

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DA DELEÇÃO DO GENE *mgtC* SOBRE A
PATOGENICIDADE DE *Salmonella* GALLINARUM EM AVES
SUSCEPTÍVEIS**

Lucas Bocchini Rodrigues Alves
Médico Veterinário

2022

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITO DA DELEÇÃO DO GENE *mgtC* SOBRE A
PATOGENICIDADE DE *Salmonella* GALLINARUM EM AVES
SUSCEPTÍVEIS**

Discente: Lucas Bocchini Rodrigues Alves

Orientador: Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior

Co-orientador: 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.

A474e

Alves, Lucas Bocchini Rodrigues

Efeito da deleção do gene mgtC sobre a patogenicidade de Salmonella Gallinarum em aves susceptíveis / Lucas Bocchini Rodrigues Alves. -- Jaboticabal, 2022

110 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Angelo Berchieri Junior

Coorientador: Oliveira Caetano de Freitas Neto

1. Aves domésticas Doenças. 2. Fatores de virulência. 3. Microorganismos patogênicos. 4. Mutagenese. 5. Imunologia veterinária. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

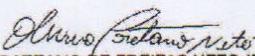
TÍTULO DA TESE: EFEITO DA DELEÇÃO DO GENE *mgtC* SOBRE A PATOGENICIDADE DE *Salmonella* GALLINARUM EM AVES SUSCEPTÍVEIS

AUTOR: LUCAS BOCCHINI RODRIGUES ALVES

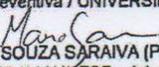
ORIENTADOR: ANGELO BERCHIERI JUNIOR

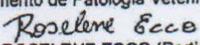
COORIENTADOR: OLIVEIRO CAETANO DE FREITAS NETO

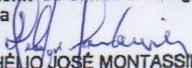
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Patologia Animal pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. OLIVEIRO CAETANO DE FREITAS NETO (Participação Virtual)
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva / Universidade Federal de Minas Gerais UFMG Belo HorizonteMG


Professor Doutor ANDRÉ PEREIRA LAGE (Participação Virtual)
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva / UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS


Pós-doutorando MAURO DE MESQUITA SOUZA SARAIVA (Participação Virtual)
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


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


Prof. Dr. HÉLIO JOSÉ MONTASSIER (Participação Virtual)
Departamento de Patologia Reprodução e Saúde Única / FCAV UNESP Jaboticabal

Jaboticabal, 31 de maio de 2022

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LUCAS BOCCHINI RODRIGUES ALVES – Nascido em 14 de Maio de 1990 na cidade de Franca, São Paulo, filho de Flávio Rodrigues Alves Filho e Lana de Paula Bocchini Rodrigues Alves. Em 2009, ingressou em Medicina Veterinária na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – UNESP/Jaboticabal, obtendo o título de Médico Veterinário em 2013. Durante a graduação, foi bolsista de iniciação na área de patologia animal, sob orientação do Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara e participou de projeto de extensão cadastrado na PROEX (Pró-reitoria de Extensão Universitária) com enfoque em assistência a propriedades leiteiras familiares, sob coordenação da Profa. Dra. Maria Imaculada Fonseca. Em Agosto de 2015, ingressou no mestrado da FCAV - UNESP/Jaboticabal pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária com estudo sobre a patogenicidade de mutante de *Salmonella Gallinarum* contendo a deleção dos genes *phoP* e *phoQ* sob orientação do Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior e co-orientação do Prof. Dr. Oliveira Caetano de Freitas Neto. Na mesma Instituição e sob mesma orientação e co-orientação, iniciou o doutorado em Agosto de 2017 pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Patologia Animal. Entre Março e Outubro de 2020, realizou estágio de doutorado na Universidade de Copenhague, Dinamarca, sob orientação do Prof. Dr. John Elmerdahl Olsen. Durante o período de pós-graduação realizou dois estágios docência na disciplina de Ornitopatologia da FCAV – UNESP/Jaboticabal. Atualmente é Médico Veterinário Especialista do setor de Qualidade Animal – Aves e Suínos (CIEX Agropecuária) da JBS/Seara Alimentos.

DEDICATÓRIA

Dedico

Aos meus pais, Flávio e Lana, aos meus irmãos Matheus e Danilo, à minha namorada Mirella, às minhas cunhadas Flávia e Patrícia e aos meus sobrinhos Vicente e Antônio.

Aos meus queridos avós Flávio, Rosita, Waldemar e Olga.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Flávio e Lana, por todo amor, educação e incentivo. Agradeço por me apoiarem em todas as decisões e por constituírem a base de minhas conquistas. Obrigado pela família que construíram e por serem meus maiores exemplos.

À Mirella, pelo começo de nossa caminhada juntos que se sustenta há nove anos baseado em apoio constante, amor e companheirismo. Obrigado por todo carinho e paciência em nosso dia a dia. Tenho enorme admiração por você.

Aos meus irmãos, Matheus e Danilo, por todo apoio, amor, companheirismo e compreensão. Vocês exercem perfeitamente o papel de irmãos mais velhos, sempre me ensinando e sendo grandes amigos.

Às minhas queridas cunhadas, Flávia e Patrícia. Obrigado por todo apoio, carinho e amizade. Agradeço por estarem presentes em minha vida e por todo o bem que nos fazem.

Aos meus amados sobrinhos, Vicente e Antônio. Obrigado por se tornarem mais uma alegria em nossas vidas e por serem um incentivo para me tornar cada dia melhor.

Aos meus avós, Flávio, Rosita, Waldemar e Olga por todo o carinho, amor e apoio. Tenho imenso orgulho em ser neto de vocês e por nos darem toda a base para a construção de nossa família. Agradeço também a todos tios e primos que contribuíram para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

À minha sogra, Zélia, por me tratar como filho com todo o amor e carinho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior, por todos os ensinamentos, incentivo, paciência e amizade. Um grande exemplo não só para mim, mas para todos da avicultura. Sou eternamente grato por investir em meu desenvolvimento profissional e pessoal ao longo desses anos.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Oliveiro Caetano de Freitas Neto, pela amizade, pelos ensinamentos e paciência. Obrigado pela sua co-orientação durante meu mestrado e doutorado. Tenho grande admiração por você.

Ao meu supervisor do doutorado sanduíche, Prof. Dr. John Elmerdahl Olsen, da Universidade de Copenhagen, Dinamarca, pela oportunidade e orientação. Agradeço pelo apoio de toda a equipe durante esse período.

À técnica do Laboratório de Ornitopatologia, Adriana, pela amizade e por todos os ensinamentos e discussões científicas. Muito obrigado pela paciência e apoio.

A todos do Laboratório de Ornitopatologia da FCAV. Sem vocês nada disso seria possível. Muito obrigado pela amizade, ensinamentos, ajuda e apoio constante. Agradeço pela excelente equipe construída e por tornarem meu dia-a-dia mais leve com as conversas compartilhadas entre um café e outro. Sou eternamente grato a cada um de vocês.

Aos membros da banca avaliadora, Prof^a. Roselene Ecco (UFMG), Prof. Andrey Pereira Lage (UFMG), Prof. Helio José Montassier (FCAV/Unesp) e Prof. Mauro Mesquita de Souza Saraiva (FCAV/Unesp), pelas críticas construtivas e contribuições que enriqueceram o trabalho.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/Unesp) por se tornar minha casa há 13 anos. Sou eternamente grato por toda a estrutura e suporte durante a minha graduação, mestrado e doutorado.

Ao Departamento de Patologia Veterinária pelos mais de 10 anos de convivência. Deixo meu profundo agradecimento aos docentes, em especial ao Prof. Bechara, Prof^a Rosângela, Prof. Alessi, Prof^a Rose e Prof. Marcos. Muito obrigado aos funcionários Mabel, Cristina, Edgar, Theo, Chica e Moema, além de todos os discentes com os quais convivi.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; Processos nº 2018/12416-7 [Doutorado regular - Rodrigues Alves, LB], nº 2019/25091-5 [BEPE – Rodrigues Alves, LB], nº 2019/16198-0 [de Lima, BN], nº 2018/03189-0 [Berchieri Junior, A]), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Programa de Excelência Acadêmica – PROEX; nº de processo 1754932) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), cujos

esforços e apoios financeiros possibilitaram o desenvolvimento desta tese. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da FAPESP, CAPES e CNPq.

Aos meus amigos de infância, Breno, Caio, Fúlvio, Gabriel, Leonel, Luís Felipe e Tarcísio, pelo companheirismo construído ao longo de quase 30 anos de amizade.

Aos meus amigos da República In-Dependência pelos anos de grande companheirismo, amizade, apoio constante e pelo crescimento pessoal e profissional.

Ao Jibril, Vanesa, Gang, Ahmed, Prahba, Mosaed, Xiao e Fabio. Obrigado pela amizade construída durante o período na Dinamarca.

À JBS/Seara Alimentos, em especial ao Ricardo, Khauston e Marcela da equipe de Qualidade Animal – Aves e Suínos (CIEX Agropecuária), pela oportunidade, parceria e início dessa nova caminhada profissional.

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

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA	iii
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	iv
COMPROVANTE DE CADASTRO DE ACESSO NO SISGEN	v
RESUMO	vi
SUMMARY	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Gênero <i>Salmonella</i>	1
1.1.1. Taxonomia.....	1
1.1.2. Características estruturais, fisiológicas e metabólicas	2
1.2. Salmoneloses	4
1.3. Tifo aviário.....	5
1.3.1. Imunopatogenia do tifo aviário	6
1.4. Ilhas de Patogenicidade de <i>Salmonella</i> (SPI) e infecção sistêmica	9
1.5. Gene <i>mgtC</i>	12
1.5.1. Características gerais e funções	12
1.5.2. Cascata regulatória envolvendo <i>mgtC</i>	14
2. OBJETIVOS	19
2.1. Geral.....	19
2.2. Específicos	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Instalações experimentais	20
3.2. Estirpes bacterianas utilizadas	20
3.3. Experimentos <i>in vitro</i>	37
3.3.1. Multiplicação bacteriana em meios limitantes	37
3.3.2. Curva de multiplicação bacteriana.....	38
3.3.3. Infecção de macrófagos	39

3.4. Experimentos <i>in vivo</i>	47
3.4.1. Aves utilizadas.....	47
3.4.2. Preparo dos inóculos.....	48
3.4.3. Avaliação da patogenicidade.....	49
3.4.4. Determinação da Dose Letal 50 (DL50)	50
3.4.5. Avaliação da infecção sistêmica.....	50
3.4.6. Avaliação da resposta imune do hospedeiro	52
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	61
5. RESULTADOS	62
5.1. Preparo da estirpe mutante SG $\Delta mgtC$	62
5.2. Multiplicação em meio limitante.....	65
5.3. Infecção de macrófagos	66
5.3.1. Células semelhantes a macrófagos da linhagem HD11	66
5.3.2. Macrófagos primários	66
5.4. Avaliação da patogenicidade de SG $\Delta mgtC$	68
5.5. Determinação da Dose Letal 50 (DL50)	69
5.5.1. Curva de multiplicação bacteriana em caldo Lisogenia.....	70
5.5.2. Experimento <i>in vivo</i> da Dose Letal 50 (DL50)	70
5.6. Avaliação da infecção sistêmica.....	71
5.7. Mensuração de citocinas por RT-qPCR	75
5.8. Contagem da população de macrófagos, CD4 ⁺ e CD8 ⁺	78
6. DISCUSSÃO.....	83
7. CONCLUSÃO.....	90
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
APÊNDICES	107
A. Verificação do tamanho dos amplicons	108
B. Cálculo da Dose Letal 50 (DL50).....	110

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

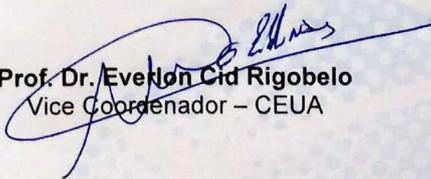


CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **“Efeito da deleção do gene *mgtC* sobre a patogenicidade de *Salmonella Gallinarum* em aves susceptíveis”**, protocolo nº 019047/17, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Angelo Berchieri Junior, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 07 de dezembro de 2017.

Vigência do Projeto	01/07/2018 a 07/05/2021
Espécie / Linhagem	<i>Gallus gallus domesticus</i> / Hy-line Brown (postura comercial)
Nº de animais	320 aves
Peso / Idade	35 gramas / 1 dia de vida
Sexo	Fêmea
Origem	Hy-line do Brasil LTDA

Jaboticabal, 07 de dezembro de 2017.


Prof. Dr. Everton Cid Rigobelo
 Vice Coordenador – CEUA

CERTIFICADO DA COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO - Seção 1

ISSN 1677-7042

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

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

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

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

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

PAULO AUGUSTO VIANNA BARROSO
Presidente da Comissão

EXTRATO DE PARECER TÉCNICO Nº 7.110/2020

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

Requerente: Embrapa Trigo.

CQB: 056/08

Processo SEI nº: 01245.002919/2020-80

Assunto: Alteração da Comissão Interna de Biossegurança - CIBio

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

Decisão: DEFERIDO

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

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

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

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

PAULO AUGUSTO VIANNA BARROSO

EXTRATO DE PARECER TÉCNICO Nº 7.111/2020

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

Requerente: Embrapa Agroenergia.

CQB: 345/12

Processo SEI nº: 01245.002796/2020-87

Assunto: Alteração da Comissão Interna de Biossegurança - CIBio

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

Decisão: DEFERIDO

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

PAULO AUGUSTO VIANNA BARROSO
Presidente da Comissão

EXTRATO DE PARECER TÉCNICO Nº 7.115/2020

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

Processo: 01245.002473/2020-93

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

CQB: 013/97

Assunto: Extensão de CQB.

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

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

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

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

PAULO AUGUSTO VIANNA BARROSO
Presidente da Comissão

EXTRATO DE PARECER TÉCNICO Nº 7.117/2020

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

Processo SEI nº: 01250.010132/2020-13

Requerente: Universidade Estadual Paulista - UNESP - Campus Jaboticabal

Endereço: Via de Acesso Professor Paulo Donato Casteliãe, s/n - Jaboticabal-SP. CEP: 14884-900

CQB: 088/98

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

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

Decisão: DEFERIDO

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

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

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

PAULO AUGUSTO VIANNA BARROSO

COMPROVANTE DE CADASTRO DE ACESSO NO SISGEN



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A835C00

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro:	A835C00
Usuário:	UNESP
CPF/CNPJ:	48.031.918/0001-24
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético
Finalidade do Acesso:	Pesquisa

Espécie

Salmonella enterica

Título da Atividade:	Efeito da deleção do gene <i>mgcC</i> sobre a patogenicidade de <i>Salmonella Gallinarum</i> em aves susceptíveis
----------------------	--

EFEITO DA DELEÇÃO DO GENE *mgtC* SOBRE A PATOGENICIDADE DE *Salmonella* GALLINARUM EM AVES SUSCEPTÍVEIS

RESUMO - *Salmonella* Gallinarum (SG) causa o tifo aviário, doença infecciosa de curso clínico agudo que acomete galináceos de qualquer idade e que resulta em elevada taxa de mortalidade. Durante a infecção sistêmica do quadro tifoide causado por *Salmonella* Typhimurium (STM) em camundongos, a bactéria expressa o gene *mgtC*, presente na Ilha de Patogenicidade de *Salmonella* – 3 (SPI-3). Sua função está aparentemente ligada à multiplicação bacteriana no interior de macrófagos e sua inativação atenua o patógeno. Dessa forma, hipotetizou-se que sua deleção do genoma de SG alteraria a patogenicidade do microrganismo em aves comerciais susceptíveis visto que a infecção sistêmica cumpre papel crucial para o patógeno. Assim, o presente estudo objetivou elucidar a importância do gene *mgtC* para a patogenicidade de SG. Para isso, foi construída uma estirpe mutante de *Salmonella* Gallinarum defectiva para o gene *mgtC* (SG Δ *mgtC*). Posteriormente, foi avaliada sua capacidade de multiplicação em meio de cultivo que mimetiza o ambiente intracelular dos macrófagos e também nesses tipos de células imunes. Além disso, foi conduzida a infecção com SG Δ *mgtC* e pela estirpe selvagem de aves susceptíveis para comparar a patogenicidade, infecção sistêmica e a resposta imune induzidas por meio da mensuração de mRNA das citocinas IFN- γ e LITAF por RT-qPCR e pela quantificação da população de macrófagos e linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ por imunohistoquímica. Foi observado que *mgtC* foi necessário na multiplicação de *Salmonella* Gallinarum em meio acidificado com baixa concentração de Mg²⁺ e em macrófagos. Porém, só houve menor contagem bacteriana na fase tardia da infecção, sem afetar a citotoxicidade. Experimentos *in vivo* demonstraram que a deleção de *mgtC* não alterou a capacidade de invasão bacteriana e nem a contagem microbiana em fígado e baço e a mortalidade total das aves. Entretanto, ao realizar a curva de sobrevivência e analisar a evolução do quadro clínico-patológico notou-se uma progressão mais lenta da doença em aves infectadas com SG Δ *mgtC* em comparação com aquelas desafiadas com a estirpe selvagem. Além disso, foi necessário 1,36 Log₁₀ de UFC/mL a mais de bactérias mutantes para causar 50 % de mortalidade em comparação com a estirpe selvagem. Ademais, a expressão de mRNA de IFN- γ e LITAF foi semelhante entre grupos infectados, mas maior em relação aos não-infectados. O mesmo foi observado nas populações de macrófagos e linfócitos T CD4⁺. Por outro lado, a presença de linfócitos T CD8⁺ foi maior na fase inicial da doença provocado pela estirpe selvagem. O papel de *mgtC* no tifo aviário difere para infecções tifoïdes em mamíferos, visto que sua deleção atenuou outros sorovares. Assim, a deleção do gene *mgtC* do genoma de *Salmonella* Gallinarum não afeta a patogenicidade, mas altera levemente a patogênese.

