (grupo G), SE $\Delta pduCDE$ (grupo H) e SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo I), quando comparados aos detectados em aves não infectadas.

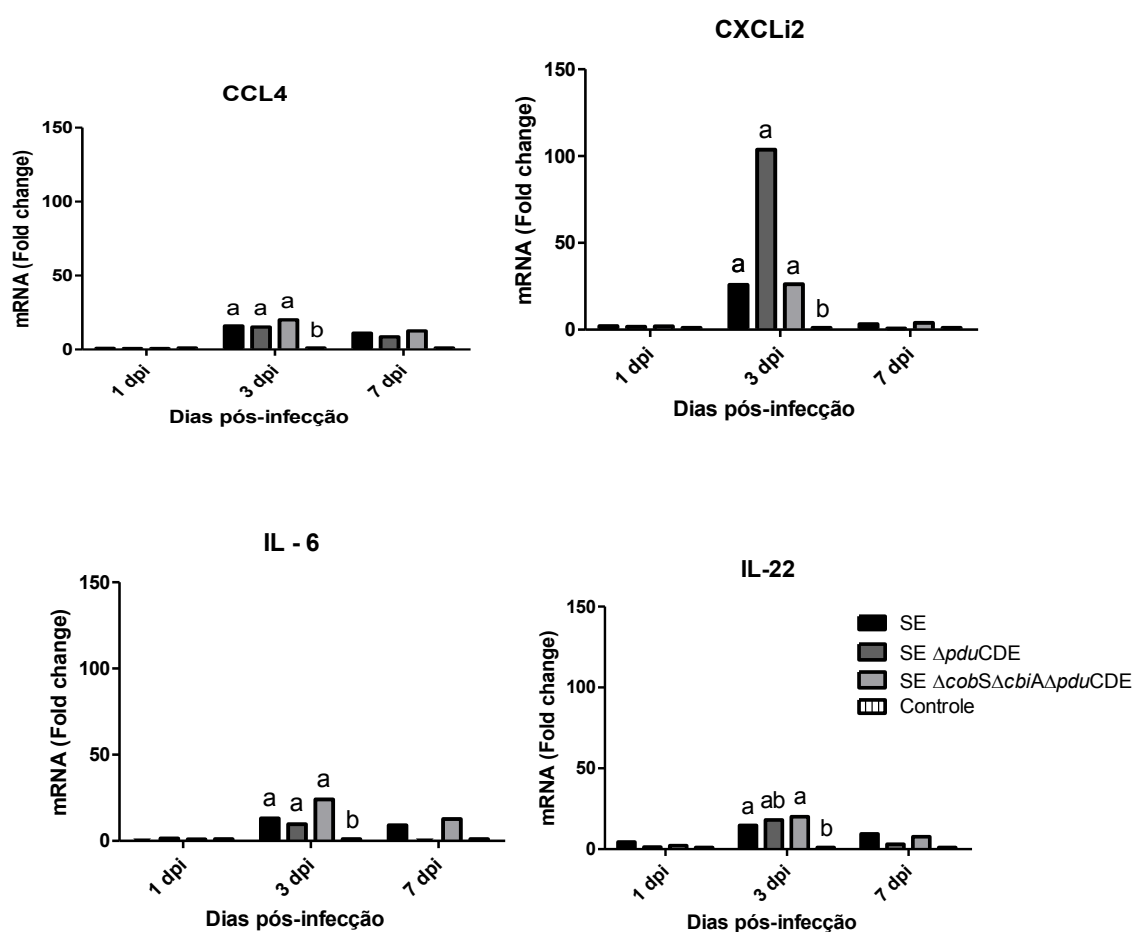


Figura 16. Média dos valores da expressão de genes relacionados às citocinas IL-22, IL-6, CXCLi2 e CCL4 em tonsila cecal de aves SPF desafiadas com SE (grupo G), SE $\Delta pduCDE$ (grupo H) e SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo I) e aves não infectadas (grupo J). Letras minúsculas distintas representam diferença estatística entre as médias dos níveis de expressão gênica submetidas ao teste de Tukey ($P < 0,05$).

A Figura 17 ilustra os resultados da quantificação da expressão de mRNA de genes responsáveis pelas interleucinas IL-18 e IL-6 em amostras de baço. Aos três dpi houve aumento significativo na expressão destas interleucinas em aves desafiadas em relação às do grupo controle.

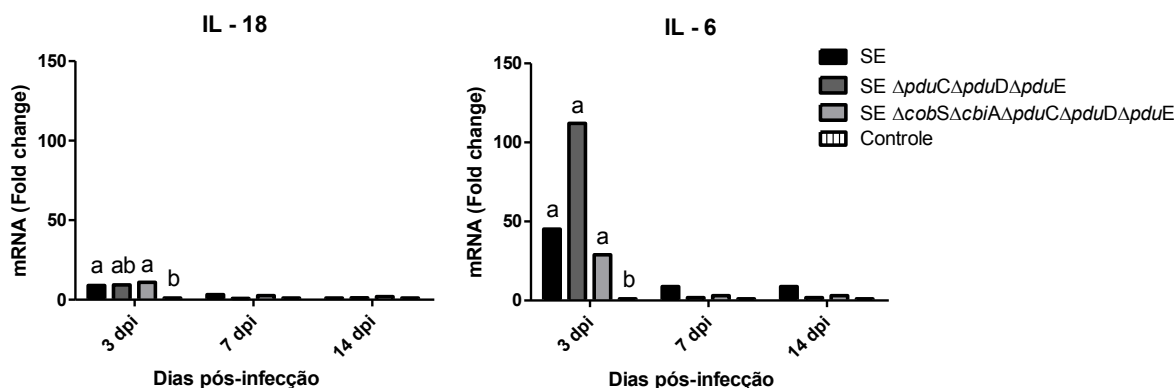


Figura 17. Média dos valores da expressão de genes relacionados às interleucinas IL-18 e IL-6 em baço de aves SPF desafiadas com SE (grupo G), SE $\Delta pduCDE$ (grupo H) e SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo I) e aves não infectadas (grupo J). Letras minúsculas distintas representam diferença estatística entre as médias dos níveis de expressão gênica quando submetidas ao teste de Tukey ($P < 0,05$).

5.4.3 Análise imuno-histoquímica

Os resultados da pesquisa da população de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em fígado e tonsila cecal estão ilustrados na Figura 18. Em aves desafiadas com SE (grupo G), SE $\Delta pduCDE$ (grupo H) e SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo I), a população de linfócitos em tonsila cecal foi, aparentemente, mais elevada no primeiro e terceiro dpi em relação às aves do grupo não infectado. No entanto, estas diferenças não foram significativas.

Em fígado, a população de linfócitos T CD4⁺ não diferiu estatisticamente entre aves desafiadas e não infectadas. No entanto, aos três e sete dpi, populações maiores de linfócitos T CD8⁺ foram observados em aves desafiadas com as estirpes SE (grupo G), SE $\Delta pduCDE$ (grupo H) e SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo I) quando comparadas as das aves não desafiadas (Figura 18).

De maneira geral, os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ marcados foram visíveis nos sinusóides, na região portal e centro-lobular do fígado das aves SPF. Além disso, pode-se observar em tonsilas que as células imunomarcadas estavam presentes em acúmulos linfóides e eventuais marcações na lâmina própria do epitélio.

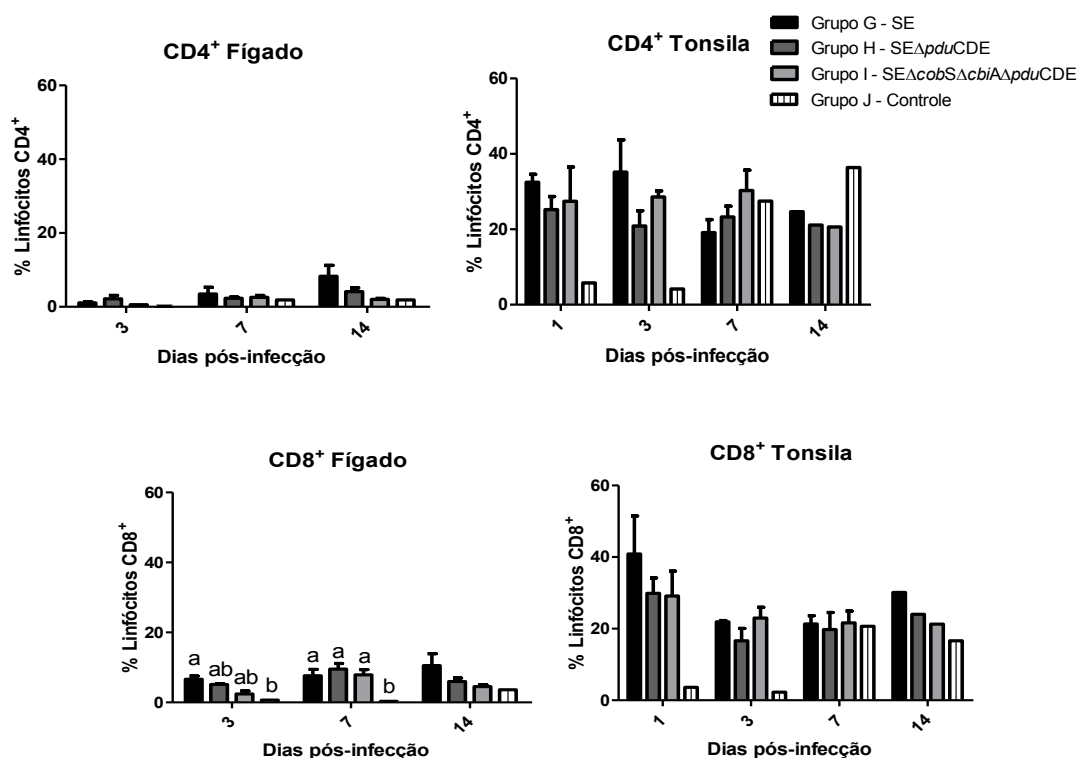


Figura 18. Quantificação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em amostras de fígado e tonsila de aves SPF desafiadas com culturas de SE (grupo G), SE Δpdu CDE (grupo H) e SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pdu$ CDE (grupo I) e aves não desafiadas (grupo J) pelo método de Imuno-histoquímica, três, sete e 14 dias pós-infecção. Letras minúsculas distintas indicam diferença estatística segundo teste de Tukey ($P < 0,05$).