Palavras-chave: Infecção sistêmica, Macrófagos, Patogênese, Tifo aviário, Salmonelose, SPI-3

EFFECT OF *mgtC* GENE DELETION ON *Salmonella* GALLINARUM PATHOGENICITY IN SUSCEPTIBLE POULTRY

ABSTRACT – *Salmonella* Gallinarum (SG) provokes the so-called Fowl Typhoid, an infectious disease of acute clinical course that affects gallinaceous of any age and leads to high mortality rates. During the typhoid-like systemic infection caused by *Salmonella* Typhimurium (STM) in mice, the bacterium expresses the *mgtC* gene, which is clustered in the *Salmonella* Pathogenicity Island – 3 (SPI-3). Its function is apparently linked to bacterial replication within macrophages and its absence attenuates the pathogen. In this sense, it was hypothesized that knocking-out *mgtC* from SG genome could alter the microorganism pathogenicity in susceptible commercial poultry taking into account the central role of systemic infection to the pathogen. Thus, the present study sought to elucidate the importance of *mgtC* on SG pathogenicity. For this, a *mgtC*-lacking *Salmonella* Gallinarum mutant was constructed (SG $\Delta mgtC$). In addition, its ability to replicate in medium that mimics the intracellular environment of macrophages and also in this immune cell types was evaluated. Moreover, the infection of susceptible chickens by SG $\Delta mgtC$ and the wild-type strain was performed to compare the pathogenicity, systemic infection and the elicited immune responses by measuring mRNA of IFN- γ and LITAF cytokines by RT-qPCR and the population of macrophages and lymphocytes T CD4⁺ and CD8⁺ by means of immunohistochemistry. It was observed herein that *mgtC* was required for *Salmonella* Gallinarum replication in both acidified low-Mg²⁺ media and macrophages. Nevertheless, lower bacterial counts was only noticed at the late stage of infection without affecting the cytotoxicity. *In vivo* experiments showed that knocking-out the *mgtC* gene neither alters bacterial invasiveness ability nor affects bacterial counts in liver and spleen and total chicken mortality. However, plotting a survival curve and analysing the development of clinical-pathologic conditions, it was observed a slower progression of the disease in chickens infected by SG $\Delta mgtC$ compared to those challenged by the wild-type strain. Furthermore, it was required more 1.36 Log₁₀ of CFU/mL of mutant strain to provoke 50 % of mortality in comparison to the wild-type strain. Moreover, the mRNA expression of IFN- γ and LITAF were similar between the infected chickens, but higher than those uninfected. The same was observed in macrophages and lymphocytes T CD4⁺ populations. On the other hand, the presence of lymphocytes T CD8⁺ was higher in the initial phase of the disease provoked by the wild-type. The role of *mgtC* in Fowl Typhoid in susceptible chickens differs from the typhoid-like infections in mammals, since its depletion attenuated other serovars. Thus, the deletion of *mgtC* gene from *Salmonella* Gallinarum genome does not affect the pathogenicity, but slightly alters the pathogenesis.

Keywords: Fowl typhoid, Macrophages, Pathogenesis, Salmonellosis, SPI-3, Systemic infection

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACTB: Proteína de estrutura celular β -actina
- ADP: Adenosina difosfato
- Amp^r: Resistente à ampicilina
- ATP: Adenosina trifosfato
- °C: Graus Celsius
- CaCl₂.2H₂O: Cloreto de cálcio dihidratado
- CDS: Sequência(s) codificante(s)
- CD4: Grupamento de diferenciação 4
- CD8: Grupamento de diferenciação 8
- CDC: *Center for Disease Control and Prevention*
- cDNA: DNA complementar ao RNA mensageiro
- céls / mL: Células por mL
- CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais
- Cf: Resistente ao cloranfenicol
- CKC: *Chicken Kidney Cell*
- cm²: Centímetro quadrado
- CO₂: Dióxido de Carbono
- Cq: Ciclos de quantificação
- Δ Cq: Variação no ciclo de quantificação
- CS: Soro de galinha
- CTNBio: Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
- CXC: Quimiocina ligante CXC
- CXCLi1: Quimiocina ligante CXC de número 1 de galinhas
- CXCLi2: Quimiocina ligante CXC de número 2 de galinhas
- DAB: 3,3'-diaminobenzidine
- DEPC: Dicarbonato de dietila
- DH5 α : *Escherichia coli* estirpe DH5 α
- DHL: Desidrogenase Láctica Citosólica
- DL50: Dose Letal 50
- DNA: Ácido desoxirribonucleico

- Dnase: Desoxirribonuclease
dNTP: Desoxinucleotídeo trifosfato
DO: Densitometria Óptica
DO₄₉₀: Densitometria Óptica à 490 nm
DO₆₀₀: Densitometria Óptica à 600 nm
DPBS: Tampão Salina Fosfato fórmula Dulbecco
dpi: Dias após a infecção
DTAs: Doenças Transmitidas por Alimentos
E: Conversão da eficiência dos primers
%E: Eficiência de amplificação
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
F₁F_o: Unidades da ATP síntase
FBS: Soro fetal bovino
FLP: Recombinase flippase
FRT: Sítio de reconhecimento da enzima de restrição flippase
ḡ: Média geométrica
GALT: Tecidos Linfóides Associados ao Intestino
GAPDH: Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GI: Gene de interesse
h: Horas
H: Antígeno flagelar
H⁺: Hídron
HD11: Células semelhantes aos macrófagos da linhagem HD11
H₂O₂: Peróxido de hidrogênio
hpi: Horas pós-infecção
HPRT: Hipoxantina-guanina fosforribosil transferase
H₂S: Sulfeto de Hidrogênio
IFN-γ: Interferon gama
IL-12: Interleucina 12
IL-18: Interleucina 18
Kb: Kilopares de bases
kDa: Kilodalton

- KH₂PO₄: Fosfato monopotássico
- kV: Kilovolts
- kV / cm: kV por centímetro
- LA: Ágar de lisogenia
- LB: Caldo de lisogenia
- LB-5: LB com pH 5
- LB-7: LB com pH 7
- LIA: *Lysine Iron Agar*
- LITAF: Fator de Necrose Tumoral Alfa Induzido por Lipopolissacarídeo
- LPS: Lipopolissacarídeo
- M: Molar
- MC: Ágar MacConkey
- mg: Miligrama
- Mg²⁺: Íon magnésio
- MgCl₂: Cloreto de magnésio
- MgSO₄: Sulfato de magnésio
- MHC: Complexo Principal de Histocompatibilidade
- MIQE: *Minimum Information for Publication of Quatitative Real-Time PCR Experiments*
- mL: Mililitro
- mM: Milimolar
- MM: Marcador de Tamanho Molecular
- m / v: Massa por volume
- M9 Meio mínimo essencial M9
- M9-5: M9 suplementado com 10 µM MgSO₄ em pH 5,0
- M9-7: M9 suplementado com 10 mM MgSO₄ em pH 7,0
- µg: Micrograma
- µg/mL: µg por mL
- µL: Microlitro
- µm: Micromolar
- µm: Micrômetro

- NaCl: Cloreto de sódio
- Na₂HPO₄: Fosfato de sódio dibásico
- ng: Nanogramas
- ng/μL: Nanogramas por microlitro
- NK: *Natural Killer*
- NH₄Cl: Cloreto de amônia
- nm: Nanômetros
- NLRs: *NOD-like Receptors*
- NOD: *Nucleotide-binding Oligomerization Domain*
- Nramp1: *Natural resistance associated macrophage protein*
- nt: Nucleotídeos
- O: Antígeno somático
- O.C.T.: *Optimal Cutting Temperature*
- OIE: Organização Mundial da Saúde Animal
- ØP22: Bacteriófago P22
- ORFs: *Open Reading Frames*
- PAMP: *Pathogen Associated Molecular Patterns*
- pb: Pares de bases
- PBS: Tampão fosfato-salino ou solução salina fosfatada tamponada
- PCR: Reação em Cadeia da Polimerase
- pH: Potencial Hidrogeniônico
- Pi: Fósforo inorgânico
- PRRs: *Pattern Recognition Receptors*
- q.s.p.: Quantidade suficiente para
- QTL: *Quantitative Trait Locus*
- R: *Rough*
- r²: Coeficiente de correlação
- REF: Gene de referência
- RNA: Ácido ribonucleico
- Rnase: Ribonuclease
- rpm: Rotações por minutos

- RPMI: Meio Roswell Park Memorial Institute 1640
- RPMI-25: RPMI suplementado com 25 µg/mL de gentamicina
- RPMI-100: RPMI suplementado com 100 µg/mL de gentamicina
- rRNA: RNA ribossomal
- rRNA 28S: Subunidade 28S do ácido ribonucleico ribossomal
- RT-qPCR: PCR quantitativa via transcriptase reversa em tempo real
- RV: Caldo Rappaport-Vassiliadis
- S: *Smooth*
- SAL1: *Chicken Salmonellosis Resistance Locus*
- Salmonella bongori*: *Salmonella bongori*
- Salmonella enterica*: *Salmonella enterica*
- Salmonella* Enteritidis: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis
- Salmonella* Gallinarum: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Gallinarum
biovar Gallinarum
- Salmonella* Hadar: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Hadar
- Salmonella* Heidelberg: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Heidelberg
- Salmonella* Infantis: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Infantis
- Salmonella* Mbandaka: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Mbandaka
- Salmonella* Pullorum: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Gallinarum
biovar Pullorum
- Salmonella* Senftenberg: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Senftenberg
- Salmonella* Typhi: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhi
- Salmonella* Typhimurium: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium
- SCV: Vacúolo Contendo *Salmonella*
- SDS: Dodecil sulfato de sódio
- SE: *Salmonella* Enteritidis
- SG: *Salmonella* Gallinarum
- SG Δ mgtC: SG str. 287/91 contendo deleção da CDS do gene *mgtC*
- SG Fla⁺: SG expressando flagelo
- SG str. 287/91: *Salmonella* Gallinarum estirpe 287/91
- SisGen: Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético
- Slc11a1*: *Solute Carrier Family 11A member 1*

- SN: Selenito com novobiocina
- SP: *Salmonella Pullorum*
- SPI: Ilha de Patogenicidade de *Salmonella*
- SPI-1: Ilha de Patogenicidade de *Salmonella* do tipo 1
- SPI-2: Ilha de Patogenicidade de *Salmonella* do tipo 2
- SPI-3: Ilha de Patogenicidade de *Salmonella* do tipo 3
- SPI-4: Ilha de Patogenicidade de *Salmonella* do tipo 4
- SPI-5: Ilha de Patogenicidade de *Salmonella* do tipo 5
- spp.: *several species*
- ST: *Salmonella Typhi*
- STM: *Salmonella Typhimurium*
- TAE: Tampão Tris-Acetato-EDTA
- Th1: T Helper 1
- Th2: T Helper 2
- TL: Tampão de Lise
- TLRs: *Toll-like Receptors*
- TLR4: Receptor *Toll-like 4*
- TSI: *Triple Sugar Iron*
- TTSS: Sistema de Secreção do Tipo Três
- TTSS-1: Sistema de Secreção do Tipo Três da SPI-1
- TTSS-2: Sistema de Secreção do Tipo Três da SPI-2
- UB: Proteína sinalizadora Ubiquitina
- UFC: Unidades formadoras de colônias
- UFC / g: UFC por grama
- UFC / mL: UFC por mililitro
- UFP / mL: Unidades formadoras de placas por mililitro
- UP: Ultra-pura
- UV: Luz ultra-violeta
- V: Volts
- VB: Verde Brilhante
- VB NaI: Ágar Verde Brilhante contendo ácido nalidíxico
- Vi: Antígeno capsular

v / m: Volume por massa

v / v: Volume por Volume

x g: Gravidade

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Sequência dos iniciadores para confirmação da inserção do plasmídio pKD46 na estirpe SG str. 287/91.....	22
Tabela 2. Sequência dos iniciadores de mutagênese.....	23
Tabela 3. Sequência dos iniciadores para confirmação da mutação.....	23
Tabela 4. Composição do Tampão de Lise (TL) utilizado para extrair o DNA cromossômico das estirpes de SG.....	24
Tabela 5. Características dos plasmídios utilizados no processo de mutagênese e a suplementação de antibióticos em meios líquidos e sólidos para cultivo de microrganismos contendo o plasmídio de interesse.....	25
Tabela 6. Reagentes utilizados para confirmação da inserção do plasmídio pKD46 em SG str. 287/91.....	28
Tabela 7. Condições de ciclagem utilizada no termociclador para confirmar a inserção do plasmídio pKD46 em SG str. 287/91.....	29
Tabela 8. Reagentes utilizados para amplificação do fragmento linear do cassete de resistência ao cloranfenicol presente no plasmídio pKD3 com inserção da região adjacente do gene <i>mgtC</i>	30
Tabela 9. Condições de ciclagem no termociclador para confirmar a amplificação do fragmento linear do cassete de resistência ao cloranfenicol presente no plasmídio pKD3 contendo a região adjacente do gene <i>mgtC</i>	30
Tabela 10. Reagentes utilizados para confirmação da substituição do gene <i>mgtC</i> pelo cassete de resistência ao cloranfenicol.....	32
Tabela 11. Reagentes utilizados para a PCR confirmatória da deleção do gene <i>mgtC</i> do genoma de SG str. 287/91.....	33

Tabela 12. Combinação dos iniciadores utilizados na PCR de verificação e o tamanho molecular em pares de base (pb) dos fragmentos preditos <i>in silico</i>	33
Tabela 13. Reagentes utilizados para preparar o meio mínimo essencial M9 com diferentes concentrações de Mg ²⁺ e níveis de pH.....	37
Tabela 14. Distribuição das aves inoculadas oralmente com 1 mL das culturas das estirpes SG $\Delta mgtC$ e SG.....	49
Tabela 15. Distribuição dos grupos inoculados com diferentes doses para determinar a DL50 das estirpes mutante (SG $\Delta mgtC$) e selvagem (SG).....	50
Tabela 16. Protocolo de inoculação para avaliação da infecção sistêmica de SG $\Delta mgtC$ em comparação com SG em aves susceptíveis.....	50
Tabela 17. Sequência dos iniciadores referentes aos genes de referência e genes-alvo utilizados para RT-qPCR.....	55
Tabela 18. Anticorpos primários (CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e Monócitos/Macrófagos) utilizados.....	59
Tabela 19. Registro diário de óbitos ao longo de 21 dias de aves semipesadas inoculadas com 1 mL das estirpes mutante (Grupo A) ou selvagem (Grupo B) aos 21 dias de vida.....	69
Tabela 20. Dose Letal 50 (DL50) de poedeiras semipesadas inoculadas com 1 mL de diferentes doses de SG $\Delta mgtC$ ou SG ao longo de 21 dias.....	71
Tabela 21. Contagens bacterianas dos inóculos administrados.....	71
Tabela 22. Interação do tempo com a contagem de células viáveis de SG $\Delta mgtC$ e SG em órgãos após diferentes vias de inoculação.....	75
Tabela 23. Informações de amplificação para análise da expressão gênica relativa por RT-qPCR.....	76

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1.** Número de surtos de tifo aviário em aves domésticas notificados aos órgãos oficiais brasileiros entre os anos de 2005 e 2020. O termo “?” foi adotado em casos de ausência de notificações oficiais no período mesmo quando as autoridades assumiam que SG estava circulando entre os plantéis avícolas (Adaptado de: OIE, 2021)..... **5**
- Figura 2.** Predição das cascatas regulatórias mediadas pelo sistema de dois componentes PhoPQ em *Salmonella* Gallinarum biovar Gallinarum str. 287/91. O gene *mgtC* encontra-se entre os 48 genes ativados pelo sistema regulatório. Figura adaptada de Métris et al. (2017) disponível no *website* <<https://salmonet.org/>>..... **11**
- Figura 3.** Ambiente genético em que *mgtC* encontra-se inserido em *Salmonella* spp. e as funções de cada gene. Imagem adaptada de Lee e Groisman (2012a), Lee e Groisman (2012b), Choi et al. (2017b), Yeom et al. (2018), Park et al. (2019) e Yeom et al. (2020)..... **12**
- Figura 4.** Adaptação ao ambiente ácido e com pouco magnésio do SCV de estirpe selvagem de *Salmonella* spp. (1) e de estirpe contendo sistema PhoPQ defectivo em que não há expressão do operon *mgtCB* (2). ADP: adenosina difosfato; ATP: adenosina trifosfato; H⁺: hídrion; Mg²⁺: cátion magnésio; Pi: fósforo inorgânico; rRNA: RNA ribossomal; SCV: Vácuolo contendo *Salmonella*. Ilustrado por Rodrigues Alves (2017) com adaptação de Lee e Groisman (2012a), Groisman et al. (2013), Lee et al. (2013) e Pontes et al. (2016)..... **15**
- Figura 5.** Esquema representativo do genoma de SG str. 287/91 e das regiões em que estão codificados a SPI-3 (verde) e o gene *mgtC* (vermelho). A imagem circular foi desenvolvida utilizando o *software* DNAPlotter (Carver et al., 2009) vinculado ao Artemis v. 15.0.0..... **21**

- Figura 6.** Imagem aproximada destacando (círculo) uma célula da linhagem HD11 com morfologia semelhante ao macrófago (Objetiva 10x)..... **40**
- Figura 7.** Segregação de células mononucleares do sangue de galinhas: (a) sangue depositado na superfície de Ficoll-Paque na proporção 1:1 (v/v) formando duas interfaces previamente à centrifugação e (b) camada de células mononucleares com reduzida contaminação por células vermelhas do sangue após a segunda centrifugação utilizando-se meio Ficoll-Paque..... **42**
- Figura 8.** Contagem de células mononucleares viáveis (bordas azuladas e incolores internamente) em câmara hemocitométrica (objetiva de 10x)..... **43**
- Figura 9.** Cultivo de macrófagos primários derivados de monócitos do sangue periférico de galinhas (objetiva 10x). (a) A células isoladas foram depositadas no fundo do poço de placa de cultivo celular de 24 poços e (b) o meio foi repostado no segundo dia. (c) Observar a morfologia celular alongada em imagem aproximada no terceiro dia de cultivo..... **44**
- Figura 10.** Eletroforese em gel de agarose 1,5 % de produto amplificado da região adjacente ao gene *mgtC* do genoma de SG str. 287/91 utilizando os iniciadores *mgtC_F* e *mgtC_R*. MM: Marcador de Tamanho Molecular (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen™, EUA); 1: amostra de DNA de SG str. 287/91 (1,2 Kb)..... **62**
- Figura 11.** Após a eletroporação foi observado o aparecimento de colônias sugestivas tanto nas placas com 10 e 90 µL de SG contendo pKD46 e ausência de colônias na placa em que SG str. 287/91 foi semeado (A). Oito colônias sugestivas em LA com 10 µL do produto de eletroporação (A) foram semeadas em outra placa (B) da qual foram testadas para rugosidade (C)..... **63**

- Figura 12.** Eletroforese em gel de agarose 1,5 % da confirmação da deleção do gene *mgtC* do genoma de SG str. 287/91. **MM:** Marcador de Tamanho Molecular (100 bp Ladder Plus, Ready-to-use, Sinapse Inc, Brasil, código – M1071); **1, 5 e 9:** SG str. 287/91; **2, 6 e 10:** SG $\Delta mgtC$ Cfr; **3, 7 e 11:** SG $\Delta mgtC$; **4, 8 e 12:** Controle negativo..... **64**
- Figura 13.** Curvas de multiplicação de SG $\Delta mgtC$ e da estirpe selvagem SG em LB com (a) pH 7 e (b) pH 5. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os pontos das curvas..... **65**
- Figura 14.** Curvas de multiplicação de SG $\Delta mgtC$ e SG em meio mínimo M9 limitante com (a) 10 mM de Mg^{2+} e pH 7 e com (b) 10 μM Mg^{2+} e pH 5. *, diferenças estatísticas ($P < 0,05$)..... **65**
- Figura 15.** (a) Captura de SG $\Delta mgtC$ e SG por células semelhantes a macrófagos da linhagem HD11 e (b) sobrevivência bacteriana ao longo de 20 hpi no ambiente intracelular. Além disso, foi avaliada a (c) sobrevivência fold-net das duas estirpes. ns, $P > 0,05$; *, $P < 0,05$ **66**
- Figura 16.** (a) Captura, (b) sobrevivência *fold-net* e (c) sobrevivência *fold-net* de SG $\Delta mgtC$ e SG ao longo de 20 hpi no interior de macrófagos primários derivados de monócitos do sangue periférico de galinhas. ns, $P > 0,05$; *, $P < 0,05$ **67**
- Figura 17.** Porcentagem (%) da lise de macrófagos primários derivados de monócitos do sangue periférico de galinhas causado por SG $\Delta mgtC$ e SG nos estágios inicial (4 hpi) e tardio (20 hpi) da infecção. ns, $P > 0,05$ **68**
- Figura 18.** Curva de sobrevivência de aves infectadas com as estirpes mutante (SG $\Delta mgtC$) e selvagem (SG). *, diferença estatística significativa ($P < 0,05$) considerando os eventos de óbitos ao longo do tempo por meio do teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon..... **69**

- Figura 19.** Curva de multiplicação das estirpes selvagem (SG) e mutante (SG $\Delta mgtC$) em LB ao longo de 14 horas..... 70
- Figura 20.** Aos 5 dpi, notar hepatomegalia nas aves dos grupos L e N em comparação ao controle negativo (Grupo P), além da presença de focos inflamatórios na superfície subcapsular hepática (seta branca) e esplênica do Grupo N. Ademais, houve esplenomegalia moderada (Grupo L) e severa (Grupo N). Já aos 7 dpi, os processos inflamatórios foram mais evidentes na superfície subcapsular do órgão (setas brancas) nas aves desafiadas com SG (Grupos N e O) do que nas desafiadas com SG $\Delta mgtC$ (Grupos L e M)..... 72
- Figura 21.** Aos 10 dpi, observar as massas musculares peitorais (setas brancas) e hepatomegalia (setas pretas) das aves inoculadas oralmente com as estirpes mutante (Grupo L) e selvagem (Grupo N). Aves não inoculadas (Grupo P) apresentavam bom desenvolvimento muscular e não tiveram alterações hepáticas e esplênicas. Notar perda de musculatura, hepatoesplenomegalia, alteração na coloração do fígado e presença de focos brancos nas superfícies subcapsular hepática (hepatite) e esplênica (esplenite) de aves desafiadas (Grupos L e N)..... 73
- Figura 22.** Contagem de células viáveis de SG $\Delta mgtC$ e SG em fígado e baço e curvas polinomiais das mesmas. ns, diferenças não-significativas ($P > 0,05$)..... 74
- Figura 23.** Níveis de expressão de mRNA relativo às citocinas LITAF e IFN- γ em baço e tonsilas cecais de aves não-infectadas e inoculadas oralmente com SG $\Delta mgtC$ e SG. *, estatisticamente diferente ($P < 0,05$); ns, diferenças estatísticas não-significativas ($P > 0,05$)..... 77
- Figura 24.** Secções de fígado (acima) aos 5 dpi e tonsilas cecais (abaixo) aos 7 dpi com imunomarcção de macrófagos (marrom) de aves não-infectadas (CN) ou inoculadas oralmente com SG $\Delta mgtC$ ou SG. Imagens registradas em objetiva de 40x..... 79

- Figura 25.** Secções de tonsilas cecais (acima) aos 2 dpi e fígado (abaixo) aos 7 dpi com imunomarcção de linfócitos T CD8⁺ (marrom) de aves não-infectadas (CN) ou inoculadas oralmente com SG Δ *mgtC* ou SG. Imagens registradas em objetiva de 40x..... **80**
- Figura 26.** Secções de tonsilas cecais (acima) e fígado (abaixo) aos 7 dpi com imunomarcção de linfócitos T CD4⁺ (marrom) de aves não-infectadas (CN) ou inoculadas oralmente com SG Δ *mgtC* ou SG. Imagens registradas em objetiva de 40x..... **81**
- Figura 27.** População de macrófagos, CD8⁺ e CD4⁺ em tonsilas cecais e fígado de aves não-infectadas ou inoculadas oralmente com SG Δ *mgtC* ou SG. *, estatisticamente diferente ($P < 0,05$); ns, diferenças estatísticas não-significativas ($P > 0,05$)..... **82**
- Figura 1A.** Formato “.fasta” disponível na plataforma NCBI. Clicar em *create file* para realizar o download do arquivo..... **108**
- Figura 2A.** Genoma de SG str. 287/91 importado para o *software CLC Sequence Viewer*. À direita, encontra-se a janela *Sequence Settings* em que foram acrescentadas as seqüências dos iniciadores de checagem..... **109**

1. INTRODUÇÃO

1.1. Gênero *Salmonella*

1.1.1. Taxonomia

Em 1886, Salmon e Smith foram os pioneiros na descrição de *Salmonella* spp., mas que, erroneamente, o identificaram como o agente causador da peste suína (Freitas Neto et al., 2020). Quase meio século depois, Kauffmann e White propuseram um esquema de classificação do gênero *Salmonella* baseando-se na identificação de estruturas de superfície da bactéria, tais como os antígenos somáticos (O) e flagelares (H) (*Salmonella* Subcommittee, 1932). Posteriormente, a técnica foi aperfeiçoada e aliou-se a identificação dos antígenos capsulares (Vi) e as provas bioquímicas (Grimont et al., 2000; Grimont e Weill, 2007). Esse método prevalece desde então e, à medida que se identificam novos espécimes, os mesmos são catalogados como dados suplementares (Issenhuth-Jeanjean et al., 2014). Uma vez que Le Minor catalogou a maioria dos microrganismos identificados, a sistemática de classificação tem sido nomeada como *White-Kauffman-Le Minor Scheme* (Grimont e Weill, 2007).

Há duas espécies do gênero *Salmonella*, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*, cuja diferenciação entre ambas foi comprovada por meio de análises filogenéticas (Grimont et al., 2000). No início dos anos 2000, foram identificados 2463 sorovares diferentes (Popoff et al., 2001) e, após sete anos, aumentou para 2579 (Grimont e Weill, 2007). Até o presente momento, foram identificados 2659 sorovares do gênero *Salmonella*, dos quais 2637 pertencem à espécie *S. enterica* e 22 à *S. bongori* (Issenhuth-Jeanjean et al., 2014).

A escrita da nomenclatura desses patógenos deve seguir a forma extensa (“Gênero espécie” “subespécie” “Sorovar” “Biovar”) ou a resumida (“Gênero” “Sorovar” e/ou “Biovar”). Dessa forma, pode-se nomear o agente etiológico do tifo aviário como *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Gallinarum biovar Gallinarum ou, resumidamente, como *Salmonella* Gallinarum biovar Gallinarum ou mesmo *Salmonella* Gallinarum (Grimont e Weill, 2007).

1.1.2. Características estruturais, fisiológicas e metabólicas

Apesar de pertencerem a um único gênero, as características estruturais, fisiológicas e metabólicas, bem como a patogenicidade, podem diferir entre os sorovares ou biovares (Holt et al., 1994; Brasil, 2011; Freitas Neto et al., 2020). Contudo, assim como outros microrganismos da família Enterobacteriaceae, essas bactérias são pequenos bacilos Gram-negativos com tamanhos que variam entre 0,3–1,0 × 1,0–6,0 µm, não formam endósporos ou microcistos e são anaeróbios facultativos (Brenner e Farmer, 2015). Ademais, são patógenos intracelulares (Marcus et al., 2000) e comumente móveis com flagelos peritríqueos (Grimont e Weill, 2007; Issenhuth-Jeanjean et al., 2014).

A primeira etapa de diferenciação dos sorovares segue o esquema proposto por White-Kauffmann-Le Minor por meio da identificação dos antígenos de superfície O, H e Vi. O antígeno O é termoestável e pode ser dividido em fase lisa (*Smooth* – S) ou rugosa (*Rough* – R) (Grimont e Weill, 2007). No primeiro caso, ocorre aglutinação quando em contato com antissoro específico. Já em fase rugosa há comprometimento da integridade da parede celular, o que torna a bactéria autoaglutinável em solução salina. Ademais, a estirpe rugosa é facilmente fagocitável e sua patogenicidade atenuada devido ao aumento da sensibilidade à ação do sistema complemento (Brasil, 2011). Já o antígeno H está presente em bactérias móveis, sendo composto pelas proteínas termolábeis denominadas flagelinas. Além disso, podem ser identificadas nas fases 1 ou 2 (Grimont e Weill, 2007; Brasil, 2011). Por último, o antígeno Vi é termolábil e poucos sorovares apresentam essa estrutura. Apesar da ampla variedade de antígenos de superfície, a existência de uma mesma composição antigênica entre alguns sorovares é possível e, sendo assim, a segunda etapa da diferenciação ocorrerá por meio de características bioquímicas, de patogenicidade ou de habitat (Grimont e Weill, 2007).

A temperatura ótima de multiplicação de *Salmonella* spp. é de 37 °C (Holt et al., 1994), podendo variar entre 35 e 43 °C (Brasil, 2011). O potencial Hidrogeniônico (pH) ótimo é de 7 a 7,5, suportando extremos de 3,8 a 9,5. Além disso, possui atividade hídrica igual ou superior a 0,94 (Brasil, 2011). Na superfície de ágar nutriente, formam colônias arredondadas de bordas lisas e brilhantes, cujos diâmetros variam de 2 a 4 milímetros (Holt et al., 1994).

Salmonella spp. fermenta glicose, processo do qual resulta em produção de gás (Holt et al., 1994; Brasil, 2011). Ressalta-se que pode fermentar arabinose, dulcitol, maltose, manitol, manose, ramnose, sorbitol, trealose e xilose e acidificar o meio por meio da produção de ácido. Por outro lado, não utiliza a lactose, sacarose e malonato como nutrientes. Produz enzimas que, em meios de cultura específicos como o Ágar Lisina Ferro (*Lysine Iron Agar* - LIA) e o Ágar Ferro-Açúcar Triplo (*Triple Sugar Iron* - TSI) (Brasil, 2011), geram Sulfeto de Hidrogênio (H₂S) (Holt et al., 1994; Brasil, 2011; Brenner e Farmer, 2015). É catalase positivo e oxidase negativo, além de ser capaz de descarboxilar lisina e ornitina, utilizar citrato como única fonte de carbono e reduzir nitrito em nitrato. Ademais, não hidroliza uréia, não desamina fenilalanina e triptofano e nem produz indol (Brasil, 2011; Brenner e Farmer, 2015).

1.1.2.1. Particularidades de *Salmonella Gallinarum*

Pertencente ao Sorogrupo O9 (Grupo D), *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar Gallinarum é dividido nos biovares Gallinarum (*Salmonella* Gallinarum ou SG) e Pullorum (*Salmonella* Pullorum ou SP) (Grimont e Weill, 2007). Apesar de constituírem o mesmo sorovar, esses dois patógenos causam enfermidades distintas em galináceos (Freitas Neto et al., 2020). Ambas as bactérias se diferem de outras salmonelas por não possuírem flagelos e, portanto, são as únicas imóveis identificadas até o momento (Holt et al., 1994; Freitas Neto et al., 2020; Brenner e Farmer, 2015). Dessa forma, a fórmula antigênica dos biovares é 1,9,12:-:- (Grimont e Weill, 2007).

Apesar de serem filogeneticamente e estruturalmente semelhantes, existem estirpes atípicas de SG e SP que podem dificultar a diferenciação bioquímica (Freitas Neto et al., 2020). A produção de gás e H₂S por SG e SP é pouco evidente (Brasil, 2011) e não utilizam citrato (Brenner e Farmer, 2015). Além disso, SG não descarboxila ornitina e algumas estirpes não fermentam ramnose e sorbitol. Ademais, SP não fermenta o dulcitol, açúcar que pode ser fermentado por algumas estirpes de SG (Brasil, 2011; Brenner e Farmer, 2015). Dessa forma, técnicas moleculares complementando métodos bacteriológicos tradicionais auxiliam na diferenciação entre os dois biovares (Batista et al., 2013).

1.2. Salmoneloses

Filogeneticamente, *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* divergiram de um ancestral em comum entre 100 e 160 milhões de anos atrás (Ochman e Wilson, 1987) e a adaptação de *Salmonella enterica* aos hospedeiros vertebrados iniciou-se há, aproximadamente, 10 milhões de anos (Galán, 2001). Durante o processo evolutivo, alguns sorovares de *Salmonella* se tornaram hospedeiro-específicos enquanto outros mantiveram a capacidade de acometer diversas espécies (Freitas Neto et al., 2020), formando uma cadeia epidemiologicamente complexa (Zhang-Barber et al., 1999).

Há dois quadros infecciosos ocasionados por *Salmonella* spp.: sistêmico e local. A infecção local nem sempre implica em doença clínica, porém ocorre colonização do trato gastrointestinal por sorovares que infectam múltiplas espécies (Freitas Neto et al., 2020). Aproximadamente 100 desses sorovares são zoonóticos (CDC, 2016) e comumente estão associados a surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) em seres humanos a partir do consumo de carnes de ave, bovina e suína, além de ovos, vegetais e sucos (Freitas Neto et al., 2010). Nesses casos, a dose infectante varia de 10^5 a 10^8 Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL) (Brasil, 2011). Já a infecção sistêmica é causada por salmonelas que invadem um número restrito de hospedeiros e que provocam doença que pode evoluir ao óbito, tais como *Salmonella* Typhi (ST) em seres humanos, STM em camundongos, *Salmonella* Dublin (SD) em bovinos, assim como SG e SP em aves (Berchieri et al., 2001). Na última categoria animal citada, existem três enfermidades distintas causadas por *Salmonella* spp.: a pulorose, cujo agente infeccioso é SP; o tifo aviário, causado por SG; e o paratifo aviário, causado por qualquer outro sorovar (Poppe, 2000; Freitas Neto et al., 2020).

Historicamente, *Salmonella* Typhimurium (STM) e *Salmonella* Enteritidis (SE) são os sorovares mais isolados em produtos de origem avícola (Freitas Neto et al., 2010), porém alguns estudos epidemiológicos mais recentes apontam o aumento na incidência de *Salmonella* Mbandaka, *Salmonella* Senftenberg, *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* Minnesota em granjas brasileiras (Baptista et al., 2018; Benevides et al., 2020; Kipper et al., 2020). Por outro lado, SG é isolado em menor frequência, mas sua notificação é negligenciada no Brasil (Figura 1) e em outros países em

desenvolvimento (OIE, 2021), dificultando o levantamento epidemiológico e a adoção de medidas de controle (Freitas Neto et al., 2020).