A detecção de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em amostras de fígado e de tonsila cecal, estão ilustradas nas Figuras 19, 20, 21 e 22.

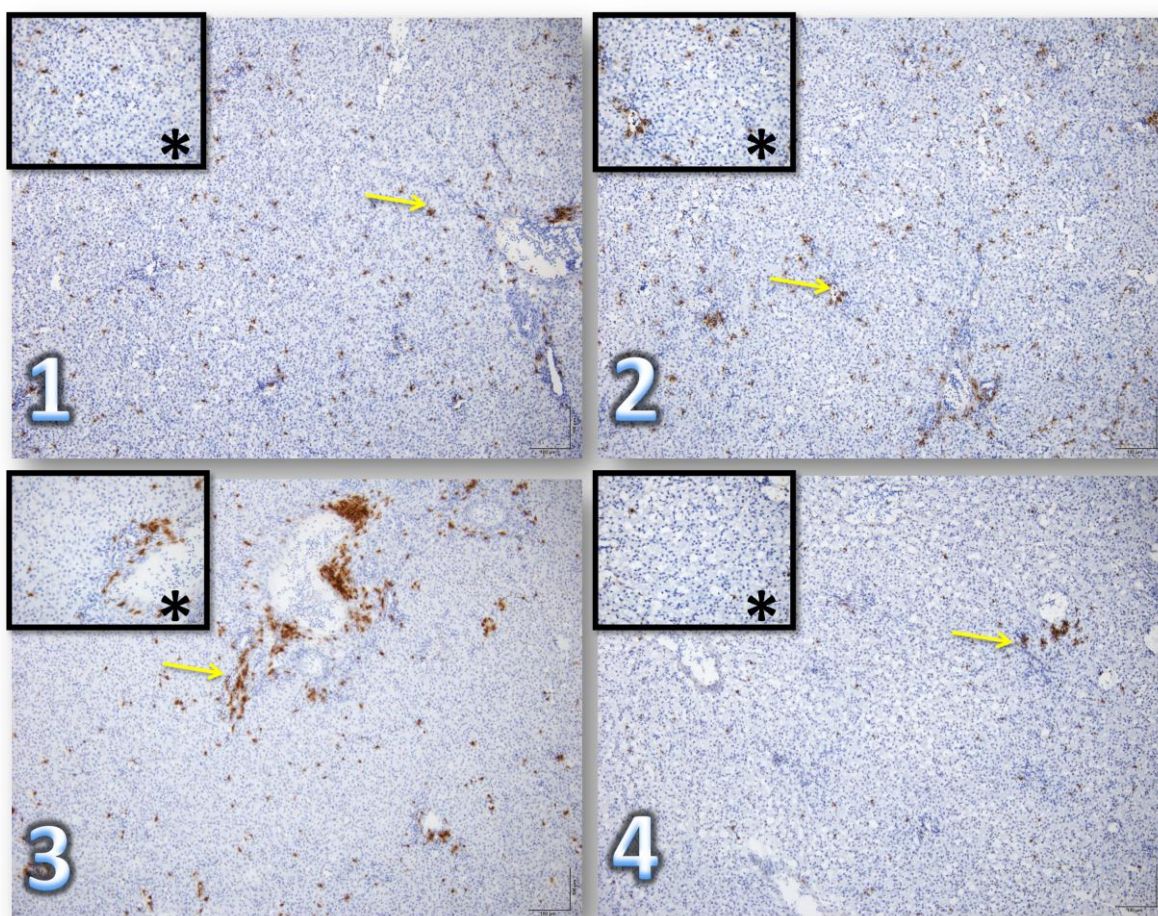


Figura 19. Fotomicrografia das imunomarcações de linfócitos T $CD4^+$ (seta amarela) em tecido de fígado de aves SPF, aos sete dias pós-infecção. (1) Ave desafiada com cultura de SE (grupo G); (2) Ave desafiada com cultura de SE $\Delta pduCDE$ (grupo H); (3) Ave desafiada com cultura de SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo I) e ave não infectada (grupo J). Complexo estreptavidina peroxidase. Objetiva de 10X (* / objetiva de 40X).

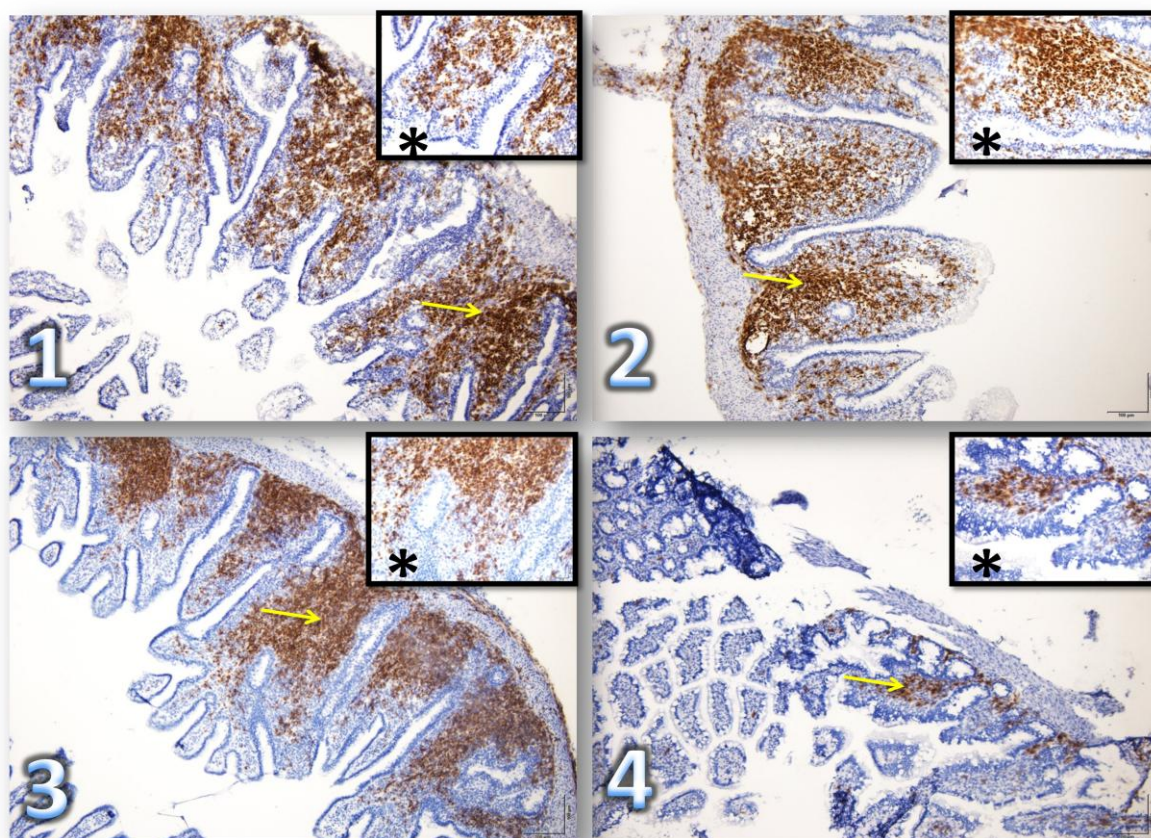


Figura 20. Fotomicrografia das imunomarcações de linfócitos T $CD4^+$ (seta amarela) em tecido de tonsila cecal de aves SPF, no primeiro dia pós-infecção. (1) Ave desafiada com cultura de SE (grupo G); (2) Ave desafiada com cultura de SE $\Delta pduCDE$ (grupo H); (3) Ave desafiada com cultura de SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo I) e ave não infectada (grupo J). Complexo estreptavidina peroxidase. Objetiva de 10X (* / objetiva de 40X).

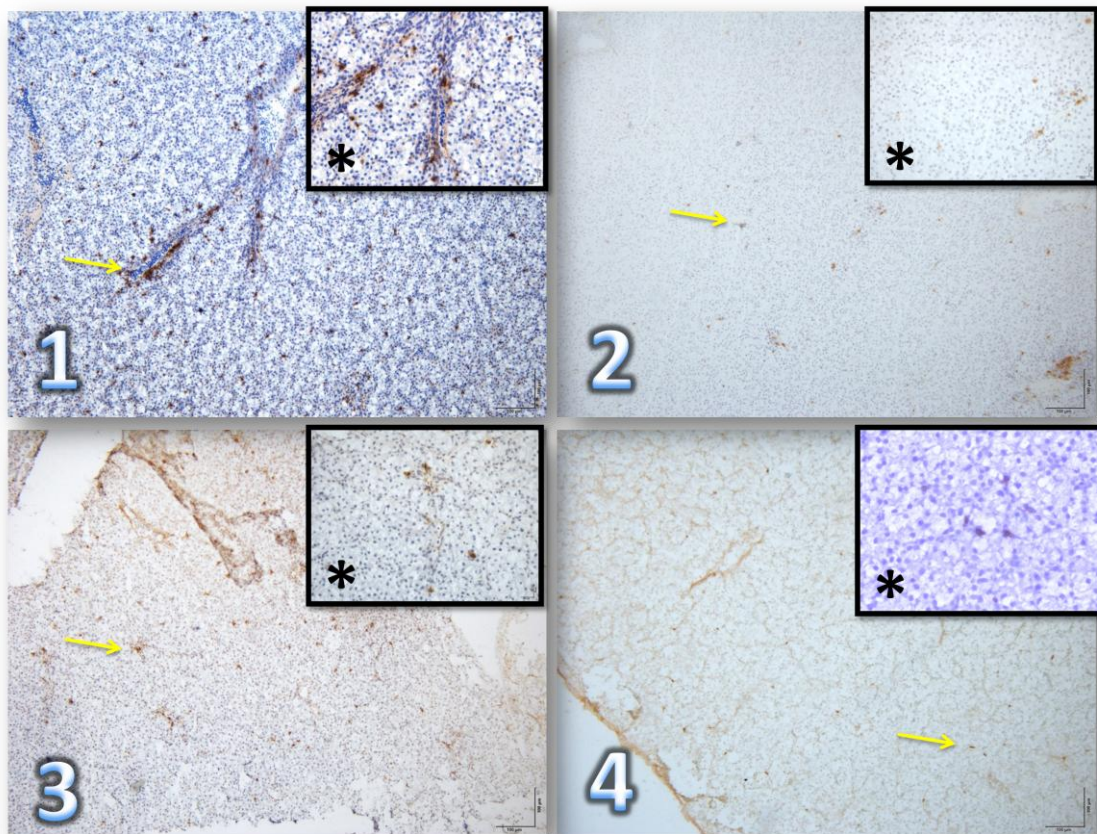


Figura 21. Fotomicrografia das imunomarcações de linfócitos T $CD8^+$ (seta amarela) em tecido de fígado de aves SPF, aos três dias pós-infecção. (1) Ave desafiada com cultura de SE (grupo G); (2) Ave desafiada com cultura de SE $\Delta pduCDE$ (grupo H); (3) Ave desafiada com cultura de SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ (grupo I) e ave não infectada (grupo J). Complexo estreptavidina peroxidase. Objetiva de 10X (* / objetiva de 40X).