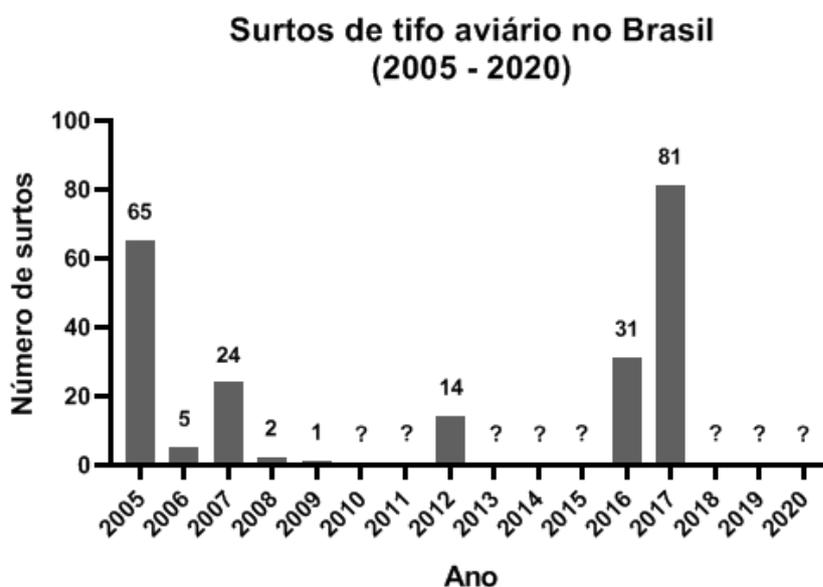


Figura 1. Número de surtos de tifo aviário em aves domésticas notificados aos órgãos oficiais brasileiros entre os anos de 2005 e 2020. O termo “?” foi adotado em casos de ausência de notificações oficiais no período mesmo quando as autoridades assumiam que SG estava circulando entre os plantéis avícolas (Adaptado de: OIE, 2021).

1.3. Tifo aviário

O tifo aviário é uma doença que acomete os galináceos. Na produção animal, seu maior impacto é em animais da espécie *Gallus gallus domesticus*. Aves de qualquer idade podem apresentar sinais clínicos (Freitas Neto et al., 2020), mas ao considerar a linhagem, aves leves são mais resistentes a doença do que as semipesadas e pesadas (Oliveira et al., 2005).

Quando infectados, os animais ficam apáticos, sonolentos, com asas caídas, desidratados, reduzem o consumo de ração e excretam fezes diarreicas amarelo-esverdeadas (Freitas Neto et al., 2007). Com o agravamento do quadro, podem ser registradas taxas de mortalidade variando entre 10 a 80% do lote no campo (Freitas Neto et al., 2020), podendo alcançar os 90 % em infecções experimentais (Rodrigues Alves et al., 2018). Ao exame necroscópico, são comumente observados hepatoesplenomegalia de três a quatro vezes, fígado de coloração amarelo-esverdeado, hidropericárdio, focos inflamatórios esbranquiçados nos parênquimas

hepático e cardíaco, além de atrofia de folículos ovarianos (Freitas Neto et al., 2007; Freitas Neto et al., 2020).

1.3.1. Imunopatogenia do tifo aviário

O desencadeamento e a evolução patológica do tifo aviário dependem de uma série complexa de eventos até a morte do animal (Assoku e Penhale, 1974). Ao ser ingerida, SG pouco coloniza o intestino das aves (Setta et al., 2012; Rychlik et al., 2014) e, por ser aflagelar, provoca pobre resposta imune inata local (Kaiser et al., 2000). Esse mecanismo possibilita a invasão sistêmica através dos Tecidos Linfóides Associados ao Intestino (GALT), como placas de Peyer e tonsilas cecais, cuja composição é rica em linfócitos B e T, heterófilos, macrófagos, células dendríticas e *Natural Killers* (NK) (Smith e Beal, 2008). O sistema imune inato possui receptores *Toll-like* (*Toll-like Receptors* – TLRs) que reconhecem moléculas específicas denominadas Padrões Moleculares Associados ao Patógeno (PAMPs – *Pathogen Associated Molecular Patterns*), tais como o lipopolissacarídeo (LPS) (Medvedev et al., 2006). Quando no interior das células do hospedeiro, essas estruturas são reconhecidas por Receptores de Reconhecimento de Padrões (*Pattern Recognition Receptors* – PRRs) ou por Receptores de tipo NOD (*NOD-like Receptors* – NLRs) que recrutam células imunes para os tecidos para limitar a virulência bacteriana por meio da indução da secreção de proteínas pró-inflamatórias, como o Fator de Necrose Tumoral (Wemyss e Pearson, 2019). Nos primeiros momentos pós-infecção por SG, a produção de Fator de Necrose Tumoral Alfa Induzido por Lipopolissacarídeo (LITAF) em tonsilas cecais é elevada e está correlacionada com o aumento de macrófagos nesses tecidos (Setta et al., 2012). Posteriormente, SG reside em macrófagos que se disseminam para o fígado e o baço das aves (Barrow et al., 1994; Wigley et al., 2002). Sendo assim, SG é encontrado no intestino da ave somente logo após a ingestão da bactéria durante o estágio inicial da infecção e no estágio final durante a septicemia, momento em que a ave está moribunda (Wigley et al., 2002; Freitas Neto et al., 2020).

Aves susceptíveis ao tifo aviário, tais como as de linhagens semi-pesada e pesada, desenvolvem lesões anatomopatológicas mais extensas e apresentam taxas de mortalidade mais elevadas em surtos quando comparados com as resistentes, ou leves (Wigley et al., 2002; Celis-Estupiñan et al., 2017). Histologicamente, as últimas

citadas apresentam focos de inflamação restritos no fígado e extensos no baço. Por outro lado, as susceptíveis desenvolvem inflamação intensa e áreas extensas de necrose no fígado, elevado influxo de células inflamatórias e áreas de necrose nesse órgão (Psifidi et al., 2018). Baseando-se em outros patógenos, uma desregulação dos mecanismos que controlam a sinalização por TLR hiperativa as células do hospedeiro pelos debrís bacterianos, resultando em choque séptico. Assim, uma inflamação excessiva pode resultar em morte (Medvedev et al., 2006). Entretanto, mais estudos precisam ser conduzidos para elucidar a dinâmica imune envolvida no tifo aviário.

Durante a fase aguda da infecção, SG causa efeito citopático de leucócitos que, por sua vez, provoca a lise celular e liberação bacteriana no meio extracelular (Garcia et al., 2009). A destruição de SG pela quebra do lipopolissacarídeo resulta no rápido acúmulo dessa endotoxina nos tecidos (Buxton e Davies, 1963). Em seguida, os fragmentos são adsorvidos pelos eritrócitos e modificam essas células de defesa. Com isso, ocorre o processo de eritrofagocitose para a retirada dessas células da circulação sanguínea e sua destruição por intermédio de células reticulares e macrófagos, resultando em quadro de anemia (Assoku e Penhale, 1974). Dessa forma, a ação citolítica e citopática (Buxton e Allan, 1963) de SG desencadeia o quadro de leucopenia (Freitas Neto et al., 2007; Garcia et al., 2009) que tem sido correlacionado com os óbitos durante o tifo aviário (Garcia et al., 2009).

O *clearance* da infecção primária é dominado pela resposta do tipo Th1 (Whitanage et al., 2005). As células T desempenham papel fundamental durante o curso infeccioso de *Salmonella* spp. por mediar a resposta imune celular e, conseqüentemente, se envolver na formação da resposta imune adaptativa. Células T CD4⁺ e CD8⁺ são os maiores produtores da citocina Interferon-gama (IFN- γ) que, por sua vez, ativam os macrófagos teciduais e sanguíneos (Pati et al., 2013). Além de promover a ação microbicida dos fagócitos, IFN- γ induz a expressão de quimiocinas CXC que recrutarão outras células do sistema imune, como neutrófilos e monócitos, prevenindo a disseminação bacteriana (Owen et al., 2014; Owen et al., 2016). De modo a intensificar a resposta imune, os macrófagos produzem citocinas pró-inflamatórias (IL-12 e IL-18) que promovem a expressão de IFN- γ por células NK e linfócitos T, aumentando sua própria ativação (Wigley et al., 2005). A reatividade

linfóide nos órgãos sugere intensa ação da resposta imune para eliminar a bactéria (Whitnager et al., 2005).

Além disso, a expressão de IL-12 e IL-18 e quimioquinas (CXCL1 e CXCL2) de macrófagos de aves resistentes tende a ser mais rápida e eficaz, induzindo produção de IFN- γ por meio da resposta adaptativa do tipo Th1 (Wigley et al., 2006). Em quadros infecciosos persistentes, como no caso da pulrose (infecção por *Salmonella Pullorum*), há inibição da produção de IL-18 e a resposta Th1. Em contrapartida, a resposta do tipo Th2 é ativada e pode permitir a evasão do *clearance* e posterior persistência no hospedeiro (Tang et al., 2018).

O sistema fagocitário mononuclear possui papel central na resistência de linhagens ao tifo aviário. Estudo *in vitro* conduzido por Wigley et al. (2002) demonstrou que a atividade antimicrobiana dos macrófagos provenientes de aves leves (resistentes) é mais intensa e elimina SG em aproximadamente 24 horas, enquanto que aquelas oriundas de aves susceptíveis necessitam de pelo menos 48 horas. A maior taxa de eliminação pode ser devido ao aumento da explosão respiratória (*respiratory burst*) nas linhagens resistentes (Wigley et al., 2002).

Ao longo dos anos, estudos têm sido conduzidos de modo a elucidar a relação da genética da ave com os mecanismos envolvidos na resistência ao tifo aviário (Lambert e Knox, 1932; Wigley et al., 2002; Psifidi et al., 2018). A resistência contra *Salmonella* spp. em diversas espécies animais depende do Complexo Principal de Histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex* – MHC), do Receptor *Toll-like 4* (*Toll-like Receptor 4* – TLR4), do gene *Slc11a1* (*Solute Carrier Family 11A member 1*, também conhecido como *Natural resistance associated macrophage protein* – Nramp1) e do *locus SAL1* (Wigley, 2004). Na infecção sistêmica causada por SG em aves, a resistência mediada por TLR-4 ou MHC possui pouco ou nenhum impacto, respectivamente (Wigley et al., 2002). *Nramp1* de aves possui diferenças intergênicas em comparação com o de camundongos e humanos (Hu et al., 1995) e não há diferenças consistentes entre os genótipos de resistentes e susceptíveis, indicando que o gene não possui um papel central na resistência (Wigley, 2004). Já o *locus SAL1*, presente no cromossomo 5 de galinha (Mariani et al., 2001) e previamente associado à resistência contra SG (Wigley et al., 2002), intensifica a ação antimicrobiana dos macrófagos (Wigley, 2004) por meio da resposta oxidativa (Wigley

et al., 2002) na fase aguda da infecção (Berchieri Junior et al., 2001). Entretanto, a indução da explosão oxidativa por *SAL1* contra SG é baixa ou mesmo não observada em aves susceptíveis (Wigley et al., 2002).

Recentemente, Psifidi e colaboradores (2018) dissecaram uma suposta rede de expressão gênica relacionada à resposta da ave contra SG. Nesse estudo foram identificados diversos *Locus* de Características Quantitativas (*Quantitative Trait Locus* – QTL) associados à resistência, destacando-se a região genômica *SAL1*. Nela encontram-se 14 genes, dos quais *JAK3*, *KRAS*, *GYS2*, *PPP2CA*, *YWHAG* e, principalmente, *AKT1* cuja sinalização ocorre via P13K/AKT, são os aparentes moduladores da resistência. Observou-se ainda que a resistência é herdada como um traço poligênico complexo, o que permite inferir que a seleção gênica de reprodutores tornar-se-á uma ferramenta que auxiliará em tornar aves susceptíveis mais resistentes ao tifo aviário.

1.4. Ilhas de Patogenicidade de *Salmonella* (SPI) e infecção sistêmica

Como citado anteriormente, o interior do hospedeiro é um ambiente hostil aos patógenos. A todo o momento, o animal utiliza mecanismos para impedir a colonização bacteriana e, assim, conter o processo infeccioso (Marcus et al., 2000). De modo a evadir essas barreiras, *Salmonella* spp. expressa genes cujas proteínas compõem diversos reguladores de virulência como TlpA, Fur, PhoP/PhoQ, OmpR/EnvZ, entre outros (Foster e Hall, 1990; Ernest et al., 1999; Clements et al., 2001; Lee e Groisman, 2012a; Rodrigues Alves et al., 2018). A cada variação ambiental nociva à bactéria, um ou mais desses reguladores são sensibilizados e, assim, desencadeiam a expressão de diversos genes organizados em forma de *clusters*, denominados Ilhas de Patogenicidade de *Salmonella* (SPI - *Salmonella Pathogenicity Islands*). Dessa forma, o patógeno promove a evasão por meio da modulação do sistema imune do hospedeiro para sobreviver e se multiplicar em seu interior. Dentre as SPIs do gênero, as cinco primeiras (SPI-1 a SPI-5) são as mais investigadas (Marcus et al., 2000; Clements et al., 2001; Rychlik et al., 2009).

Notou-se que genes presentes nas SPI-1 e SPI-4 dos sorovares do paratifo aviário *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Hadar são majoritariamente ativados para a invasão epitelial e, aqueles

presentes nas SPI-2 e SPI-3, são expressos para a sobrevivência intramacrofágica (Imre et al., 2013). Os mecanismos de invasão, seja através de células epiteliais ou da fagocitose pelas células do sistema reticulendotelial, representam o início da infecção sistêmica (Waterman e Holden, 2003; Thompson et al., 2011). Para isso, são estruturados aparatos denominados Sistemas de Secreção do Tipo Três (TTSS – *Type Three Secretion System*). Essas estruturas funcionam como agulhas e secretam proteínas que alteram a estrutura celular do hospedeiro ou até mesmo bloqueiam uma série de mecanismos antimicrobianos produzidos pelo animal. Em *Salmonella* spp., os TTSS mais estudados estão codificados nas SPI-1 (TTSS-1) e SPI-2 (TTSS-2) (Jones et al., 2001; Owen, 2016). Porém, ao contrário das salmonelas paratíficas, foi demonstrado que a expressão do TTSS-1 não é necessária para a patogenicidade de SG (Jones et al., 2001).

Ao adentrar no macrófago, a bactéria é interiorizada individualmente em um fagossomo modificado delimitado por membrana, denominado Vacúolo Contendo *Salmonella* (*Salmonella-containing Vacuole* - SCV) (Waterman e Holden, 2003; Thompson et al., 2011). À partir desse momento, a célula do sistema imune direciona sob o microrganismo uma série de mecanismos antimicrobianos, tais como a explosão oxidativa (*oxidative burst*), por meio da produção de óxido nítrico e formas reativas de oxigênio, além da ação de peptídeos antimicrobianos, queda de pH, redução das concentrações de cátions bivalentes, entre outros (Foster e Hall, 1990; Ernst et al., 1999; Lee e Groisman, 2012a). Por outro lado, além de conseguir evadir a ação antimicrobiana, o patógeno modula seu metabolismo de modo a tolerar ou persistir em meios com baixa concentração de cátions e de pH. Consequentemente, a taxa de multiplicação pode ser reduzida (Lee et al., 2013).

A tarefa de sobreviver à atividade antimicrobiana dos SCVs, se replicar em seu interior e desenvolver a doença (Marcus et al., 2000; Eriksson et al., 2003) dependerá da expressão de sistemas regulatórios. Dentre eles se destaca o sistema regulatório de dois componentes PhoPQ (Figura 2), cuja ativação ocorre pela presença de peptídeos antimicrobianos, pela acidificação e pela redução na concentração de cátions bivalentes, como o magnésio (Mg^{2+}) (Véscovi et al., 1996; Clements et al., 2001; Lee e Groisman, 2012a; Lee e Lee, 2015). Na primeira hora pós-infecção, o pH do SCV encontra-se entre 4 a 5 (Gogoi et al., 2019) e a concentração baixa de Mg^{2+}

desempenha um papel menor na ativação de *phoP* nos momentos iniciais da infecção (Martin-Orozco et al., 2006). Foi demonstrado que esse sistema é essencial para a patogenicidade de SG, visto que sua deleção atenuou a bactéria durante o processo infeccioso em aves comerciais susceptíveis (Rodrigues Alves et al., 2018) e que sua ativação promove a expressão de genes essenciais para a adaptação de *Salmonella* Typhimurium no interior dos macrófagos, tais como o *mgtC* (Blanc-Potard e Groisman, 1997).

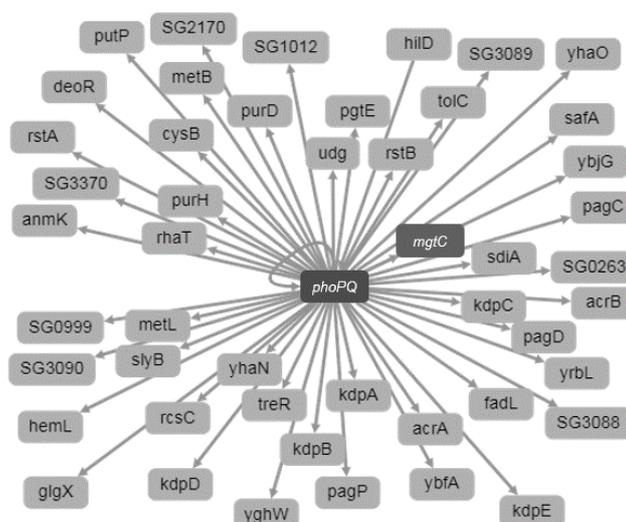


Figura 2. Predição das cascatas regulatórias mediadas pelo sistema de dois componentes PhoPQ em *Salmonella* Gallinarum biovar Gallinarum str. 287/91. O gene *mgtC* encontra-se entre os 48 genes ativados pelo sistema regulatório. Figura adaptada de Métris et al. (2017) disponível no website <<https://salmonet.org/>>.