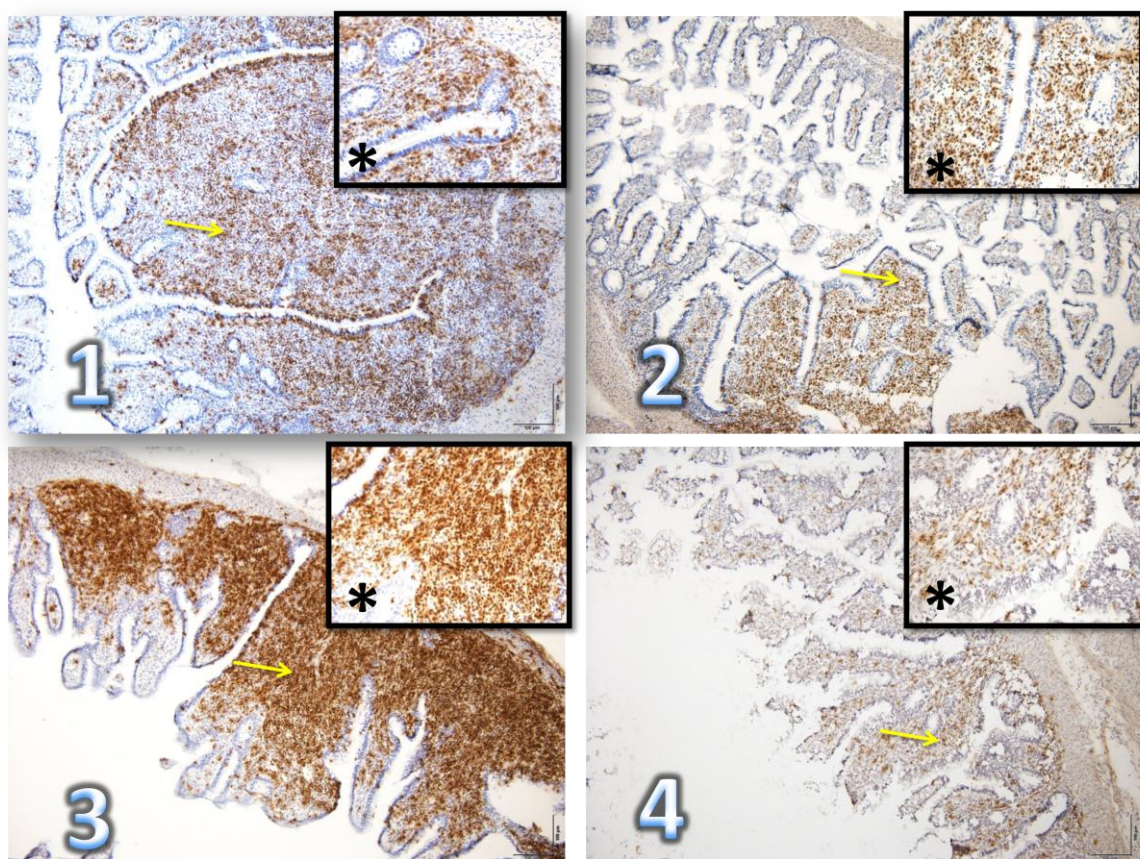


Figura 22. Fotomicrografia das imunomarcações de linfócitos T CD8⁺ (seta amarela) em tecido de tonsila cecal de aves SPF, no primeiro dia pós-infecção. (1) Ave desafiada com cultura de SE (grupo G); (2) Ave desafiada com cultura de SE $\Delta pduCDE$ (grupo H); (3) Ave desafiada com cultura de SE $\Delta cobS\Delta chbA\Delta pduCDE$ (grupo I) e ave não infectada (grupo J). Complexo estreptavidina peroxidase. Objetiva de 10X (* / objetiva de 40X).

6 DISCUSSÃO

A utilização do 1,2-propanodiol (1,2-Pd) como fonte de carbono e energia por *Salmonella* Typhimurium é viabilizada pela enzima propanodiol desidratase, codificada por genes do *operon pdu* (BOBIK et al., 1997). Esta enzima necessita de cianocobalamina como cofator. Em condições de anaerobiose a cianocobalamina é codificada por genes do *operon cob* (RICHTER-DAHLFORS; RAVNUM; ANDERSSON, 1994). A capacidade de utilizar o 1,2-Pd é restrita a poucos gêneros bacterianos. Portanto, proporcionaria vantagens a SE na competição por nutrientes no intestino da ave (KORBEL et al., 2005).

No presente estudo observou-se, no entanto, que a utilização do 1,2-Pd não seria fundamental para sobrevivência de SE no organismo da ave, uma vez que mutações nos genes *cobS*, *cbiA*, *pduC*, *pduD* e *pduE* não afetaram a colonização intestinal e nem a capacidade de provocar infecção sistêmica nestes animais. Outros autores, porém, encontraram resultados distintos ao avaliar utilização do 1,2-Pd por *Salmonella* Typhimurium durante a infecção de camundongos e aves (LIN, 1987; OBRADORS et al., 1988; CONNER et al., 1998; HEITHOFF et al., 1999; KLUMPP; FUCHS, 2007; HARVEY et al., 2011).

STEEB et al. (2013) avaliaram a diversidade de vias metabólicas utilizadas por *Salmonella* em camundongos. Os resultados obtidos com métodos de infecção competitiva, proteômica e análises de predição computacional revelaram que este micro-organismo é capaz de utilizar pelo menos 31 nutrientes presentes nos diferentes tecidos do hospedeiro. Os autores concluíram ainda que glicerol, ácidos graxos, N-acetilglucosamina, gluconato, glicose e arginina são necessariamente utilizados por *Salmonella* como fontes de carbono durante a colonização e invasão.

Alguns sorovares de *Salmonella*, que se adaptaram a um número restrito de hospedeiros, sofreram deleções de genes que alteraram o metabolismo de nutrientes (BOYD et al., 2003). A exemplo disso, *S. Gallinarum* (SG) é capaz de utilizar etanolamina, mas não o 1,2-Pd, por possui mutações naturais em genes do *operon pdu* (SRIKUMAR; FUCHS, 2011). Também foi observado que SG acumulou mutações que levaram a perda da capacidade de armazenar glicogênio (MCMEECHAN et al., 2005). Por outro lado, sorovares capazes de infectar vários

hospedeiros, como SE, são mais versáteis por serem capazes de utilizar fontes energéticas variadas. Portanto, é possível que outros substratos disponíveis no trato intestinal de aves tenham suprido a deficiência de degradação do 1,2-Pd dos mutantes avaliados no presente estudo.

Etanolamina (GARSIN, 2010; ROOF; ROTH, 1988), glicogênio (MCMEECHAN et al., 2005), frutose, D-manitol e D-sorbitol (KIM et al., 2013) seriam exemplos de substratos que poderiam ser utilizados por SE para obtenção de energia no trato entérico. A utilização de etanolamina, no entanto, também requer a cianocobalamina como cofator (JETER, 1990). Portanto, a estirpe SE $\Delta pduCDE$, seria capaz de utilizar etanolamina e competir com outros micro-organismos da microbiota intestinal das aves

A glicose é outra importante fonte energética que poderia ser utilizada por SE (BOWDEN et al., 2009), sendo que existem três vias responsáveis por sua degradação. A via Embden- Meyerhof ou glicólise (NEIDHARDT et al., 1996; BROCK et al., 1994; PRESCOTT; HARLEY; KLEIN, 1993), a via da pentose-fosfato NEIDHARDT et al., 1996; SALYERS; WHITT, 2002) e a via Entner-Doudoroff (NEIDHARDT et al., 1996). O piruvato, produto final da degradação da glicose, participa ainda como precursor da acetil-CoA que fará parte da via do ácido tricarboxílico, fundamental para sobrevivência de *Salmonella* spp. (YIMGA et al., 2006).

A deficiência na produção de cianocobalamina nos mutantes de SE contendo mutações nos genes *cobS* e *cbiA* poderia ter sido suprida pela utilização de produtos gerados por outras bactérias que habitam a microbiota intestinal da ave. Por exemplo, a bactéria *Propionibacterium acidipropionici* (ARGAÑARAZ-MARTÍNEZ et al., 2013) também seria capaz de produzir B₁₂ em condições de anaerobiose (QUESADA-CHANTO; AFSCHAR; WAGNER, 1994).

Aliado à variedade de substratos que podem ser utilizados por SE para obtenção de energia, outros fatores conferem vantagens a esse micro-organismo em ambientes competitivos, como o do lúmen intestinal das aves. Flagelos e fímbrias do tipo 1, por exemplo, aumentam a motilidade e a adesão de SE à parede intestinal e auxiliam na transposição da barreira física imposta pelo muco eliminado pelas células caliciformes, favorecendo a colonização intestinal. Para outras bactérias da

microbiota intestinal o muco pode representar uma barreira difícil de ser quebrada e, por isso, muitas são eliminadas pelo peristaltismo (ALLEN-VERCOE; WOODWARD, 1999a; ALLEN-VERCOE; WOODWARD, 1999b).