O ambiente genético em que *mgtC* está inserido é melhor descrito em *Salmonella* Typhimurium e é composto por *mgtM* e *mgtP*, *upstream* ao *mgtC*, além dos genes *downstream* *mgtB*, *mgtR*, *mgtU* e *cigR* (Figura 3). Após a fosforilação de PhoP, essa proteína regulatória ativa a região líder do mRNA *mgtCBRUcigR* contendo duas pequenas Fases de Leitura Aberta (*Open Reading Frames* - ORFs) denominadas *mgtM* e *mgtP*, as quais induzem a formação de estruturas alternativas da região líder que determinará o grau de expressão total da região codificante de *mgtC* (Lee e Groisman, 2012a; Lee e Groisman, 2012b; Choi et al., 2017b; Yeom et al., 2018; Park et al., 2019; Yeom et al., 2020).

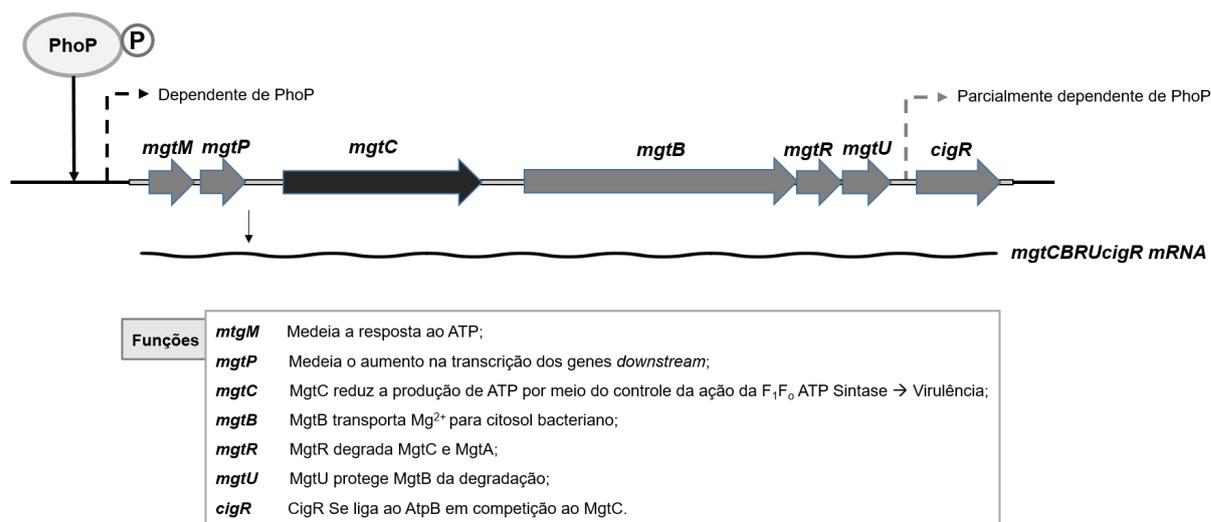


Figura 3. Ambiente genético em que *mgtC* encontra-se inserido em *Salmonella* spp. e as funções de cada gene. Imagem adaptada de Lee e Groisman (2012a), Lee e Groisman (2012b), Choi et al. (2017b), Yeom et al. (2018), Park et al. (2019) e Yeom et al. (2020).

1.5. Gene *mgtC*

1.5.1. Características gerais e funções

O gene *mgtC* é um importante fator de virulência da bactéria. Por ter sido identificado em outros microrganismos, sugere-se que foi transferido horizontalmente para *Salmonella* spp. (Blanc-Potard, Lafay, 2003; Lavigne et al., 2005; Retamal et al., 2009). Interessantemente, apesar das diferenças de *MgtC* e da distância filogenética das famílias Enterobacteriaceae, Mycobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Burkholderiaceae e Brucellaceae, essa proteína ou homólogas à ela demonstraram ser essenciais para a sobrevivência intramacrófagos e patogenicidade de *Salmonella* spp. (Blanc-Potard e Groisman, 1997; Moncrief e Maguire, 1998; Pullinger et al., 2007; Rang et al., 2007; Retamal et al., 2009; Lee e Groisman, 2012a; Silva et al., 2012; Lee et al., 2013; Lee e Lee, 2015; Pontes et al., 2016; Choi et al., 2017a), *Yersinia pestis* (Grabenstein et al., 2006), *Mycobacterium tuberculosis* (Buchmeier et al., 2000), *Pseudomonas aeruginosa* (Belon et al., 2015; Garai et al., 2019; Moussouni et al., 2019), *Burkholderia cenocepacia* (Maloney e Valvano, 2006) e *Brucella suis* (Lavigne et al., 2005). Uma análise de expressão gênica por triagem de seleção negativa baseada em microarranjo durante a infecção de *Salmonella* Enteritidis PT4 str. P125109 em camundongos demonstrou que *MgtC* é importante para a infecção

sistêmica em fígado e baço e que essa proteína possui 100 % de similaridade com aquela produzida por SG str. 287/91 (Silva et al., 2012).

Na estirpe SG str. 287/91, *mgtC* possui tamanho molecular de 696 pb e sua transcrição resulta em uma proteína composta por 231 aminoácidos (Thomson et al., 2008). Vale ressaltar que o mesmo não foi identificado como pseudogene (Thomson et al., 2008; Kuo e Ochman, 2010). Conforme relatado anteriormente em outros sorovares, integra o *operon mgtCBRUcigR* localizado na SPI-3, juntamente com o gene *mgtA* (Véscovi et al., 1996; Lee e Groisman, 2012a; Yeom et al., 2020). Em 1997, essa Ilha de Patogenicidade foi identificada pela primeira vez e, já nesse estudo, observou-se que o sistema regulatório de dois componentes PhoPQ regulava a expressão da proteína hidrofóbica de membrana *MgtC* (Blanc-Potard e Groisman, 1997) de peso molecular de 22,5 kDa (Moncrief e Maguire, 1998).

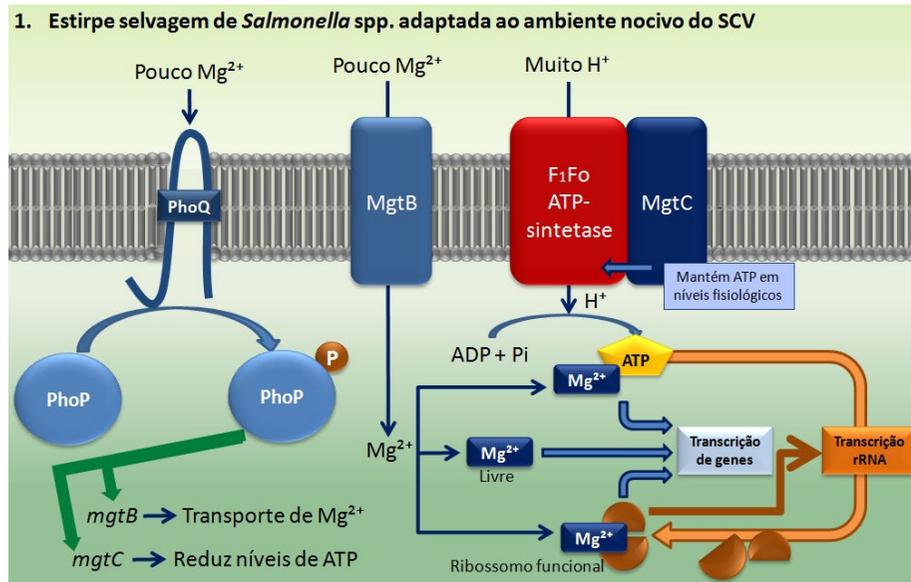
Inicialmente, suspeitava-se que *MgtC* seria o transportador de Mg^{2+} do meio extracelular para o citosol bacteriano (Blanc-Potard e Groisman, 1997). Contudo, foi hipotetizado que sua função seria a de controlar a entrada de íons de H^+ para o citosol da bactéria através do transportador F_1F_0 ATP sintase (Moncrief e Maguire, 1998; Günzel et al., 2006), sendo posteriormente confirmado por Lee et al. (2013). Portanto, os patógenos lidam com a acidificação do SCV de duas formas distintas como alterar o pH do fagossomo ou sofrer as consequências da acidificação e *Salmonella* spp. faz uso da segunda opção (Lee et al., 2013). Além dessa função, mais recentemente identificou-se que *MgtC* também atua no transporte de fosfato para o citosol bacteriano (Choi et al., 2019) e está envolvido na síntese de celulose (Pontes et al., 2015a).

Proteínas de virulência clássicas são comumente toxinas ou efetores que modulam a fisiologia das células do hospedeiro de modo a adaptar o patógeno durante o processo infeccioso (Lee e Lee, 2015). Entretanto, *MgtC* foge desse padrão (Lee et al., 2013). É uma proteína que atua diretamente em uma enzima central do próprio metabolismo energético bacteriano e, ao mesmo tempo, outros mecanismos promovem o *feedback* negativo de acordo com os níveis de transcrição de *mgtC* (Lee et al., 2013; Lee e Lee, 2015).

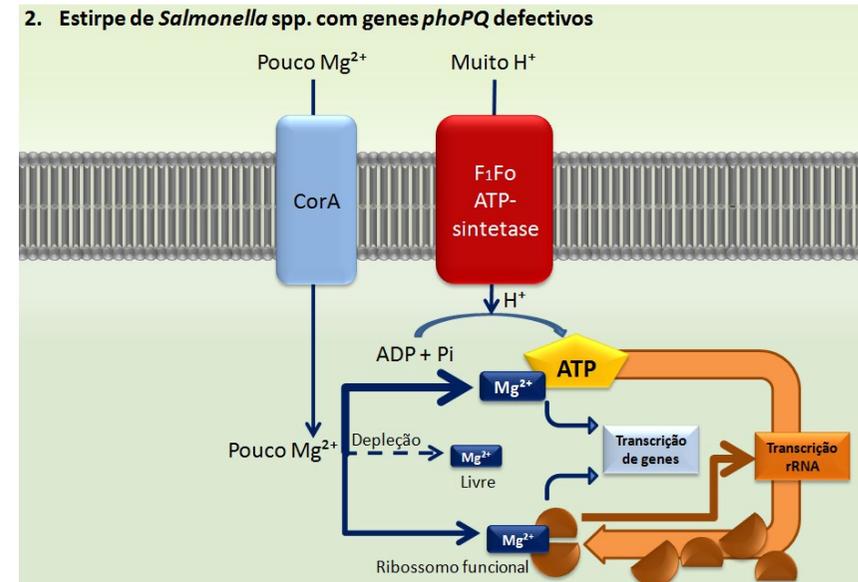
1.5.2. Cascata regulatória envolvendo *mgtC*

Previamente ou imediatamente após a interiorização de *Salmonella* no SCV, o transporte de Mg^{2+} da célula hospedeira para o citoplasma bacteriano é mediado pela proteína CorA. A concentração equilibrada de Mg^{2+} citosólico livre é necessária para a estabilidade de membranas e ribossomos e para as diversas reações enzimáticas (Groisman et al., 2013). Em *Salmonella* Typhimurium, promove a montagem de ribossomos funcionais, havendo altas taxas de transcrição de genes. Entretanto, de forma a eliminar o patógeno, a concentração de Mg^{2+} no interior desse vacúolo é reduzida. Na medida em que a concentração citosólica reduz como resultado de sua utilização e devido ao fato de que há baixa concentração desse cátion fora da bactéria, haverá uma redução no número de ribossomos funcionais e, conseqüentemente, na taxa de transcrição de genes (Pontes et al., 2016). A reduzida concentração de Mg^{2+} sensibiliza PhoPQ que ativar a expressão de MgtB, um transportador mais eficiente do que CorA na captação desse cátion (Groisman et al., 2013).

Concomitantemente, o pH ácido no vacúolo aumenta o gradiente de prótons (H^+) para o citosol do microrganismo através da proteína de membrana interna F_1F_0 ATP sintase. Com isso, a produção de Trifosfato de Adenosina (ATP) eleva-se (Lee e Groisman, 2012a). Devido à alta afinidade entre ATP e Mg^{2+} , a concentração citosólica do primeiro deve ser mantida em níveis fisiológicos de modo a evitar que se ligue ao pouco Mg^{2+} disponível, permitindo que o último promova a montagem de ribossomos funcionais para a transcrição gênica (Pontes et al., 2016). O mecanismo para evitar níveis de ATP citosólico acima do fisiológico é através do bloqueio do translocamento de H^+ pela ligação da proteína *MgtC* à subunidade $F_0\alpha$ da F_1F_0 ATP sintase. Assim, inibe-se a síntese de ATP via subunidade F_1 (Lee et al., 2013) e sua concentração retorna aos níveis fisiológicos (Lee e Lee, 2015), permitindo que a bactéria se adapte, sobreviva e se multiplique nos fagócitos (Retamal et al., 2009; Lee et al., 2014). Ao inativar o gene *phoP* de *Salmonella* Typhimurium, a estirpe é incapaz de reduzir os níveis de ATP por não transcrever o operon *mgtCB* (Pontes et al., 2016). Assim, parte do pouco Mg^{2+} presente no citosol se liga ao ATP e acumula-se subunidades disfuncionais de ribossomos, reduzindo ribossomos funcionais. Portanto, a ação inibitória da produção de ATP por intermédio de *MgtC* é necessária para assegurar a disponibilidade de Mg^{2+} disponíveis (Figura 4).



- Baixa concentração de Mg^{2+} extracelular e intracelular
- Quantidade baixa de ribossomos funcionais
- Níveis baixos de tradução



- Baixa concentração de Mg^{2+} extracelular e intracelular
- Quantidade muito baixa de ribossomos funcionais
- Níveis muito baixos de tradução

Figura 4. Adaptação ao ambiente ácido e com pouco magnésio do SCV de estirpe selvagem de *Salmonella* spp. (1) e de estirpe contendo sistema PhoPQ defectivo em que não há expressão do *operon mgtCB* (2). ADP: adenosina difosfato; ATP: adenosina trifosfato; H^+ : hidrônio; Mg^{2+} : cátion magnésio; Pi: fósforo inorgânico; rRNA: RNA ribossomal; SCV: Vácuolo contendo *Salmonella*. Ilustrado por Rodrigues Alves (2017) com adaptação de Lee e Groisman (2012a), Groisman et al. (2013), Lee et al. (2013) e Pontes et al. (2016).

Uma segunda função de *MgtC* foi recentemente descrita e envolve a regulação do transporte de fosfato para o interior da célula (Choi et al., 2019). Essa proteína se liga a histidina-quinase PhoR que, por sua vez, fosforila PhoB, ativando a transcrição de genes envolvidos com o transporte de fosfato que promovem um aumento na quantidade de células com pouca ou baixa taxa de multiplicação. Nesse estudo, ao substituir um único aminoácido de PhoR para impedir a ligação com *MgtC*, a estirpe tornou-se hipervirulenta e, dessa forma, foi demonstrado que essa interação é necessária para o curso normal da infecção por *Salmonella* Typhimurium (Choi et al., 2019).

Quando *mgtC* é deletado, a sobrevivência *in vitro* da bactéria no macrófago é comprometida (Blanc-Potard e Groisman, 1997; Lee et al., 2013; Choi et al., 2019). Contudo, a taxa de sobrevivência é similar entre as estirpes contendo a deleção simples do gene *atpB*, cuja proteína compõe a subunidade α de F_1F_0 , ou dupla de *atpB* e *mgtC* (Lee et al., 2013). Isso mostra que a patogenicidade resultante da ação de *MgtC* não está além da interação com F_1F_0 ATP sintase (Lee et al., 2013). Além disso, o *knockout* de *atpB* em *Salmonella* Gallinarum atenuou severamente o patógeno (Turner et al., 2003). Dessa forma, a virulência em função desse gene é desencadeada pela interação inibitória com F_1F_0 ATP sintase (Lee et al., 2013; Choi et al., 2019) e se sobrepõe à interação estimulatória realizada com PhoR (Choi et al., 2019).

Tendo em vista que os genes de virulência são expressos em determinados momentos, foi observado que a proteína de membrana interna CigR possui papel anti-virulência fundamental no controle de *MgtC* na etapa inicial intramacrófago. Seu domínio C-terminal compete com AtpB para se ligar ao *MgtC* e, dessa forma, previne a ação inibitória da última em F_1F_0 ATP sintase. Ademais, apesar de pertencer ao mesmo mRNA que *mgtC*, o gene *cigR* possui um promotor constitutivo e independente. Isso permite que seja determinado um limite a ser produzido de *MgtC* de modo a sobrepor CigR para que exerça suas funções metabólicas e de virulência. Além disso, foi demonstrado que a deleção de *cigR* torna STM hipervirulenta (Yeom et al., 2018).

Ainda que a produção de *MgtC* promova a sobrevivência intramacrofágica, seu excesso resultaria na concentração de ATP no interior celular abaixo do fisiológico e,

dessa forma, prejudicaria o metabolismo basal. Para que isso não ocorra, o gene *mgtR* é transcrito e a proteína produzida se liga a *MgtC*, tornando-a alvo da ação da FtsH (Alix e Blanc-Potard, 2008), uma protease AAA+ envolvida na degradação de proteínas de membrana (Ito e Akiyama, 2005). Esse processo funciona como um *feedback* negativo que restringirá a quantidade de *MgtC* quando há pouco H⁺ sendo transportado para o citosol (Alix e Blanc-Potard, 2008; Retamal et al., 2009; Lee e Groisman, 2012a). A deleção de *mgtR* do genoma de STM reduz ligeiramente a sobrevivência no interior do macrófago (Lee e Lee, 2015) e a mortalidade de camundongos (Alix e Blanc-Potard, 2008).