No presente estudo, não houve diferença na recuperação das estirpes de *Salmonella* do conteúdo cecal entre as aves das variedades vermelha e branca. No entanto, as médias das contagens de SE, SE $\Delta pduCDE$ e SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ em baço e fígado foram mais elevadas nas aves da variedade vermelha. Sabe-se que a fase sistêmica das salmoneloses aviárias é influenciada por vários fatores, incluindo a resistência genética das aves (POMEROY; NAGARAJA, 1991; BERCHIERI et al., 2001; FREITAS NETO et al., 2007; BUMSTEAD; BARROW, 1993), o que explicaria os resultados obtidos, considerando que aves da variedade vermelha (semi-pesadas) são normalmente mais suscetíveis que as da variedade branca (leves).

De acordo com WIGLEY et al. (2002), a resistência das aves às salmoneloses sistêmicas estaria relacionada com o sistema fagocitário mononuclear. Aves resistentes possuem números mais elevados de fagócitos que por sua vez são mais eficientes na destruição de *Salmonella* internalizada.

Após a invasão do epitélio intestinal, *Salmonella* spp. é englobada por fagócitos presentes na lâmina própria, onde sobrevive alojada nos vacúolos de fagocitose (CIRILLO et al., 1998; HENSEL et al., 1998). Posteriormente, é transportada ao fígado por meio da circulação porta hepática, chegando, em seguida, ao baço (LICHTMAN et al., 1990). Nestes órgãos, *Salmonella* induz vários tipos de alterações macro e microscópicas (FREITAS NETO et al., 2007). No presente estudo, foram observadas, nas aves desafiadas com as três estirpes de SE, alterações macroscópicas tais como esplenomegalia, hepatomegalia, congestão hepática e presença de pontos brancos em fígado, sendo estas mais evidentes entre o terceiro e o sétimo dia, tanto em aves de postura comercial, como nas SPF. Em aves SPF, as lesões foram observadas até o final do experimento (28 dpi).

Nas aves SPF, a semelhança do que foi observado nas aves comerciais, não houve diferenças entre as médias das contagens das estirpes SE, SE $\Delta pduCDE$ e SE $\Delta cobS\Delta cbiA\Delta pduCDE$ em conteúdo cecal. As estirpes chegaram ao fígado, ou seja, realizaram infecção sistêmica, ao mesmo tempo. No entanto, de um modo

geral, a colonização intestinal e invasão ocorreram mais cedo que o observado nas aves de variedades comerciais. Provavelmente, os pintainhos SPF seriam mais susceptíveis a infecção que os comerciais, uma vez que possuem pouca imunidade materna e ainda um número reduzido de células TCRV β 1⁺, importantes para a proteção das mucosas (CIHAK et al., 1991; BRIDLE et al., 2006).

A ativação da resposta imune na ave tem início com o reconhecimento dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (KAISER, 2010; BROWNLIE; ALLAN, 2011) por receptores de reconhecimento padrão (PRRs). Com isso, ocorre estimulação do sistema imune inato, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias e atração de fagócitos para o local da infecção (MATULOVA et al., 2012). Observou-se, no presente estudo, que ocorreu indução de resposta imune nas aves desafiadas pelas três estirpes de SE, sendo que a deleção dos genes *cobS*, *cbiA*, *pduC*, *pduD* e *pduE* não influenciou o perfil da resposta imune induzida. Tanto aves desafiadas com a estirpe selvagem como as desafiadas com as mutantes induziram praticamente os mesmos padrões de resposta.

Embora as estirpes de SE tenham sido recuperadas do conteúdo cecal ainda no primeiro dpi, alterações significativas nos níveis de expressão de genes responsáveis por IL-6, IL-22, CCL4 e CXCLi2 foram detectadas apenas mais tarde, aos três dpi. Crhanova et al. (2011) também observaram aumentos nos níveis da expressão de interleucinas, incluindo IL-22, três dpi em aves de postura desafiadas com SE. Em outro estudo, envolvendo frangos de corte, observou-se uma elevação nos níveis de expressão de genes de citocinas e quimiocinas mais cedo, no primeiro dia após a infecção, e essa diferença poderia estar relacionada ao tipo de ave utilizado (SETTA, et al., 2012).

Pode-se observar, também, no primeiro e terceiro dpi, um aumento aparente de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em tonsilas das aves SPF estudadas, apesar de não diferirem estatisticamente. Os aumentos nas populações de linfócitos T têm sido relacionados com estimulação da resposta imune de mucosa em aves desafiadas oralmente com SE (SHEELA et al., 2003), o que estaria de acordo com os dados do presente estudo.

A invasão sistêmica observada no presente estudo está correlacionada, ainda, com aumentos significativos nos níveis de expressão de IL-6 em baço das aves SPF infectadas. Ao que tudo indica o estabelecimento da infecção sistêmica pelas estirpes de SE estimulou resposta pró-inflamatória na ave. Aumentos nos níveis de na expressão IL-6 após infecção com SE também foram descritos por outros autores (KAISER et al., 2000). IL-6 é responsável por recrutar macrófagos para o local da infecção e estimular o desencadeamento de respostas imunes adaptativas, levando à diferenciação dos linfócitos T e B (HIRANO, 1994). Essa interleucina também induz à diferenciação de linfócitos CD4⁺ em células dos tipos T_H1 e T_H17. As células T_H17, por sua vez, participam do recrutamento de heterófilos e estimulação da produção de IL-22 e IL-17, as quais levam as células epiteliais a secretar peptídeos com ação antimicrobiana (SANTOS et al. 2009), auxiliando no *clearance* de *Salmonella* presente no intestino.

Neste estudo, embora tenham sido observados aumentos evidentes nas populações de linfócitos T CD4⁺ em tonsilas cecais de aves desafiadas com as três estirpes de SE, esses resultados não puderam ser confirmados estatisticamente. O recrutamento de linfócitos T CD4⁺ poderia ter sido estimulado pela presença de SE com consequente elevação na produção de IL-6. Os níveis mais elevados IL-22 também foram detectados neste órgão aos três dpi e indicam uma tendência a elaboração de resposta do tipo T_H17, importante para o *clearance* intestinal. O mesmo perfil de resposta imune foi descrito durante a infecção de camundongos pelo sorovar Enteritidis (SCHULZ et al., 2008).

Segundo CRHANNOVA et al. (2011) o processo inflamatório que ocorre no intestino após a infecção por SE resulta em elevação nos níveis de expressão de IL-22, o que estaria de acordo com o observado no presente estudo. A elevação da produção de IL-22 ajudaria a manter a integridade do epitélio intestinal, uma vez que esse mediador possui a função de estimular a proliferação celular, cicatrização e produção de peptídeos antimicrobianos (WOLK, et al., 2006; OUYANG; VALDEZ, 2008).

Neste estudo, aos três dpi também foram observados aumentos nos níveis de expressão de IL-18 em baço e elevação da população de linfócitos T CD8⁺ em fígado de aves desafiadas com as três estirpes de SE em comparação com aves

não infectadas. Dentre as várias funções da IL-18 estão o aumento da atividade citotóxica, proliferação de células T CD8⁺, indução da produção de IFN γ com consequente síntese de óxido nítrico no interior de fagossomos; todas ligadas ao perfil de resposta do tipo T_H1 (SAHOO et al., 2011). Ao que tudo indica, houve uma tendência das aves desafiadas com as estirpes de SE desenvolverem resposta do tipo T_H1.

Os níveis de expressão das quimiocinas CXCLi2 e CCL4 em tonsilas cecais de aves desafiadas foram mais elevados quando comparados aos das aves controle. Dados semelhantes foram encontrados por CHAPPELL et al. (2009) que observaram elevação na expressão de genes responsáveis por CXCLi1 e CXCLi2 em aves desafiadas com SE. BERNDT et al. (2007) também relataram aumento na expressão de CCL4 após infecção de pintainhos de um dia por SE. Estas quimiocinas estão envolvidas no recrutamento de células inflamatórias durante a infecção, sendo que neutrófilos (heterófilos nas aves), macrófagos, monócitos e linfócitos são os alvos quimiotáticos para CXCLi1 e CXCLi2. Enquanto que linfócitos T, linfócitos B, eosinófilos e macrófagos são estimulados por CCL4 (MARTINS-GREEN, 2001; MARTINS-GREEN; FEUGATE, 1998; WITHANAGE et al., 2004). Portanto, a elevação nos níveis de expressão de CXCLi2 e CCL4 nas aves infectadas com as estirpes de SE no presente estudo seria parte do processo inflamatório desencadeado no intestino.

Porém, os dados da contagem bacteriana em fígado das aves deste estudo demonstraram que esta resposta pró-inflamatória pode ter sido responsável pela diminuição da infecção sistêmica, mas não foi suficiente para eliminá-la, uma vez que houve recuperação bacteriana em fígado até o final do experimento.

Aos sete e 14 dpi não foram observadas diferenças entre as populações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em tonsila e fígado de aves desafiadas e não infectadas. Tem sido relatado que, mesmo em aves saudáveis, o estabelecimento da microbiota intestinal, a exposição a antígenos presentes no ambiente e na ração, induzem a influxo de células T a partir do quarto dia de vida (BAR-SHIRA; SKLAN; FRIEDMAN, 2003), o que ajudaria a explicar os resultados encontrados neste estudo.

No presente estudo pode-se observar que a deficiência nos genes *cobS*, *cbiA*, *pduC*, *pduD* e *pduE* em SE não alterou sua habilidade de colonizar o intestino e

realizar infecção sistêmica em aves. O perfil de resposta imune induzida nas aves desafiadas com estirpe contendo os genes *cobS*, *cbiA*, *pduC*, *pduD* e *pduE* defectivos também não diferiu daquele observado em aves infectadas com a estirpe selvagem. Possivelmente, outras vias utilizadas por SE para obtenção de energia e carbono supririam o 1,2 propanodiol.

7 CONCLUSÕES

Nas condições em que foi realizado o presente estudo pode-se concluir que:

- Estirpes de SE contendo os genes *cobS*, *cbiA*, *pduC*, *pduD* e *pduE* defectivos são capazes de colonizar o intestino e invadir baço e fígado de aves da mesma forma que a estirpe selvagem.
- SE $\Delta pduCDE$ e SE *cobS* $\Delta cbiA\Delta pduCDE$ continuam sendo excretadas de aves de postura comercial desafiadas.
- Os níveis da expressão de genes responsáveis por CXCLi2, CCL4, IL-6 e IL-22 em tonsilas cecais e IL-6 e IL-18 em baço, bem como a população de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em fígado e tonsila cecal são semelhantes nas aves desafiadas com SE, SE $\Delta pduCDE$ e SE *cobS* $\Delta cbiA\Delta pduCDE$.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. p. 226-244.

AILION, M.; BOBIK, T. A.; ROTH, J. R. Two global regulatory systems (Crp and Arc) control the cobalamin/propanediol regulon of *Salmonella* Typhimurium. **Journal of Bacteriology**, Los Angeles, v. 175, n. 22, p. 7200-7208, 1993.

ALLEN, J. H.; UTLEY, M.; BOSCH, H. van den; NUIJTEN, P.; WITVLIET, M.; MCCORMICK, B. A.; KROGFELT, K. A.; LICHT, T. R.; BROWN, D.; MAUEL, M.; LEATHAM, M. P.; LAUX, D. C.; COHEN, P. S. A functional *cra* gene is required for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence in BALB/c mice. **Infection and Immunity**, Washington, v. 68, n. 6, p. 3772-3775, 2000.

ALLEN-VERCOE, E.; WOODWARD, M. J. Colonization of the chicken caecum by afimbriate and aflagellate derivatives of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 69, n. 4, p. 265-275, 1999a.

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

AMARASINGHAM, C. R.; DAVIS, B. D. Regulation of α -ketoglutarate dehydrogenase formation in *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 240, p. 3664-3668, 1965.

ANDERSON, P. J.; LANGO, J.; CARKEET, C.; BRITTEN, A.; KRÄUTLER, B.; HAMMOCK, B. D.; ROTH, J. R. One pathway can incorporate either adenine or dimethylbenzimidazole as an α -axial ligand of B12 cofactors in *Salmonella enterica*. **Journal of Bacteriology**, Los Angeles, v. 190, n. 4, p. 1160-1171, 2007.

ARGAÑARAZ-MARTÍNEZ, E.; BABOT, J. D.; APELLA, M. C.; PEREZ CHAIA A. Physiological and functional characteristics of *Propionibacterium* strains of the poultry microbiota and relevance for the development of probiotic products. **Anaerobe**, v. 23, p. 27-37, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.08.001>>.

ÁVILA, F. A.; RIGOBELLO, E. C.; MALUTA, R. P. Anticorpos. In: _____ **Microbiologia geral**. Jaboticabal:FUNEP, 2012. p. 165-175.

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

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

BARROW, P. A. *Salmonella* infection: immune and non-immune protection with vaccines. **Avian Pathology**, Huntingdon, v. 36, n. 4, p. 1-13, 2007.

BARROW, P. A.; WALLIS, T. S. Vaccination against *Salmonella* infections in food animals: rationale, theoretical basis and practical application. In C. WRAY (Ed.). **Salmonella in domestic animals**, Oxford: CAB International, 2000. p. 323-339.

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

BAXTER-JONES, C. Control de la transmisión vertical de *Salmonella*. **Avicultura Profesional**, Atlanta, v. 14, n. 1, p. 18-19, 1996.

BERCHIERI JR., A.; FREITAS NETO, O. C. Salmoneloses aviárias. In: BERCHIERI JR., A.; SILVA, E. N.; FABIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doença das aves**. 2. ed. Campinas:Facta, 2009. p.435-451.

BERCHIERI Jr., A.; MURPHY, A.; MARSTON, K.; BARROW, P. A. Observations on the persistence and vertical transmission of *Salmonella enterica* serovars Gallinarum and Pollorum in chickens: effect of bacterial and host genetic background. **Avian Pathology**, Oxford, v. 30, n. 3, p. 221–231, 2001.

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

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.; WILHELM, A.; JUGERT, C.; PIEPER, J.; SACHSE, K.; METHNER, U. Rapid expression of chemokines and proinflammatory cytokines in Newly Hatched chickens infected with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Infection and Immunity**, Washington, v. 75, n. 12, p. 5993–6007, 2007.

BLASCO F.; IOBBI C.; RATOUCNIK, J.; BONNEFOY, V.; CHIPPAUX, M. Nitrate reductase of *Escherichia coli*: sequence of the second nitrate reductase and comparison with that encoded by the *narGHJI operon*. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 222, n. 1, p. 104-111, 1990.

BOBIK, T. A.; HAVEMANN, G. D.; BUSCH, R. J.; WILLIAMS, D. S.; ALDRICH, D. H. C. The propanediol utilization (*pdu*) operon of *Salmonella enteric* serovar Typhimurium LT2 includes genes necessary for formation of polyhedral organelles involved in coenzyme B12-dependent 1,2-propanediol degradation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 181, n.19, p. 5967–5975, 1999.

BOBIK, T. A.; XU, Y.; JETER, R. M.; OTTO, K. M.; ROTH, J. R. Propanediol utilization genes (*pdu*) of *Salmonella* Typhimurium: three genes for the propanediol dehydratase. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 179, n. 21, p. 6633-6639, 1997.

BOWDEN, S. D.; HOPPER-CHIDLAW, A. C.; RICE, C. J.; RAMACHANDRAN, V. K.; KELLY, D. J.; THOMPSON, A. Nutritional and metabolic requirements for the infection of HeLa cells by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **PLOS ONE** v. 9, n. 5, e96266, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0096266>>.

BOWDEN, S. D.; ROWLEY, G.; HINTON, J. C. D.; THOMPSON, A. Glucose and glycolysis are required for the successful infection of macrophages and mice by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Infection and Immunity**, Washington, v.77, n. 7, p.3117–3126, 2009.

BOYD, E.F.; PORWOLLIK, S.; BLACKMER, F.; MCCLELLAND, M. Differences in gene content among *Salmonella enterica* serovar Typhi isolates. *J Clin Microbiol.*, v. 41, n. 14, p. 3823-3828, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.41.8.3823-3828.2003>>.

BRADBEER, C. The clostridial fermentations of choline and ethanolamine. II. Requirement for a cobamide coenzyme by an ethanolamine deaminase. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 240, n. 12, p. 4675–4681, 1965a.

BRADBEER, C. The clostridial fermentations of choline and ethanolamine. Preparation and properties of cell-free extracts. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 240, n. 12, p. 4669–4674, 1965b.

BRIDLE, B. W.; JULIAN, R.; SHEWEN, P. E.; VAILLANCOURT, J.; KAUSHIK, A. K. T lymphocyte subpopulations diverge in commercially raised chickens. **Canadian Journal Of Veterinary Research**, Ottawa, v. 70, n. 3, p. 183–190, 2006.

BROCK, T. D.; MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Biology of Microorganisms**. 7. ed. New Jersey: Library of Congress Catalogue publication, 1994. p. 360-380.

BROWNLIE, R.; ALLAN, B. Avian toll-like receptors review. **Cell and Tissue Research**, New York, v. 343, n. 7, p. 121-130, 2011.

BUMSTEAD, N.; BARROW, P. Resistance to *Salmonella* Gallinarum, S. Pullorum, and S. Enteritidis in inbred lines of chickens. **Avian Diseases**, Kennett Square, v. 37, n. 1, p. 189–193, 1993.

CARVER, T. J.; RUTHERFORD, K. M.; BERRIMAN, M.; RAJANDREAM, M. A.; BARRELL, B. G.; PARKHILL, J. ACT: the Artemis comparison tool. **Bioinformatics**, v. 21, n. 16, p. 3422–3423, 2005.

CECCHINI, G.; ACKRELL, B. A. C.; DESHLER, J. O.; GUNSALUS, R. P. Reconstitution of quinone reduction and characterization of *Escherichia coli* fumarate reductase activity. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 261, n. 4, p. 1808–1814, 1986.

CHAMBERS, J. M. **Software for data analysis: programming with R**. New York: Springer, 2008.

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

CIHAK, J.; HOFFMANN-FEZER, G.; ZIEGLER-HEIBROCK, H. W.; STEIN, H.; KASPERS, B.; CHEN, C. H.; COOPER, M. D.; LÖSCH, U. T cells expressing the Vp1 T-cell receptor are required for IgA production in the chicken. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 88, p. 10951–10955, 1991.

CIRILLO, D. M.; VALDIVIA, R. H.; MONACK, D. M.; FALKOW, S. Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 30, n. 1, p. 175–188, 1998.

COLE, S. T.; CONDON, C.; LEMIRE, B. D.; WEINER, J. Molecular biology, biochemistry and bioenergetics of fumarate reductase, a complex membrane-bound iron-sulfur flavoenzyme of *Escherichia coli*. **Biochimica et Biophysica Acta. Bioenergetics**, Amsterdam, v. 811, n. 4, p. 381–403, 1985.

COLIN, B. J. Control de la *Salmonella*. **Avicultura Professional**, Atlanta, v. 14, n. 1, p. 23, 1996.

CONNER, C. P.; HEITHOFF, D. M.; JULIO, S. M.; SINSHEIMER, R. L.; MAHAN, M. J. Differential patterns of acquired virulence genes distinguish *Salmonella* strains. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, p. 4641–4645, 1998.

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

COURTRIGHT, J. B.; HENNING, U. Malate dehydrogenase mutants in *Escherichia coli* K-12. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.102, n. 3, p.722-728, 1970.

CREAGHAN, I. T.; GUEST, J. R. Succinate dehydrogenase-dependent nutritional requirement for succinate in mutants of *Escherichia coli* K-12. **Journal of General Microbiology**, London, v. 107, n. 1, p. 1-13, 1978.