Outro fator anti-virulência que controla *MgtC* é *AmgR* RNA cujo promotor localiza-se na região intergênica entre os genes *mgtC* e *mgtB*. No caso de *amgR*, o mesmo altera os níveis de *MgtC* ao desestabilizar a porção *mgtC* do *mgtCBR* mRNA policistrônico. Quando há deleções simples de *amgR* e *mgtR* em *Salmonella* Typhimurium, observou-se que as estirpes se tornaram hipervirulentas no primeiro caso e, já no segundo, manteve o perfil patogênico quando comparado com a estirpe selvagem (Lee e Groisman, 2010).

Srikumar e colaboradores (2015) realizaram o transcriptoma de *Salmonella* Typhimurium interiorizada em macrófago e constatou-se que o gene mais transcrito da SPI-3 foi o *mgtC*, seguido de *mgtB*. Mesmo o último sendo co-transcrito com *mgtC*, não há alteração da expressão e das propriedades de transporte de *MgtB* na ausência de *MgtC* (Tao et al., 1995). A importância da proteína *MgtC* pode ser validada por meio de cultivo celular conforme conduzido por Retamal et al. (2009). Ao deletar a SPI-3 do genoma de *Salmonella* Typhi foi observado que sua habilidade de sobreviver em monócitos humanos foi prejudicada. Contudo, ao inserir um plasmídeo contendo o gene *mgtC* na estirpe, o fenótipo manifestado pela bactéria selvagem foi restabelecido, demonstrando que *MgtC* é o principal fator de virulência da SPI-3 (Retamal et al., 2009). Em camundongos, foi observada a necessidade desse gene para a patogenicidade de *Salmonella* Typhimurium (Blanc-Potard e Groisman, 1997; Choi et al., 2017a) na infecção tardia (Lawley et al., 2006). Entretanto, a deleção de toda a SPI-3 de *Salmonella* Enteritidis não afetou sua patogenicidade em aves (Rychlik et al., 2009).

Anteriormente, foi observado por índice competitivo que STM $\Delta mgtC$ foi mais afetado em camundongos *Nramp1*⁺ (resistentes à doença) do que em *Nramp1*⁻ (susceptíveis) (Alix et al., 2008). Por outro lado, MgtB não é necessária para a causar infecção letal em camundongos *Nramp1*⁻ e nem para a sobrevivência em células imortalizadas J774.1 (Blanc-Potard e Groisman, 1997; Alix e Blanc-Potard, 2008), mas sua ausência atenua o patógeno durante a infecção em camundongos *Nramp1*⁺ (Choi et al., 2017a; Cunrath e Bumann, 2019). Portanto, sugere-se que *Nramp* reduz Mg²⁺ a níveis mais críticos (Cunrath e Bumann, 2019).

Não há estudos demonstrando a necessidade de genes da SPI-3 para a patogenicidade de SG. Com intuito de explorar esse tema e dar continuidade ao nosso estudo prévio cuja deleção de *phoPQ* atenuou SG (Rodrigues Alves et al., 2018), foi proposta a construção de um mutante de *Salmonella Gallinarum* com o gene *mgtC* defectivo (SG $\Delta mgtC$) e observar os efeitos da deleção sobre a patogenicidade do biovar. Para isso, avaliou-se a capacidade de multiplicação da estirpe selvagem (SG) e mutante em meio de cultivo que mimetiza aquele encontrado pela bactéria no interior de macrófagos com relação ao gene *mgtC*. Além disso, realizou-se a infecção de macrófagos primários derivados de monócitos do sangue periférico de galinhas e de células semelhantes a macrófagos da linhagem HD11. Ademais, foi avaliada a taxa de mortalidade, sinais clínicos, DL50, colonização em órgãos e a resposta imune envolvida no controle da infecção em aves susceptíveis ao tifo aviário desafiadas com as estirpes selvagem e mutante.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar a importância do gene *mgtC* na patogenicidade de *Salmonella* Gallinarum biovar Gallinarum (SG $\Delta mgtC$).

2.2. Específicos

- Construir a estirpe mutante de *Salmonella* Gallinarum biovar Gallinarum com o gene *mgtC* defectivo (SG $\Delta mgtC$) por meio de método molecular;

- Avaliar a multiplicação de SG em meio limitante com o intuito de mimetizar as ações antimicrobianas de acidificação e reduzida concentração de magnésio (Mg^{2+}) presentes no ambiente intramacrofágico envolvidos com o gene *mgtC*;

- Avaliar a exigência de *mgtC* para SG infectar macrófagos;

- Determinar a dose letal 50 % (DL50) de SG $\Delta mgtC$ e de SG bem como o curso de sua infecção sistêmica e pela sua capacidade de causar sinais clínicos e mortalidade em aves susceptíveis;

- Avaliar a resposta imune por meio da mensuração de LITAF e IFN- γ em baço e tonsilas cecais de aves desafiadas com SG $\Delta mgtC$, comparativamente àquelas desafiadas com a estirpe selvagem.

- Caracterizar a população de macrófagos e de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ em tonsilas cecais e fígado de aves infectadas com SG $\Delta mgtC$ em comparação com a estirpe selvagem.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Instalações experimentais

A construção do mutante, os experimentos *in vivo*, além dos estudos da resposta imune por imunohistoquímica e RT-qPCR foram conduzidos nas instalações do Laboratório de Ornitopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/Unesp), Câmpus de Jaboticabal. Já os experimentos *in vitro* de multiplicação em meios limitantes e infecção de células HD11 e de macrófagos derivados de monócitos provenientes do sangue periférico de galinhas foram conduzidos no *Department of Veterinary and Animal Sciences* da *Faculty of Health and Medical Sciences* da *University of Copenhagen (Københavns Universitet - KU)*, Dinamarca.

3.2. Estirpes bacterianas utilizadas

A estirpe *Salmonella Gallinarum* biovar *Gallinarum* str. 287/91 (SG str. 287/91) utilizada no presente estudo foi isolada de um surto de tifo aviário em aves semi-pesadas de postura comercial e submetida à indução gradual *in vitro* para seleção de clones resistentes ao ácido nalidíxico na concentração de 100 µg/mL (Freitas Neto et al., 2013). Seu genoma foi completamente sequenciado e encontra-se catalogado na base de dados *GenBank* da plataforma online *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) sob o número de acesso AM933173.1 (Thomson et al., 2008). A escolha dessa estirpe em particular se deu pela conhecida patogenicidade (Freitas Neto et al., 2013; Batista et al., 2018; Rodrigues Alves et al., 2018) e, dessa forma, foi utilizada como controle positivo da infecção (SG). Além disso, forneceu a base genética para a construção do mutante com o gene *mgtC* defectivo (SG Δ *mgtC*).

Estirpes DH5 α de *Escherichia coli* carreando os plasmídios pKD46, pKD3 e pCP20 foram gentilmente doadas pelo Prof. Paul Andrew Barrow da Universidade de Nottingham – Reino Unido e são rotineiramente utilizadas nos trabalhos que envolvem mutagênese sítio-dirigida desenvolvidos no Laboratório de Ornitopatologia da FCAV (Freitas Neto et al., 2013; Lopes et al., 2016; Batista et al., 2018; Rodrigues Alves et al., 2018; Barbosa et al., 2021).

Todos os microrganismos utilizados no presente estudo estão acondicionados em meio crioprotetor composto de caldo Lisogenia (LB) (BD Difco™, EUA – código

240230) suplementado com glicerol 30 % (Merck, BR – H30402394 228) e armazenados em ultrafreezer –80 °C (Panasonic Healthcare Co., Ltd., Japão – #CVK-UB2I-PW) no Laboratório de Ornitopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/Unesp), Câmpus de Jaboticabal.

3.2.1. Construção da estirpe mutante

3.2.1.1. Informações sobre o gene-alvo e iniciadores utilizados

O genoma de SG str. 287/91 foi obtido na plataforma *online* NCBI (*GenBank* ID: AM933173.1) e visualizado por meio do *software* Artemis v. 15.0.0 para Windows (Carver et al., 2012). À partir da análise, constatou-se que as Sequências Codificantes (*CoDing Sequences* - CDS) da SPI-3 dessa estirpe abrangem o intervalo entre as *loci tags* SG3665 e SG3680 (3853468-3869567) e que a primeira CDS (SG3665) representa o gene *mgtC* (3853468-3854163) (Figura 5). Esse gene é composto por 696 bases nitrogenadas (Thomson et al., 2008) e sua transcrição promove a produção da proteína *MgtC* (NCBI *protein_ID* CAR39449.1; UniProt_ID: B5RG55).

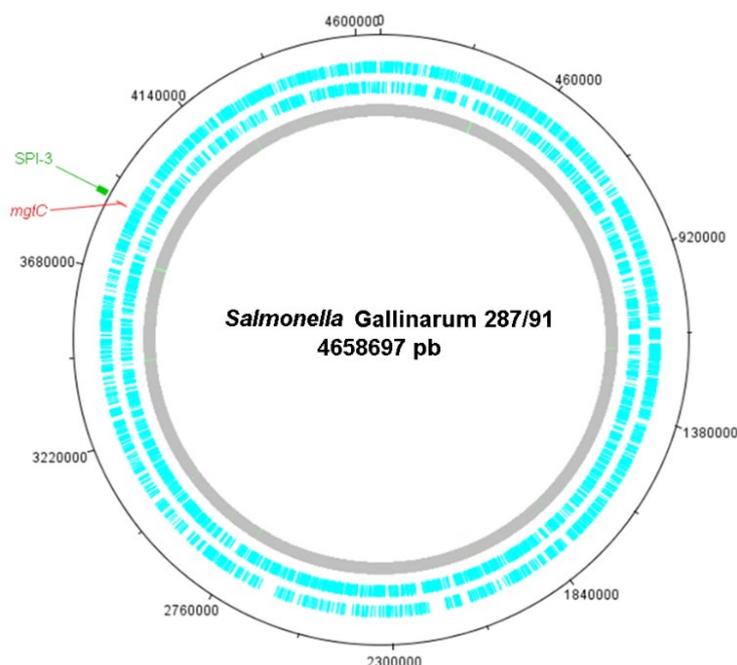


Figura 5. Esquema representativo do genoma de SG str. 287/91 e das regiões em que estão codificados a SPI-3 (verde) e o gene *mgtC* (vermelho). A imagem circular foi desenvolvida utilizando o *software* DNAPlotter (Carver et al., 2009) vinculado ao Artemis v. 15.0.0.

O desenvolvimento da estirpe mutante foi aprovado pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) por meio do Extrato de Parecer Técnico nº 7117/2020 (Diário Oficial da União – Seção 1 – nº 174 de 10 de Setembro de 2020). A construção do mutante foi realizada pela técnica de *Lambda-Red* (Datsenko e Wanner, 2000), cujo processo de mutagênese sítio-dirigida possibilita deletar uma região específica do genoma (gene-alvo) sem afetar as regiões adjacentes. Para isso, foram utilizados quatro pares de iniciadores, sendo um para confirmação da inserção do plasmídeo pKD46, um para mutagênese e dois para confirmação da mutação por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Para a elaboração dos mesmos foram utilizados o software *Artemis Release* v. 15.0.0 para Windows (Carver et al., 2012) e a plataforma online PrimerBLAST (Ye et al., 2012). Posteriormente, os tamanhos dos *amplicons* a serem gerados durante o processo de mutagênese foram preditos por meio do software CLC Sequence Viewer v. 6.4 (CLC Bio A/S, Aarhus, Denmark) para Windows conforme descrito no Apêndice A.

Na primeira etapa do processo de mutagênese foi utilizado um par de iniciadores de 20 nucleotídeos (nt) cada (Tabela 1) para avaliar se houve a inserção do plasmídeo pKD46 na estirpe selvagem. Confirmando-se a inserção, foi demonstrado que a bactéria se tornou competente para a retirada do gene *mgtC* de seu cromossomo.

Tabela 1. Sequência dos iniciadores para confirmação da inserção do plasmídeo pKD46 na estirpe SG str. 287/91.

Iniciador	Sequência (5' → 3')
pKD46_F	aactcgcaaggcagagaaa
pKD46_R	cttcggcctgtgtcagttct

Para o *knockout* do gene *mgtC*, os dois iniciadores de mutagênese (Tabela 2) direto (*mgtC_70F*) e reverso (*mgtC_70R*) eram constituídos por 70 nt cada. Desses, os 50 nt iniciais foram complementares às regiões flangeadoras antecessoras (iniciador direto) e sucessoras (iniciador reverso) do CDS de *mgtC*. Os últimos 20 nt dos iniciadores foram complementares à sequência nucleotídica que codifica a

resistência ao cloranfenicol presente no plasmídio pKD3 e ao Sítio de Reconhecimento pela Flipase (*Flippase Recognition Target* – FRT).

Tabela 2. Sequência dos iniciadores de mutagênese.

Iniciador	Sequência (5' → 3')
<i>mgtC_70F</i>	aattgtcgtgtgctgctaaatatagcacgtactattctccagaaaaa gtgtaggctggagctgcttc
<i>mgtC_70R</i>	cattccctcctatacgctggcgtaatgttgcaattgaataaaaaaactac catatgaatcctccttag

*Os primeiros 50 nt são complementares aos primeiros 50 pb que antecedem (*mgtC_70F*) ou sucedem (*mgtC_70R*) o gene *mgtC*. Já os últimos 20 nt (negrito) referem-se aos 20 pb responsáveis pela amplificação da Sequência Codificante (CDS) do antibiótico e do sítio FRT no plasmídio.

Já os iniciadores de confirmação da mutação possuíam 20 nt cada (Tabela 3). Um dos pares tinha como alvos as sequências nucleotídicas complementares antecessoras (*mgtC_F*) e sucessoras (*mgtC_R*) do gene. Diferentemente dos 50 pb dos iniciadores de mutagênese, a região de anelamento desse par de iniciadores de confirmação não é imediata ao gene-alvo. Também foram utilizados os iniciadores direto (C1) e reverso (C2) que se anelam à sequência interna do CDS do gene que confere resistência ao cloranfenicol, amplificando-o parcialmente.

Tabela 3. Sequência dos iniciadores para confirmação da mutação.

Iniciador	Sequência (5' → 3')	Referência
<i>mgtC_F</i> *	agcaatctcccctgtgacg	Presente estudo
<i>mgtC_R</i> **	tgtctcctccgggctatgaa	
C1	ttatacgaaggcgacaagg	Datsenko e Wanner (2000)
C2	gatcttccgtcacaggtagg	

*Se anela na posição 3853281-3853300 do genoma de SG str. 287/91

**Se anela na posição 3854480-3854499 do genoma de SG str. 287/91

3.2.1.2. Extração do DNA cromossômico de SG str. 287/91

Foram realizadas diversas Reações em Cadeia da Polimerase (*Polimerase Chain Reaction* – PCR) ao longo do processo de mutagênese. Para isso, o material genético das estirpes selvagem e mutante de SG foi extraído conforme metodologia descrita por Marmur (1961), com modificações. A composição do Tampão de Lise (TL) utilizado segue abaixo na Tabela 4.

Tabela 4. Composição do Tampão de Lise (TL) utilizado para extrair o DNA cromossômico das estirpes de SG.

Reagente	Concentração	Fabricante
Tris-HCl (pH 8)	100 mM	Sigma-Aldrich, EUA – código T3253-250G
EDTA (pH 8)	50 mM	Sigma-Aldrich, EUA – código E-5134
NaCl	100 mM	Sigma-Aldrich, EUA – código 59638-500G
SDS	0,5 % (m/v)	Sigma-Aldrich, EUA – código 436143-25G

* O TL foi conservado a 4 °C e, previamente ao seu uso, foi aquecido em microondas até a solução tornar-se cristalina.

No dia anterior ao procedimento de extração, a bactéria foi cultivada em 10 mL de LB a 37 °C por 18 horas sob agitação constante de 150 rotações por minuto (rpm). Após o período de incubação, foi aliquoteado 1 mL da cultura, em duplicata, em microtubos de 2 mL e centrifugados a 9659 x g por 5 minutos (Minicentrífuga MiniSpin®, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha). O sobrenadante de cada tubo foi descartado e os sedimentos ressuspensos em 700 µL de TL após homogeneização em agitador vórtex. Os microtubos foram colocados em termobloco (VHD, BR) previamente aquecido a 65 °C. Em intervalos de 15 minutos, os microtubos eram agitados vagarosamente por inversão. Ao final de 1 hora de incubação, as amostras foram esfriadas em temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente, 350 µL de acetato de potássio (Synth, BR – Código A1012.01.A1, Brasil) (5 M, pH 8) a 4 °C foi adicionado em cada microtubo e o conteúdo foi agitado suavemente até obter-se um precipitado de proteínas em forma de coágulo de aspecto leitoso. Por conseguinte, os microtubos foram imersos em gelo triturado por 30 minutos, sendo homogeneizados somente uma vez durante esse período. Ao final, foram adicionados 700 µL de solução de clorofórmio (Synth, BR – Código C1062.01.B3, Brasil) e álcool isoamílico (Synth, BR – Código A1074.01.B3, Brasil) a 4 °C na proporção de 24:1 e os microtubos foram agitados por inversão por 5 minutos. As amostras foram centrifugadas a 9659 x g por 10 minutos e a mistura ficou dividida em três fases. Dessa forma, foi transferido somente o sobrenadante (primeira fase) para novo microtubo estéril de 2 mL. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de etanol absoluto (Synth, BR – Código 31380, Brasil) a 4 °C e as amostras foram agitadas vagarosamente por inversão por 10 vezes. Ao término, os microtubos foram acondicionados *overnight* (ON) em freezer a -20 °C.