CRHANOVA, M.; HRADECKA, H.; FALDYNOVA, M.; MATULOVA, M.; HAVLICKOVA, H.; SISA, 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.

CRONAN, J. E.; LaPORTE, D. Tricarboxylic acid cycle and glyoxylate bypass. In: ***Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*: cellular and molecular biology**. 2. ed. Washington: ASM Journal Press Releases, 1996. p.206-216.

CVE. Centro de Vigilância Epidemiológica. ***Salmonella Enteritidis* – Perguntas e Respostas**, 2008. Disponível em:
<http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/salmonella_pergresp.htm> Acesso em 10 nov de 2014.

DANIEL, W. W. **Analysis of variance in biostatistics: a foundation for analysis in the health sciences**. 5. ed. New York : John Wiley and Sons, 1991.

DARWIN, K. H.; MILLER, V. L. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 3, p. 405-428, 1999.

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

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

DICKEL, E. **Utilização da microbiologia convencional, reação em cadeia pela polimerase (PCR) e ensaio imunoenzimático (ELISA) no monitoramento de salmonella em carcaças de frango para o controle higiênico-sanitário do processo de abate**. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

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

ESCALANTE-SEMERENA, J. C.; ROTH, J.R. Regulation of cobalamin biosynthetic operons in *Salmonella Typhimurium*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 169, n. 5, p. 2251–2258, 1987.

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

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

FORGET, P.; PICHINOTY, F. Le cycle tricarboxylique chez *Aerobacter aerogenes*. **Annales de l'Institut Pasteur**, Paris, v. 112, p. 261-290, 1967.

FRAENKEL, D. G. Glycolysis. In: ***Escherichia coli and Salmonella***. 2. ed. Washington: ASM Journal Press Releases, 1996. p. 189-198.

FREITAS NETO, O. C.; ARROYAVE, W.; ALESSI, A. C.; FAGLIARI, J. J.; BERCHIERI Jr., A. Infection of commercial laying hens with *Salmonella* Gallinarum: clinical, anatomopathological and haematological studies, **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 9, n. 2, p. 133-141, 2007.

GALANIS, E.; LO FO WONG, D. M.; PATRICK, M. E.; BINSZTEIN, N.; CIESLIK, A.; CHALERMCHAIKIT, T.; AIDARA-KANE, A.; ELLIS, A.; ANGULO, F. J.; WEGENER, H. C. Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000- 2002. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 3, n. 12, p. 381-388, 2006.

GAMA, N. M. S. Q.; BERCHIERI Jr., A.; FERNANDES, S. A. Occurrence of *Salmonella* sp. in laying hens. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 5, n. 1, p. 15-21, 2003.

GARSIN, D. A. Ethanolamine utilization in bacterial pathogens: roles and regulation. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 8, p. 290–295, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2334>>.

GAST, R. K.; HOLT, P. S. Persistence of *Salmonella* enteritidis from one day of age until maturity in experimentally infected layer chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 77, n. 12, p.1759-1762, 1998.

GELLI, D. S.; JAKABI, M.; SAKATA, H. *Salmonellas* isoladas de alimentos no período de 1985-1996 no Estado de São Paulo, Brasil. In: Congresso Latino Americano de Microbiologia e Higiene de Alimentos, 1998. Água de Lindóia, SP. **Anais São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia**, v. 1, 105-154 p.

GENNIS, R. B.; STEWART, V. Respiration. In: NEIDHART F. C. (Ed.). ***Escherichia***

***coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology.** Washington:Amazon, 1996. p. 217-286.

GEWIRTZ, A. T.; NAVAS, T. A.; LYONS, S.; GODOWSKI, P. J.; MADARA, D. J. L. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. **The Journal of Immunology**, Baltimore v. 167, p. 1882–1885, 2001.

GILLHAM, B.; PAPACHRISTODOULOU, D. K.; THOMAS, J. H. **Wills': biochemical basis of medicine.** 3. ed. Oxford:Reed Educational and Professional Publishing, 1997, v. 22, p. 196-202.

GRAY, C. T.; WIMPENNY, J. W. T.; MOSSMAN, M. R. Regulation of metabolism in facultative bacteria. II. Effects of aerobiosis, anaerobiosis, and nutrition on the formation of Krebs cycle enzymes in *Escherichia coli*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam v.117, n. 1, p.33-41, 1966.

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

GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F.X. **Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars.** 9. ed. Paris: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella* Institut Pasteur, 2007.

GRIFFIN AJ, MCSORLEY SJ. Generation of *Salmonella*-specific Th1 cells requires sustained antigen stimulation. **Vaccine**, Kidlington, v. 29, n. 15, p. 2697–2704, 2011.

GUARD-PETTER, J.; KELLER, L. H.; RAHMAN, M. M.; CARLSON, R. W.; SILVERS, S. A novel relationship between O-antigen variation, matrix formation, and invasiveness of *Salmonella* Enteritidis. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 117, n. 2, p. 219–231, 1996.

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

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

HAVEMANN, G. D.; SAMPSON, E. M.; BOBIK, T. A. *Pdua* is a shell protein of polyhedral organelles involved in coenzyme b12-dependent degradation of 1,2-propanediol in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 184, n. 5, p. 1253–1261, 2002.

HEITHOFF, D. M.; CONNER, C. P.; HENTSCHEL, U.; GOVANTES, F.; HANNA, P. C.; MAHAN, M.J. Coordinate intracellular expression of *Salmonella* Genes induced during infection. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 181, n. 3, p.799-807, 1999.

HENRY, J. B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1999. p. 621.

HENSEL, M.; SHEA, J. E.; WATERMAN, S. R.; MUNDY, R.; NIKOLAUS, T.; BANKS, G.; VAZQUEZ-TORRES, A.; GLEESON, C.; FANG, F. C.; HOLDEN, D. W. Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 30, n. 1, p. 163–174, 1998.

HIRANO, T. Interleukin-6. In: THOMSON, A.; LOTZE M. **The cytokine handbook**. 2. ed. London: Academic Press, 1994. p. 145-168.

INGRAHAM, J. L.; MAALØE, O.; NEIDHARDT, F. C. Growth of the bacterial cell. Sunderland: Sinauer Associates, 1983. 435 p.

IRINO, K. FERNANDES, S. A.; TAVECHIO, A. T.; NEVES, B. C.; DIAS, A. M. G. Progression of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 strains in São Paulo State. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 38, n. 3, p. 193-196, 1996.

JANEWAY, C. A.; Jr.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 20, p. 197-216, 2002.

JETER, R. M. Cobalamin dependent 1,2-propanediol utilization by *Salmonella* Typhimurium. **Journal of General Microbiology**, London, v. 136, n. 5, p. 887-896, 1990.

JETER, R. M.; ROTH, J. R. Cobalamin (vitamin B12) biosynthetic genes of *Salmonella* Typhimurium. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 169, p. 3189–98, 1987.

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

JEURISSEN, S. H. M.; LEWIS, F.; VAN DER KLIS, J. D.; MROZ, Z.; REBEL, J. M. J.; HUURNE, A. A. H. M. Parameters and techniques health of poultry as constituted by immunity, integrity, and functionality. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, Poole, v. 3, n. 1, p.1-14, 2002.

JONES, P. W.; TURNER, J. M. Interrelationships between the enzymes of ethanolamine metabolism in *Escherichia coli*. **Journal of General Microbiology**, London, v.130, n. 2, p. 299–308, 1984.

JUUL-MADSEN, H. R.; VIERTLBOECK, B.; SMITH, A. L.; GÖBEL, T. W. F. Avian innate immune responses. **Avian immunology**. San Diego: Elsevier. 2008. cap. 7, p. 129-158.

KAISER, P. Advances in avian immunology - prospects for disease control: a review. **Avian pathology**, Oxford, v. 39, n. 5, p. 309–324, 2010.

KAISER, P.; ROTHWELL, L.; GALYOV, E. E.; BARROW, P. A.; BURNSIDE, J.; WIGLEY, P. Differential cytokine expression in avian cells in response to invasion by *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Gallinarum. **Microbiology**, Reading, v. 146, n. 12, p. 3217–3226, 2000.

KANIGA K.; TUCKER S.; TROLLINGER D.; GALAN J. E. Homologs of the *Shigella* IpaB and IpaC invasins are required for *Salmonella* Typhimurium entry into cultured epithelial cells. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 177, n. 14, p. 3965–3971, 1995.

KEEVIL, C. W.; HOUGH, J. S.; COLE, J. A. Regulation of 2-oxoglutarate dehydrogenase synthesis in *Citrobacter freundii* by traces of oxygen in commercial nitrogen gas and by glutamate. **Journal of General Microbiology**, London, v. 114, n. 2, p. 355-359, 1979.

KIM, Y. M.; SCHMIDT, B. J.; KIDWAI, A. S.; JONES, M. B.; DEATHERA, G. E.; KAISER, B. L.; BREWER, H. M.; MITCHELL, H. D.; PALSSON, B. O.; MCDERMOTT, J. E.; HEFFRON, F.; SMITH, R. D.; PETERSON, S. N.; ANSONG, C.; HYDUKE, D.R.; METZ, T.O.; ADKINS, J. N. *Salmonella* modulates metabolism during growth under conditions that induce expression of virulence genes **Molecular BioSystem**, London, v. 9, n. 6, p. 1522-1534, 2013.

KLUMPP, J.; FUCHS, T.M. Identification of novel genes in genomic islands that contribute to *Salmonella* Typhimurium replication in macrophages. **Microbiology**, Reading, v. 153, n. 4, p. 1207-1220, 2007.

KORBEL, J. O.; DOERKS, T.; JENSEN, L. J.; PEREZ-IRATXETA, C.; KACZANOWSKI, S.; HOOPER, S. D.; ANDRADE, M. A.; BORK, P. Systematic association of genes to phenotypes by genome and literature mining. **PLoS Biology**, Heidelberg, v. 3, n. 5, p. 134, 2005.

LEE, E. N.; SUNWOO, H. H.; MENNINEN, K.; SIM, J. S. In vitro studies of chicken egg yolk antibody (IgY) against *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium **Poultry Science**, Champaign, v. 8, n. 5, p. 632–641, 2002.