No dia seguinte, as amostras foram colocadas sob temperatura ambiente, invertidas suavemente por cinco vezes e centrifugadas a 9659 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e 1 mL de etanol 70 % (v/v) foi adicionado. Imediatamente, os microtubos foram submetidos às mesmas condições de centrifugação e o sobrenadante foi descartado. Os sedimentos foram secos em termoboloco previamente aquecido a 37 °C por 30 minutos, aproximadamente. As amostras de DNA purificadas foram eluídas em 50 µL de água ultrapura (Sigma-Aldrich, EUA - código W4502-1L) e, posteriormente, acondicionadas *overnight* a 4 °C. Ao término, a qualidade nas relações 260/230 e 260/280 e a quantidade (ng/µL) de DNA cromossomal foram mensuradas por meio de espectrofotometria (DeNovix DS-11 + Spectrophotometer, DeNovix, EUA).

3.2.1.3. Extração e purificação de plasmídios

Os plasmídios purificados e suas funções no processo de mutagênese, além dos antibióticos utilizados nos meios de cultivo, estão descritos na Tabela 5. As estirpes DH5α de *Escherichia coli* contendo cada um dos plasmídios utilizados foram retiradas do ultrafreezer -80 °C e, com auxílio de uma alça bacteriológica estéril, foram semeadas na superfície de ágar de lisogenia (LA) (BD Difco™, EUA – código 240110) contendo o antibiótico apropriado. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica (SOC. FABBE LTDA, BR) por 24 horas a 28 °C. Posteriormente, uma colônia isolada foi tocada por alça bacteriológica estéril e transferida para 20 mL de LB contendo o antibiótico apropriado. As amostras foram realizadas em triplicata e incubadas por 16 horas a 28 °C sob 150 rpm em estufa bacteriológica (Cientec, BR – modelo CT-712).

Tabela 5. Características dos plasmídios utilizados no processo de mutagênese e a suplementação de antibióticos em meios líquidos e sólidos para cultivo de microrganismos contendo o plasmídio de interesse.

Plasmídio	Resistência / Função na mutagênese	Princípio ativo	Antibiótico	
			Concentração	Fabricante
pKD46	Amp^r / Contém genes constituintes do sistema de recombinação λ Red.	Ampicilina	100 µg / mL	EMS
pKD3	Amp^r e Cf^r / Molde para construção do cassete de recombinação	Cloranfenicol	20 µg / mL	Neo-Química
pCP20	Amp^r e Cf^r / Codifica a recombinase FLP	Ampicilina	100 µg / mL	EMS

*Amp^r: Resistente à ampicilina; Cf^r: Resistente ao cloranfenicol

No dia seguinte, 1 mL de cada cultura foi transferida para microtubos estéreis de 2 mL, os quais foram centrifugados por 3 minutos a 11336 x g (Minicentrífuga MiniSpin®, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha). O sobrenadante foi descartado, mais 1 mL da cultura *overnight* foi acrescida e o sedimento ressuspendido com agitador vórtex. O processo foi repetido até que 5 mL da cultura tenham sido transferidos e centrifugados. Após a última centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram submetidas ao processo de extração e purificação plasmidial do *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen, AL – código 27104), seguindo as instruções do fabricante com modificações. A eluição dos plasmídios ao final da purificação foi realizada em 50 µL de água ultrapura (Sigma-Aldrich, EUA – código W4502-1L) ao invés do tampão EB. As amostras foram armazenadas a -20 °C por 24 horas e, posteriormente, a qualidade nas relações 260/230 e 260/280 e a quantidade (ng/µL) de material plasmidial foram mensuradas por meio de espectofotometria (DeNovix DS-11+ Spectrophotometer, DeNovix, EUA).

3.2.1.4. Mutagênese sítio-dirigida pela técnica de *Lambda-Red*

O processo de mutagênese sítio-dirigida pela técnica de *Lambda-Red* desenvolvido por Datsenko e Wanner (2000) é dividido basicamente em três etapas: 1) tornar a bactéria competente para o procedimento, 2) substituição do gene-alvo pelo cassete de resistência e 3) retirada do cassete de resistência do genoma bacteriano.

3.2.1.4.1. Tornando SG str. 287/91 competente: inserção do plasmídio pKD46

3.2.1.4.1.1. Preparo da bactéria receptora

A cultura de SG str. 287/91 foi retirada do ultrafreezer a -80 °C, semeada na superfície de LA com auxílio de uma alça bacteriológica estéril e a placa foi incubada a 37 °C por 24 horas em estufa bacteriológica. No dia seguinte, uma colônia isolada foi selecionada e transferida para 10 mL de LB por meio de uma alça bacteriológica estéril que, por sua vez, foi incubado a 37 °C por 16 horas sob agitação constante de 150 rpm. Após o período de incubação, 500 µL do cultivo foram transferidos para 20 mL de LB estéril em tubo de propileno tipo Falcon de 50 mL. A cultura foi incubada a

37 °C por 5 horas a 150 rpm. Posteriormente, a mesma foi centrifugada a 4000 x g por 10 minutos em centrífuga refrigerada a 4 °C (Ultracentrífuga Sorvall® Legend Mach 1.6R). O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspendido em 30 mL de água ultrapura Tipo I (Milli-Q® Direct 8 Water Purification System, Merck Millipore, França) gelada suplementada com Glicerina 10 % (Glicerina P.A.- A.C.S., Synth, Brasil). O procedimento foi repetido por três vezes e, após a última centrifugação, o sedimento foi ressuspendido em 200 µL de água ultrapura (Sigma-Aldrich, EUA – código W4502-1L). A amostra foi armazenada em gelo até o momento da eletroporação.

3.2.1.4.1.2. Eletroporação do plasmídeo pKD46

A eletroporação foi realizada por meio do equipamento MicroPulser™ (Bio-Rad, EUA). Para isso, 25 µL da suspensão de SG str. 287/91 foram adicionados a 10 µL de uma alíquota do plasmídeo pKD46, homogeneizado e a mistura foi transferida para uma cubeta de 2 mm (Bio-Rad, EUA – código #1652086) previamente resfriada *overnight* a -20 °C. Foi utilizado o programa Ec2 do equipamento, cuja carga elétrica é de 2,5 kV ($E = 12,5 \text{ kV/cm}$). Imediatamente após o pulso elétrico, 1,5 mL de LB estéril foi transferido para a cubeta por meio de uma pipeta de Pasteur e o conteúdo foi homogeneizado. Logo em seguida, a mistura foi transferida para um microtubo de 2 mL e incubada em estufa bacteriológica a 28 °C por 1h30 a 175 rpm. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 11336 x g (Minicentrífuga MiniSpin®, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha) por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 100 µL de LB estéril. Dessa forma, o volume final foi dividido em duas alíquotas, uma de 90 µL e outra de 10 µL. Ambas foram gotejadas individualmente em LA contendo 100 µg/mL de ampicilina (EMS, BR – Ampicilina comprimidos 500 mg) e espalhados com auxílio de alça de Drigalski estéril. Concomitantemente, a suspensão de SG str. 287/91 prévia à eletroporação foi estriada em uma terceira placa contendo o mesmo antibiótico, constituindo o controle negativo da etapa. As placas foram incubadas a 28 °C por 24 horas. Oito colônias foram selecionadas e estriadas em LA contendo 100 µg/mL de ampicilina e incubadas nas mesmas condições anteriores.

3.2.1.4.1.3. Teste de rugosidade

No dia seguinte à eletroporação, os clones estriados em LA foram submetidos ao teste de rugosidade de modo a selecionar somente bactérias lisas, uma vez que não há adesão do bacteriófago à superfície das rugosas na etapa de transdução. Para isso, 30 µL de acriflavina 1:500 (Sigma-Aldrich, EUA – A8126) foram depositados na superfície de uma lâmina para microscopia e, por meio de uma alça bacteriológica estéril, um conjunto de colônias foi transferido e diluído na solução. Paralelamente, os clones também foram testados em 30 µL de solução salina (2 %) do mesmo modo como foi realizado com a acriflavina. Aqueles em que não foi observada a aglutinação em ambas as soluções foram considerados lisos e, assim, estriados por esgotamento em LA sem antibiótico com posterior incubação a 28 °C por 24 horas.

3.2.1.4.1.4. Confirmação da inserção do plasmídio pKD46 por método molecular

A confirmação da inserção do plasmídio pKD46 foi realizada pela técnica de *colony*-PCR e utilizou-se os iniciadores pKD46_F e pKD46_R descritos no item 3.2.1.1. Para isso, uma colônia isolada da placa de LA sem antibiótico foi levemente tocada com uma ponteira estéril de 10 µL para, então, ser transferida para um microtubo contendo os reagentes da reação, conforme descrito na Tabela 6. O programa utilizado no termociclador convencional (MyCycler – Bio-Rad, EUA) segue abaixo na Tabela 7.

Tabela 6. Reagentes utilizados para confirmação da inserção do plasmídio pKD46 em SG str. 287/91.

Reagente	Quantidade	Fabricante
Água Ultrapura (q.s.p.)	15 µL	Sigma-Aldrich
5x FIREPol® Master Mix com 12,5 mM MgCl ₂	4 µL	Solis BioDyne
pKD46_F (100 µM)	0,5 µL	InVitrogen
pKD46_R (100 µM)	0,5 µL	InVitrogen
DNA	Colônia	-
Volume total da reação	20 µL	-

Tabela 7. Condições de ciclagem utilizada no termociclador para confirmar a inserção do plasmídeo pKD46 em SG str. 287/91.

	Aquecimento	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Elongação final	Resfriamento
Temperatura	94°C	94°C	53°C	72°C	72°C	4°C
Período	3 minutos	1 minuto	30 segundos	30 segundos	5 minutos	
Ciclos	1	30			1	∞

Após a reação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (Consort E863, 600 V, 250 mA, cuba Horizon 11-14 CE, Life Technology). Para o preparo do gel, a agarose (Sigma-Aldrich, EUA, A9539) foi diluída sob aquecimento em microondas na proporção de 1,5 % em 30 mL de solução tampão TAE (4,84 g de TRIS base, 1 mL de ácido acético glacial, 2 mL de EDTA 0,5 M e H₂O q.s.p. 1000 mL, pH 8,0) e, após ligeiro resfriamento, foi adicionado 3 µL do intercalante SYBR Safe™ DNA Gel Stain (ThermoFisher Scientific, EUA, S33102). Primeiramente, 5 µL das mesmas foram individualmente homogeneizadas em 1 µL de solução de carregamento (6X DNA Loading Dye Solution, ThermoFisher Scientific, EUA, Código R0611) para então serem adicionadas aos poços. Foi utilizado separadamente 4 µL de marcador de tamanho molecular (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen™, EUA) para determinar o tamanho dos fragmentos. Em seguida, as amostras foram submetidas a uma corrente elétrica de 60 V por 1 hora. Ao término, o gel de agarose foi fotografado sob luz ultravioleta no aparelho Gel Doc™ EZ Imager (Bio-Rad Laboratories, EUA) para visualização do *amplicon*, cujo tamanho molecular aproximado é de 332 pb. As culturas lisas contendo a inserção do plasmídeo pKD46 confirmado por PCR foram armazenadas a -80 °C em meio crioprotetor suplementado com 100 µg/mL de ampicilina conforme descrito no item 3.2.

3.2.1.4.2. Deleção do gene *mgtC* de SG str. 287/91

3.2.1.4.2.1. Amplificação e purificação do fragmento linear de mutagênese

Para a amplificação do fragmento linear que substituiu o gene *mgtC* do cromossomo de SG287/91 foi realizada uma PCR de volume total de 250 µL dividido igualmente em 5 microtubos. As sequências dos iniciadores utilizados estão descritas

no item 3.2.1.1 e os reagentes da PCR estão detalhados na Tabela 8. Já o protocolo utilizado no termociclador está descrito na Tabela 9.

Tabela 8. Reagentes utilizados para amplificação do fragmento linear do cassete de resistência ao cloranfenicol presente no plasmídeo pKD3 com inserção da região adjacente do gene *mgtC*.

Reagente	Quantidade (1x)	Fabricante
Água Ultrapura (q.s.p.)	41 µL	Sigma-Aldrich
AccuTaq LA Buffer (10x) + MgCl ₂ (25 mM)	5 µL	Sigma-Aldrich
dNTP (10 mM)	1 µL	InVitrogen
<i>mgtC</i> _70F (50 µM)	0,5 µL	InVitrogen
<i>mgtC</i> _70R (50 µM)	0,5 µL	InVitrogen
pKD3	1 µL	-
Taq Polimerase (5U/µL)	1 µL	Fermentas
Volume total da reação	50 µL	-

*Ao todo foram utilizados 5 microtubos de 50 µL da reação em cada.

Tabela 9. Condições de ciclagem no termociclador para confirmar a amplificação do fragmento linear do cassete de resistência ao cloranfenicol presente no plasmídeo pKD3 contendo a região adjacente do gene *mgtC*.

	Aquecimento	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Elongação final	Resfriamento
Temperatura	94°C	94°C	65°C	72°C	72°C	4°C
Período	3 min	30 seg	30 seg	120 seg (+ 5seg/ciclo)	7 min	30 min
Ciclos	1	35			1	∞

Após a amplificação do produto, os 50 µL de cada reação foram acondicionados em um único microtubo. A confirmação da amplificação da região-alvo foi realizada em gel de agarose a 1,5 % sob 60 volts por 1 hora. O marcador de tamanho molecular utilizado foi o 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™, EUA). O tamanho molecular esperado do *amplicon* predito *in silico* foi próximo a 1114 Kb.

No mesmo dia foi realizada a precipitação do produto amplificado com o *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen, AL – código 27104) seguindo as instruções do fabricante, conforme citado anteriormente no item 3.2.1.3. Contudo, a amostra final foi eluída em 20 µL de água ultrapura (Sigma-Aldrich, EUA – código W4502-1L). Posteriormente, o produto foi purificado por meio do *Silica Bead DNA Gel Extraction*

Kit (Fermentas, ThermoFisher, USA – K0513), segundo as recomendações do fabricante. A amostra foi ressuspensa em 20 µL de água ultrapura (Sigma-Aldrich, EUA – código W4502-1L) e armazenada a -20 °C até a eletroporação da mesma.

3.2.1.4.2.2. Substituição do gene *mgfC* pelo cassete de resistência ao cloranfenicol

A cultura de SG str. 287/91 contendo o plasmídio pKD46 armazenada em ultrafreezer a -80 °C foi inoculada em 10 mL de LB suplementado com 100 µg/mL de ampicilina que, por sua vez, foi incubado a 28 °C por 16 horas sob agitação constante de 150 rpm. No dia seguinte, 500 µL da cultura foram transferidos para 20 mL de LB estéril contendo 100 µg/mL de ampicilina e 5 mL de L-arabinose 1 M. Em seguida, a amostra foi incubada nas mesmas condições anteriores por 5 horas. Trinta minutos antes do término do período de incubação foram adicionados à amostra mais 5 mL de L-arabinose 1 M. Posteriormente, a mesma foi centrifugada a 4000 x g por 10 minutos em centrífuga refrigerada a 4 °C (Ultracentrífuga Sorvall® Legend Mach 1.6R). O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensa em 30 mL de água ultrapura Tipo I (Milli-Q® Direct 8 Water Purification System, Merck Millipore, França) gelada suplementada com Glicerina 10 % (Glicerina P.A.- A.C.S., Synth, Brasil). O procedimento foi repetido por três vezes e, após a última centrifugação, o sedimento foi ressuspensa em 200 µL de água ultrapura (Sigma-Aldrich, EUA – código W4502-1L). A amostra foi armazenada em gelo até o momento da eletroporação.

A etapa da eletroporação seguiu o descrito no item 3.2.1.4.1.2 utilizando o produto amplificado purificado (item 3.2.1.4.2.1). Entretanto, após a eletroporação foram utilizadas duas placas de LA contendo cloranfenicol na concentração de 20 µg/mL (Neo-Química, BR – Neo Fenicol comprimidos 500 mg). Em uma foram gotejados 10 µL e em outra 90 µL da cultura eletroporada. Em uma placa contendo ampicilina (100 µg/mL) foi estriada a cultura prévia à eletroporação (SG str. 287/91 contendo o plasmídio pKD46) como controle negativo da etapa. Todas foram incubadas a 37 °C por 24 horas.

Oito colônias provenientes das placas de LA contendo cloranfenicol foram selecionadas e estriadas em novas placas contendo o mesmo antibiótico e incubadas nas mesmas condições anteriormente descritas. As colônias foram submetidas ao

teste de rugosidade conforme descrito no item 3.2.1.4.1.3. O material genético bacteriano proveniente das colônias lisas foi extraído seguindo a metodologia detalhada no item 3.2.1.2 para, assim, realizar a confirmação da mutação por PCR.