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

LEVINSON, W. **Microbiologia medica e imunologia**. McGraw-Hill: Artmed. 2010. 680 p.

LICHTMAN, S. N.; SARTOR, R. B.; Keku, J. B.; SCHWAB, J. H. Hepatic inflammation in rats with experimental small intestine bacterial overgrowth. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 98, n. 2, p. 414-423, 1990.

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.

LIN, E. C. C. Dissimilatory pathways for sugars, polyols, and carboxylates. In: NEIDHARDT, F. C. (Ed.) **Escherichia coli and Salmonella typhimurium**: Cellular and molecular biology. Washington: American Society for Microbiology, 1987. p. 244–284.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, Orlando, v. 25, p. 402-408, 2001,

LUCCHINI, S.; LIU, H.; JIN, Q.; HINTON, J. C.; YU, J. Transcriptional adaptation of *Shigella flexneri* during infection of macrophages and epithelial cells: insights into the strategies of a cytosolic bacterial pathogen. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, suppl. 1, p.88–102, 2005.

MACGREGOR, C. H.; SCHNAITMAN, C. A. Reconstitution of nitrate reductase activity and formation of membrane particles from cytoplasmic extracts of chlorate-resistant mutants of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.114, n. 3, p.1164-1176, 1973.

MAGGIO-HALL, L. A.; ESCALANTE-SEMERENA, J. C. *In vitro* synthesis of the nucleotide loop of cobalamin by *Salmonella typhimurium* enzymes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 96, n. 21, p. 11798–11803, 1999.

MAGGIO-HALL, L. A.; CLAAS, K. R.; ESCALANTE-SEMERENA, J. C. The last step in coenzyme B12 synthesis is localized to the cell membrane in bacteria and archaea. **Microbiology**, Reading, v. 150, n. 5, p. 1385-1395, 2004.

MAJOWICZ, S. E.; MUSTO, J.; SCALLAN, E.; ANGULO, F. J.; KIRK, M.; O'BRIEN, S. J.; JONES, T. F.; FAZIL, A.; HOEKSTRA, R. M. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. **Clinical Infectious Disease**, Boston, v. 50, n. 6, p. 882-889, 2010.

MARTINS-GREEN, M. The chicken chemotactic and angiogenic factor (cCAF), a CXC chemokine. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 33, n. 4, p. 427–432, 2001.

MARTINS-GREEN, M.; FEUGATE. J. E. The 9E3/cCAF gene product is a chemotactic and angiogenic factor that can initiate the wound healing cascade in vivo. **Cytokine** v.10, p. 522–535, 1998.

MATULOVA, M.; VARMUZOVA, K.; SISAK, F.; HAVLICKOVA, H.; BABAK, V.; STEJSKAL, K.; ZDRAHAL, Z.; RYCHLIK, I. Chicken innate immune response to oral infection with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Veterinary Research**, Les Ulis v. 20, p. 44-37, 2013.

MCMECHAN, A.; LOVELL, M.A.; COGAN, T.A; MARSTON, K.L.; HUMPREY, T.J.; BARROW, P.A. Glycogen production by different *Salmonella enterica* serotypes: contribution of functional glgC to virulence, intestinal colonization and environmental survival. **Microbiology**, Reading. v. 151, n. 12, p. 3969-3977, 2005.

MCSORLEY, S. J. The role of non-cognate T cell stimulation during intracellular bacterial infection. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 5, p. 319, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2014.00319>>.

MERCADO-LUBO, R.; LEATHAM, M.P.; CONWAY, T.; COHEN, P. S. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium mutants unable to convert malate to pyruvate and oxaloacetate are avirulent and immunogenic in BALB/c mice. **Infection and Immunity**, Washington, v.77, n. 4, p.1397–1405, 2009.

MIZUMOTO, N.; SASAI, K.; TANI, H.; BABA, E. Specific adhesion and invasion of *Salmonella* Enteritidis in the vagina of laying hens. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 111, n. 1-2, p.99–105, 2005.

MONTASSIER, H. J. Fisiopatologia do sistema imune. In: BERCHIERI JR., A.; SILVA, E.N.; FABIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doença das aves**. 2. ed. Campinas: Facta, 2009. p. 391-429.

MUNIZ, E. C. Atualidades no estudo das salmoneloses aviárias. XIII SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA E IV BRASIL SUL POULTRY FAIR. 2012 - Chapecó, SC - Brasil. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2012. p. 13-26.

MURPHY, P. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 12, p. 593- 633, 1994.

NEIDHARDT, F. C. Metabolism and general physiology. In **Escherichia coli and Salmonella** – Cellular and Molecular Biology, 2. ed. Washington: DC American Society for Microbiology, 1996. p. 187–1072

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

NUNES, J. S.; LAWHON, S. D.; ROSSETTI, C. A.; KHARE, S.; FIGUEIREDO, J. F.; GULL, T.; BURGHARDT, R. C.; BÄUMLER, A. J.; TSOLIS, R. M.; ANDREWS-

OBRADORS, N.; BADIA, J.; BALDOMA, L.; AGUILAR, J. Anaerobic metabolism of the L-rhamnose fermentation product 1,2-propanediol in *Salmonella* Typhimurium. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.170, n. 5, p. 2159–62, 1988.

OKAMURA, M.; LILLEHOJ, H. S.; RAYBOURNE, R. B.; BABU, U. S.; HECKERT, R. A.; TANI, H.; SASAI, K.; BABA, E.; LILLEHOJ, E. P. Differential responses of macrophages to *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.107, n. 3-4, p.327–335, 2005.

OPPENHEIM, I.; ZACHARIAE, C. O. C.; MUKAIDA, N.; MATSUSHIMA, K. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercine" cytokine family. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 9, p. 617-648, 1991.

OUYANG, W.; VALDEZ, P. IL-22 in mucosal immunity. **Mucosal Immunology**, London, v. 1, n. 5, p. 335–338, 2008.

PAIVA, J. B. **Infecção de aves por mutantes de Salmonella sorotipos Gallinarum, Pullorum e Enteritidis com deleção nos genes cobS e cbiA**. 2010. 106 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2010.

PAIVA, J. B.; PENHA FILHO, R. A. C.; ARGÜELLO, Y. M. S.; SILVA, M. D.; GARDIN, Y.; RESENDE, F.; BERCHIERI JUNIOR, A.; SESTI, L. Efficacy of several *Salmonella* vaccination programs against experimental challenge with *Salmonella* Gallinarum in commercial brown layer and broiler breeder hens. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 11, n. 1, p. 65-72, 2009.

PAN, Z.; CONG, Q.; GENG, S.; FANG, Q.; KANG, X.; YOU, M.; JIAO, X. Flagellin from recombinant attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a fundamental role in chicken innate immunity. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 19, n. 3, p. 304-312, 2012.

PAYNE, W. J. Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. **Bacteriological Reviews**, Baltimore, v. 37, n. 4, p. 409-452, 1973.

PERALTA, R.C.; YOKOYAMA, H.; IKEMORI, Y.; KUROKI, M.; KODAMA, Y. Passive immunization against experimental salmonellosis in mice by orally administered hen egg yolk antibodies specific for 14-kDa fimbriae of *Salmonella* Enteritidis. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 41, n. 1, p. 29–35, 1994.

PERESI, J. T. M.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; CARVALHO, I. S. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 32, n. 5, p. 477-483, 1998.

POLYMENIS, H. L.; ADAMS, L. G. Morphologic and cytokine profile characterization of *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection in calves with bovine leukocyte adhesion deficiency. **Veterinary pathology**, Washington v. 47, n. 2, p. 322–333, 2010.

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

POOLE, R.; INGLEDEW, W. Pathways of electrons to oxygen. In: NEIDHARDT, F. C. **Escherichia coli and Salmonella Typhimurium: Cellular and Molecular Biology**. Washington: American Society for Microbiology, 1987. p. 170-200.

PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A. **Microbiology**. 4. ed. Boston: Dubuque, 1993.

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

QURESHI, M. A.; HEGGEN, C. L.; HUSSAIN, I.; Avian macrophage: effector functions in health and disease. **Developmental and Comparative Immunology**, New York, v. 24, n. 2-3, p. 103–119, 2000.

QUESADA-CHANTO, A.; AFSCHAR, A. S.; WAGNER, F. Microbial production of propionic acid and vitamin B₁₂ using molasses or sugar. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 41, n. 4, p. 378-383, 1994.

RICHTER-DAHLFORS, A. A.; RAVNUM, S.; ANDERSSON, D. I. Vitamin B12 repression of the *cob operon* in *Salmonella* Typhimurium: translational control of the *cbiA* gene. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 13, n. 3, p. 541-553, 1994.

RONDON, M. R.; ESCALANTE-SEMERENA, J. C. The poc locus is required for 1,2-propanediol-dependent transcription of the cobalamin biosynthetic (*cob*) and propanediol utilization (*pdu*) genes of *Salmonella* Typhimurium. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 174, n. 7, p. 2267-2272, 1992.

ROOF, D. M.; ROTH, J. R. Ethanolamine utilization in *Salmonella* Typhimurium. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 170, n. 9, p. 3855–3863, 1988.

ROTH, J. R.; LAWRENCE, J. G.; BOBIK, T. A. Cobalamin (coenzyme B12): synthesis and biological significance. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 50, p. 137-181, 1996.

ROTH, J. R.; LAWRENCE, J. G.; RUBENFIELD. M.; KIEFFER-HIGGINS, S.; CHURCH, G.M. Characterization of the cobalamin (vitamin B12) biosynthetic genes

of *Salmonella* Typhimurium. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 175, n. 11, p. 3303–3316, 1993.

RYCHLIK, I.; KARASOVA, D.; SEBKOVA, A.; VOLF, J.; SISAK, F.; HAVLICKOVA, H.; KUMMER, V.; IMRE, A.; SZMOLKA, A.; NAGY, B. Virulence potential of five major pathogenicity islands (SPI-1 to SPI-5) of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis for chickens **BioMed Central Microbiology**, v. 9, p. 1-9, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-9-268>>.

SAHOO, M.; CEBALLOS-OLVERA, I.; BARRIO, L.; RE, F. Role of the inflammasome, IL-1 β , and IL-18 in bacterial infection. **The Scientific World Journal**, New York, v. 11, p. 2037-2050, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1100/2011/212680>>.

SAIER, M. H. JR.; FEUCHT, B. U. Coordinate regulation of adenylate cyclase and carbohydrate permeases by the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system in *Salmonella* Typhimurium. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.250, n. 17, p.7078-7080, 1975.

SAIER, M. H. Jr.; RAMSEIER, T. M. The catabolite repressor/activator (Cra) protein of enteric bacteria. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.178, n. 1., p.3411-3417, 1996.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**. A Laboratory Manual. New York: Cold spring harbor , 2001. v.1, p. 31-50.

SAMPSON, E. M. **Genetic analysis of the polyhedral organelles formed during b12-dependent growth on 1,2-propanediol in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2**. 2004. Thesis (graduate school) the University of Florida. University of Florida.

SANDERS, C. J.; YU, Y.; MOORE, D. A.; WILLIAMS, I. R.; GEWIRTZ, A. T.; Humoral immune response to flagellin requires T cells and activation of innate immunity. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 177, n. 5, p. 2810-2818, 2006.

SANTOS, R. L.; RAFFATELLU, M.; BEVINS, C. L.; ADAMS, L. G.; TÜKEL, C.; TSOLIS, R. M.; BÄUMLER, A. J. Life in the inflamed intestine, *Salmonella* style. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 17, n. 11, p. 498–506, 2009.

SASAI, K.; AITA, M.; LILLEHOJ, H. S.; MIYAMOTO, T.; FUKATA, T.; BABA, E. Dynamics of lymphocyte subpopulation changes in the cecal tonsils of chickens infected with *Salmonella* Enteritidis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 74, n. 4, p. 345–351, 2000.

SAVAGE, D. C. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 31, p. 107-133, 1977.

SALYERS, A. A.; WHITT, D. D. **Bacterial pathogenesis** : a molecular approach. 2. ed. Washington: ASM Press, 2002.

SEO, K. H.; HOLT, P. S.; VAUGHN, L. E.; GAST, R. K.; STONE, H. D. Detection of *Salmonella enteritidis*-specific immunoglobulin A antibodies in crop samples from chickens infected with *Salmonella* Enteritidis. **Poultry Science**, Champaign, v. 82, n. 1, p. 67–70, 2003.

SETTA, A. M.; BARROWA, 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 and Infectious Diseases**. Oxford, v. 35, n. 5, p. 397–410, 2012.

SCHULZ, S. M.; KÖHLER, G.; HOLSCHER, C.; IWAKURA Y.; ALBER G. IL-17A is produced by Th17, $\gamma\delta$ 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.

SHEELA, R. R.; BABU, U.; MU, J.; ELANKUMARAN, S.; BAUTISTA, D. A.; RAYBOURNE, R. B.; HECKERT, R. A.; SONG, W. Immune Responses against *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Infection in Virally Immunosuppressed Chickens. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 10, n. 4, p. 670–679, 2003.

SIERRA, Y. M.; PAIVA, J. B.; PENHA FILHO, R. A. C.; BERCHIERI JR., A. Participation of genes involved in the process of anaerobic respiration of infection in chickens by *Salmonella* Typhimurium. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, Botucatu, v. 3, n. 1, p. 2-8, 2009.

SMITH, M. W.; NEIDHARDT, F. C. Proteins induced by anaerobiosis in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.154, n. 1, p.336-343, 1983a.

SMITH, M. W.; NEIDHARDT, F. C. 2-Oxoacid dehydrogenase complexes in *Escherichia coli*: cellular amounts and patterns of synthesis. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 156, n. 1, p. 81-88, 1983b.

SPENCER, M. E.; GUEST, J. R. Transcription analysis of the sucAB, aceEF and lpd genes of *Escherichia coli*. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 200, n. 1, p. 145-154, 1985.

SRIKUMAR, S.; FUCHS, T. M. Ethanolamine utilization contributes to proliferation of *Salmonella enteric* serovar Typhimurium in food and in nematodes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 77, n. 1, p. 281–290, 2011.

SRINIVASAN, A.; FOLEY, J.; MCSORLEY, S. J. Massive number of antigen-specific CD4 T cells during vaccination with live attenuated *Salmonella* causes interclonal

competition. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v.172, n. 11, p.6884-6893, 2004.

STEEB B.; CLAUDI, B.; BURTON NA, TIENZ P, SCHMIDT A.; FARHAN, H.; MAZÉ, A. BUMANN, D. Parallel exploitation of diverse host nutrients enhances *Salmonella* virulence. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 4, e1003301, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003301>>.

STOUTHAMER, A. H. A genetical and biochemical study of chlorate-resistant mutants of *Salmonella* Typhimurium. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 35, n. 4, p. 505-521, 1969.

TAVECHIO, A. T.; FERNANDES, S. A.; NEVES, B. C.; DIAS, A. M. G.; IRINO, K.; Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 38, p. 315-322, 1996. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46651996000500001>>.

TAVECHIO, A. T.; GHILARD, A. C. R.; PERESI, J. T. M.; FUZIHARA, T. O., YONAMINE, E. K.; JAKABI, M.; FERNANDES, S. A. *Salmonella* serotypes isolated from nonhuman sources in São Paulo, Brazil, from 1996 through 2000. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 65, n. 6, p. 1042-1044, 2002.

TAYLOR, P.R.; MARTINEZ-POMARES, L.; STACEY, M.; LIN, H.H.; BROWN, G.D.; GORDON, S. Macrophage receptors and immune recognition. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 23, p. 901–944, 2005.

THIAGARAJAN, D.; SAEED, A. M.; ASEM, E. K. Mechanism of transovarian transmission of *Salmonella* Enteritidis in laying hens. **Poultry Science**, Champaign, v. 73, n. 1, p. 89-98, 1994.

THOMAS, A. D.; DOELLE, H. W.; WESTWOOD, A. W.; GORDON, G. L. Effect of oxygen on several enzymes involved in the aerobic and anaerobic utilization of glucose in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 112, n. 3, p.1099-1105, 1972.

TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária**, New York: ELSEVIER, 2010. p. 19-48.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TSANG, A. W.; HORSWILL, A. R.; ESCALANTE-SEMERENA, J. C. Studies of regulation of expression of the propionate (*prpBCDE*) operon provide insights into how *Salmonella* Typhimurium LT2 integrates its 1,2-propanediol and propionate catabolic pathways. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 180, n. 24, p. 6511–6518, 1998.

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

UTLEY, M.; FRANKLIN, D. P.; KROGFELT, K. A.; LAUX, D. C.; COHEN, P. S. A *Salmonella* Typhimurium mutant unable to utilize fatty acids and citrate is avirulent and immunogenic in mice. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 163, n. 2, p. 129-134, 1998.

VAN HELLEMOND, J. J.; TIELENS, A. G. Expression and functional properties of fumarate reductase. **The Biochemical Journal**, London, v. 304, n. 2, p. 321-331, 1994.

VAZQUEZ-TORRES, A.; FANG, F. C. *Salmonella* evasion of the NADPH phagocyte oxidase. **Microbes and Infection**, Paris, v. 3, n. 14-15, p. 1313–1320, 2001.

VOGEL, R. F.; ENTIAN, K. D.; MECKE, D. Cloning and sequence of the mdh structural gene of *Escherichia coli* coding for malate dehydrogenase. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 149, n. 1, p. 36-42, 1987.

WALTER, D.; AILION, M.; ROTH, J. Genetic characterization of the *pdu operon*: use of 1,2-propanediol in *Salmonella* Typhimurium. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 179, n. 4, p. 1013–1022, 1997.

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

WHO - World Health Organization. **Salmonella epidemiology**, 2008. Disponível em: <<http://www.safe-poultry.com/salmonellaepidemiology.asp>> Acesso em out, 2013.

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**, Paris, v. 4, n. 11, p. 1111–1120, 2002.

WILSON, R. L.; ELTHON, J.; CLEGG, S.; JONES, B. D. *Salmonella enterica* serovars Gallinarum and Pullorum expressing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium type 1 fimbriae exhibit increased invasiveness for mammalian cells. **Infection and Immunity**, Washington, v. 68, n. 8, p. 4782–4785, 2000.

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

WINTER, S. E.; THIENNIMITR, P.; WINTER, M. G.; BUTLER, B. P.; HUSEBY, D. L.; CRAWFORD, R. W.; RUSSELL, J. M.; BEVINS, C. L.; ADAMS, L. G.; TSOLIS, R. M.; ROTH, J. R.; BAUMLER, A. J. Gut inflammation provides a respiratory electron

acceptor for *Salmonella*. **Nature**, London, v. 467, p. 426–429, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/doi:10.1038/nature09415>>.

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

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

WOLK, K.; WITTE, E.; WALLACE, E.; DÖCKE, W.D.; KUNZ, S.; ASADULLAH, K.; VOLK, H.D.; STERRY, W.; SABAT, R. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. **European journal of immunology**, Weinheim, v. 36, n. 5, p. 1309–1323, 2006.

YIMGA, T. M.; LEATHAM, M. P.; ALLEN, J. H.; LAUX, D.C.; CONWAY, T.; COHEN, P. S. Role of gluconeogenesis and the tricarboxylic acid cycle in the virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in BALB/c mice. **Infection and Immunity**, Washington, v. 74, n. 2, p. 1130–1140, 2006.

YOKOYAMA, H.; UMEDA, K.; PERALTA, R. C.; HASHI, T.; ICATLO, F. C.; KUROKI, M.; IKEMORI, Y.; KODAMA, Y. Oral passive immunization against experimental salmonellosis in mice using chicken egg yolk antibodies specific for *Salmonella*
ZAGO, M. A.; MALVEZZI, M. Deficiência de vitamina B12 e de folatos: anemias megaloblásticas. In: FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia: fundamentos e prática**. São Paulo: Atheneu, 2001. p. 195–210.