3.2.1.4.2.3. Confirmação da mutação por Reação em Cadeia da Polimerase

Para a seleção de estirpes mutantes cuja substituição do fragmento linear do cassete de resistência ao cloranfenicol possa ter ocorrido, foi realizada uma PCR utilizando os iniciadores de checagem *mgtC_F* e *mgtC_R* (Tabela 10) conforme detalhados no item 3.2.1.1. O programa amplificação utilizado no termociclador foi composto pela fase de aquecimento em um único ciclo (94 °C/ 3 min); 25 ciclos contendo a desnaturação (94 °C/ 40 segundos), anelamento (55 °C/ 1 minuto) e extensão (72 °C/ 1 minuto); e um único ciclo de extensão final a 72 °C por 7 minutos. Após a reação, 5 µL de cada amostra foram homogeneizados em 1 µL de intercalante 1:500 (GelRed® Nucleic Acid Gel Stain, Biotium, EUA, código - 41003) preparado e em 1 µL de solução de carregamento (6x Gel Loading Dye, Sinapse Inc, Brasil - código M9041). Em seguida, as amostras foram transferidas para os poços presentes no gel de agarose 1,5 % e submetidas a corrente elétrica de 60 volts por 1 hora. O marcador de tamanho molecular utilizado foi o GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder (ThermoFisher Scientific, EUA, código - SM0311).

Tabela 10. Reagentes utilizados para confirmação da substituição do gene *mgtC* pelo cassete de resistência ao cloranfenicol.

Reagente	Quantidade	Fabricante
Água Ultrapura (q.s.p.)	14 µL	Sigma-Aldrich
Taq DNA Polimerase <i>Buffer</i> (10X)	2,5 µL	Fermentas
MgCl ₂ (50 mM)	1 µL	InVitrogen
dNTP (10 mM)	1 mM	InVitrogen
<i>mgtC_F</i> (50 µM)	1 µL	InVitrogen
<i>mgtC_R</i> (50 µM)	1 µL	InVitrogen
DNA	1 µL	-
Taq Polimerase (5U/µL)	0,5 µL	Fermentas
Volume total da reação	25 µL	-

Posteriormente, as possíveis colônias mutantes foram então submetidas à PCR confirmatória final (Tabela 11). Para essa reação, foram utilizados os iniciadores *mgtC_F* e *mgtC_R* (vide item 3.2.1.1) de modo a delimitar uma região flanqueadora de 1219 pb ao gene *mgtC* (696 pb). Além disso, os iniciadores *mgtC_F* e *mgtC_R* foram combinados com os iniciadores internos (C1 e C2) à CDS do cassete de resistência ao cloranfenicol para verificar a presença do genótipo de resistência. Dessa forma, foram realizadas três reações em paralelo com as seguintes combinações dos iniciadores: 1) *mgtC_F* e *mgtC_R*, 2) *mgtC_F* e C1 e 3) *mgtC_R* e C2.

Tabela 11. Reagentes utilizados para a PCR confirmatória da deleção do gene *mgtC* do genoma de SG str. 287/91.

Reagente	Quantidade	Fabricante
Água Ultrapura (q.s.p.)	14 µL	Sigma-Aldrich
5x FIREPol® Master Mix com 12,5 mM MgCl ₂	4 µL	Solis BioDyne
Iniciador 1 (50 µM)*	0,5 µL	InVitrogen
Iniciador 2 (50 µM)*	0,5 µL	InVitrogen
DNA (SG str. 287/91 ou SG Δ <i>mgtC</i> ou Água ultrapura)	1 µL	-
Volume total da reação	20 µL	-

*Combinações dos iniciadores 1 e 2: 1) *mgtC_F* x *mgtC_R*, 2) *mgtC_F* x C1, e 3) *mgtC_R* x C2.

A eletroforese seguiu os parâmetros e reagentes descritos acima com exceção do marcador de tamanho molecular utilizado (100 bp Ladder Plus, Ready-to-use, Sinapse Inc, Brasil, código – M1071). Os tamanhos moleculares dos *amplicons* gerados foram preditos conforme descrito no Apêndice A e estão detalhados na Tabela 12. Após confirmação da presença do cassete de resistência, a bactéria foi armazenada em freezer –80 °C até o seu uso.

Tabela 12. Combinação dos iniciadores utilizados na PCR de verificação e o tamanho molecular em pares de base (pb) dos fragmentos preditos *in silico*.

Combinação de iniciadores	SG str. 287/91	SG Δ <i>mgtC</i> com a CDS do antibiótico	SG Δ <i>mgtC</i> sem a CDS do antibiótico
<i>mgtC_F</i> + <i>mgtC_R</i>	1219 pb	1523 pb	523 pb
<i>mgtC_F</i> + C1	-	297 pb	-
<i>mgtC_R</i> + C2	-	489 pb	-

3.2.1.4.2.4. Transdução da estirpe mutante

A fim de evitar a recombinação do fragmento de DNA em outras regiões do cromossomo bacteriano além da região-alvo, foi realizada a técnica de transdução por meio do bacteriófago ØP22 (Wing, 1968; Sambrook e Russel, 2001). O processo de transdução é mais eficiente quando se utiliza mais de 10^9 Unidades Formadoras de Placas por mililitro (UFP/mL) do bacteriófago ØP22. Dessa forma, a primeira etapa envolve a contagem desse vírus em SG selvagem. Para isso, uma colônia de SG previamente cultivada (Dia 0) em LA a 37 °C por 24 horas foi inoculada em 10 mL de LB e incubada a 37 °C por 24 horas sob agitação de 150 rpm (Dia 1). Na manhã seguinte (Dia 2), 100 µL da cultura *overnight* foram transferidos para frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 10 mL de LB estéril. A amostra foi incubada a 37 °C por 8 horas sob agitação constante de 150 rpm. Após esse período, 1 mL de solução de bacteriófago ØP22 armazenado a 4 °C foi transferido para a cultura de SG e incubada nas mesmas condições anteriores pelo período de 18 horas. A cultura *overnight* (Dia 3) foi centrifugada a 4000 x g por 20 minutos a 4 °C (Ultracentrífuga Sorvall® Legend Mach 1.6R) e o sobrenadante filtrado através de um filtro de 0,45 µm (Chormafil® PES, Macherey-Nagel, AL – código 729241) acoplado em seringa de 10 mL (Becton, Dickinson e Companhia, BR). Paralelamente, 100 µL da cultura bacteriana do dia 1 foram homogeneizados em 900 µL de PBS e posteriormente, espalhados sob a superfície de todo o ágar LA por meio de alça de Drigalski estéril, esperando-se sua completa secagem. Logo em seguida, foram realizadas diluições seriadas decimais do bacteriófago em PBS até 10^{-8} e 50 µL de cada foram gotejados sob a camada de SG presente na superfície do ágar LA. A placa foi incubada a 37 °C por 8 horas. Ao término, pontos de lise na superfície do ágar foram contados e, dessa forma, foi estimado o número de UFP/mL do bacteriófago.

Ainda no Dia 3, uma colônia da estirpe mutante (doadora) previamente cultivada em LA a 37 °C por 24 horas foi inoculada em 10 mL de LB e incubada a 37 °C por 18 horas sob agitação de 150 rpm. No dia seguinte (Dia 4), foi realizada a diluição seriada decimal da cultura e 100 µL de cada foi depositada na superfície de LA. A placa foi incubada a 37 °C por 24 horas para proceder à contagem de UFC/mL da estirpe doadora. Paralelamente, 100 µL da bactéria doadora cultivada em LB, previamente estocada a 4 °C, foram transferidos para 10 mL de LB estéril em frasco

Erlenmeyer de 250 mL. O cultivo da estirpe foi a 37 °C por 18 horas sob agitação de 150 rpm. Na manhã do Dia 5, foi realizada a contagem de UFC/mL em LA e a cultura em LB foi retirada da estufa e acondicionada a 4 °C até o final do dia, momento em que foi adicionado 0,03 ØP22 por UFC de bactérias (ØP22/UFC). Concomitantemente, uma colônia da estirpe selvagem (receptora) cultivada em LA foi inoculada em 10 mL de LB nas mesmas condições que a estirpe doadora. Os cultivos foram incubados a 37 °C por 18 horas em agitação de 150 rpm.

No dia seguinte (Dia 6), a cultura contendo o fago e a doadora foi centrifugado a 4000 x g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado através de um filtro de 0,45 µm acoplado em uma seringa de 10 mL e a solução final contendo os bacteriófagos foi acondicionado a 4 °C. Foram realizadas as contagens do vírus em placas contendo LA com cultura de SG str. 287/91 espalhada em sua superfície conforme descrito anteriormente no Dia 3 e da cultura *overnight* da receptora em LA seguindo a metodologia descrita no Dia 4. Na manhã do Dia 7 foram obtidos os valores de UFC/mL da receptora e UFP/mL do bacteriófago. Com isso, a cultura de SG str. 287/91 foi concentrada em 10 vezes por meio de centrifugação a 4000 x g por 20 minutos a 4 °C e o ressuspensão do precipitado em 1 mL de LB. Foi adicionado o bacteriófago anteriormente recuperado à cultura na proporção de 0,8 ØP22 para 1 da receptora e, em seguida, o microtubo foi incubado estaticamente a 37 °C por 30 minutos. Após o período de incubação, o cultivo foi espalhado com auxílio de alça de Drigalski nas quantidades de 100 µL, 200 µL e 700 µL em três placas contendo LA suplementado com cloranfenicol na concentração de 20 µg/mL. Posteriormente, foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas.

No Dia 8, oito colônias sugestivas foram selecionadas e semeadas por meio de alça bacteriológica estéril em placas contendo LA com cloranfenicol (20 µg/mL) e incubadas nas mesmas condições anteriormente descritas. Os clones obtidos nessas placas foram sucessivamente semeados após incubação por cinco dias até que a infecção pelo bacteriófago fosse eliminada. A presença ou ausência do vírus eram confirmadas em colônias cujas bordas estavam irregulares ou quando as mesmas readquiriam sua morfologia arredondada, respectivamente. A rugosidade dos clones puros sugestivos seguiu a metodologia descrita no item 3.2.1.4.1.3. Posteriormente, os DNA bacterianos das colônias lisas foram extraídos (item 3.2.1.2) para realizar as

PCRs confirmatórias cujos reagentes estão detalhados nas Tabelas 10 e 11. A eletroforese foi realizada conforme descrita no item 3.2.1.4.1.4. Após confirmação, uma colônia foi selecionada e semeada em LA sem antibiótico. A placa foi incubada a 37 °C por 24 horas e todas as colônias bacterianas emergentes foram transferidas para meio crioprotetor (item 3.2) e posteriormente estocado em freezer a –80 °C.

3.2.1.4.2.5. Eliminação do marcador de resistência ao antimicrobiano

Para retirar o cassete de resistência ao cloranfenicol inserido no genoma de SG str. 287/91 em substituição ao gene *mgtC*, foi utilizado o plasmídeo termossensível pCP20. Para isso, a estirpe armazenada após a transdução foi cultivada em 10 mL de LB a 37 °C por 18 horas sob agitação constante de 150 rpm. Posteriormente, procedeu-se à introdução do plasmídeo pCP20 na bactéria por meio de eletroporação conforme descrita no item 3.2.1.4.1.2 e confirmação do fenótipo lisa da bactéria por meio do teste de rugosidade (item 3.2.1.4.1.3). Os clones sugestivos lisos foram inoculados em 10 mL de LB e incubados a 40 °C a 175 rpm. Pelo início da manhã e ao término da tarde, 100 µL da cultura eram transferidos para 10 mL de LB estéril. Após a última transferência do dia, cada cultura foi semeada em três diferentes placas: LA puro, LA suplementado com ampicilina (100 µg/mL) e LA com cloranfenicol (20 µg/mL). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Esses processos de cultivo em caldo e em ágar nutriente foram realizados repetidamente ao longo de sete dias. No momento em que houve crescimento de colônias somente na superfície do LA puro, suspeitou-se da retirada do plasmídeo pCP20 e do marcador de resistência devido à ausência de colônias no ágar suplementado com ampicilina e cloranfenicol, respectivamente.

Uma colônia isolada em LA puro foi transferida para 10 mL de LB estéril e incubada a 40 °C por 24 horas a 150 rpm. Posteriormente, a cultura foi semeada em LA sem a adição de antibióticos e incubada a 37 °C por 24 horas. O mutante final foi verificado quanto à rugosidade (item 3.2.1.4.1.3) e confirmado por PCR (item 3.2.1.4.2.3). Dessa forma, foi obtida a estirpe de SG str. 287/91 contendo a deleção do gene *mgtC* (SG Δ *mgtC*). Os clones positivos foram armazenados em meio crioprotetor (item 3.2) a –80 °C até o momento de seu uso. A estirpe foi cadastrada

junto ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SisGen) sob o nº A835C00.

3.3. Experimentos *in vitro*

3.3.1. Multiplicação bacteriana em meios limitantes

Para elucidar o papel de *mgtC* em *Salmonella Gallinarum* em resposta ao ambiente intramacrófago mimetizado pela privação do magnésio e ao baixo pH, as estirpes SG e SG $\Delta mgtC$ foram inoculadas em meio mínimo essencial M9 suplementado com 10 mM $MgSO_4$ em pH 7.0 (M9-7) ou com 10 μM $MgSO_4$ em pH 5.0 (M9-5) conforme Moncrief e Maguire (1998) e Retamal et al. (2009). Triptona foi adicionada devido ao perfil auxotrófico de SG (Batista et al., 2018). Primeiramente, foram preparados 200 mL de solução-estoque de caldo M9 quintuplicamente concentrado (5x) e diluído conforme necessidade de uso (Tabela 13). Ademais, ambas estirpes foram multiplicadas em LB com pH 7 (LB-7) ou pH 5 (LB-5).

Tabela 13. Reagentes utilizados para preparar o meio mínimo essencial M9 com diferentes concentrações de Mg^{2+} e níveis de pH.

	Reagentes	Concentração	Código (Fabricante)
Mix M9 Autoclavado	Na₂HPO₄	42 mM	S5136-500G (Sigma-Aldrich)
	KH₂PO₄	22 mM	7778-77-0 (Merck)
	NaCl	8,5 mM	S9625-1KG (Sigma-Aldrich)
	NH₄Cl	18,6 mM	09718-250G (Sigma-Aldrich)
Outros reagentes Filtrados com 0,22 μm	CaCl₂.2H₂O	0,1 mM	1.02382.0500 (Merck)
	MgSO₄	10 mM ou 10 μM	M7506-1kg (Merck)
	Triptona	0,5 %	LP0042 (Oxoid)
	Glicose 20 %	0,2 %	G8270 (Sigma-Aldrich)

Ambos os caldos M9 suplementados com 10 mM ou 10 μM de Mg^{2+} tiveram seus pHs ajustados para 7 e 5, respectivamente. Paralelamente, os pHs de duas alíquotas de LB foram ajustados para os mesmos níveis dos caldos M9. A acidificação do meio foi realizada com ácido cítrico 1M com monitoramento em pHmetro (691 pH Meter, Metrohm Ltd., Switzerland). Por conseguinte, todos os caldos nutrientes foram

esterilizados através de filtros 0,22 μm para então serem conduzidos os ensaios experimentais.

Colônias isoladas de SG e SG ΔmgtC em placas LA incubadas previamente a 37 °C por 20 horas foram inoculadas em 10 mL de caldo M9-7 e LB-7 e mantidas a 37 °C por 16 horas sob agitação constante de 180 rpm. No dia seguinte, uma alíquota de 0,5 mL de cada cultura ON em LB-7 foi transferida para 9,5 mL de caldo fresco e novamente cultivadas nas mesmas condições previamente descritas por aproximadamente 4 horas. Devido às condições limitantes do caldo M9, a bactéria multiplica-se mais lentamente. Assim, as culturas ON em caldo M9 foram utilizadas no experimento. A Densidade Óptica a 600 nm (DO_{600}) das culturas bacterianas foi monitorada em espectrofotômetro (Eppendorf™ BioPhotometer™, Modelo #6131, Alemanha) até que atingissem valores entre 0,6 e 0,8. Alíquotas de 2 mL de cada cultura foram centrifugadas a 4000 x g por 3 minutos (Centrifuge 5810R®, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha) e triplamente lavadas com NaCl 0,9 %. A última resuspensão foi realizada em M9 (10 mM/pH 7 ou 10 μM /pH 5) ou em LB (pH 7 ou pH 5) e a DO_{600} das culturas foram ajustadas para 0,05 em caldos frescos. Por último, 200 μL das amostras testes e de amostras não-inoculadas (controles negativos) foram transferidos em triplicadas para microplacas (HoneyComb® Microplates, Fisher Scientific, USA). As estirpes foram cultivadas a 37 °C por 20 horas no espectrofotômetro Bioscreen C reader (Oy Growth Curves Ab Ltd, Finland) e a OD_{600} foi mensurada a cada hora. Os experimentos foram conduzidos em três replicatas biológicas independentes.

3.3.2. Curva de multiplicação bacteriana

De modo a determinar o tempo de multiplicação das estirpes selvagem (SG) e mutante (SG ΔmgtC) para o Experimento *in vivo* da Dose Letal 50 % (DL50) foi realizada a curva de multiplicação bacteriana. Para isso, uma colônia de cada estirpe previamente cultivada em LA foi transferida para 10 mL de LB com auxílio de uma alça bacteriológica estéril e incubadas a 37 °C por 18 horas. Posteriormente, 20 μL das culturas *overnight* foram diluídos decimalmente em 180 μL de PBS (v/v) para proceder-se à contagem seriada em LA até na diluição 10^{-7} . Paralelamente, 150 μL dessas culturas foram transferidos para 15 mL de LB estéril em tubo Falcon de 50 mL

que, por sua vez, foram incubados a 37 °C sob agitação constante de 150 rpm. Imediatamente (0h), foi realizada a contagem seriada das culturas conforme descrita anteriormente. O procedimento foi repetido com 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 horas pós-transferência. Os valores das contagens foram transformados em Log₁₀ para gerar o gráfico da curva de multiplicação bacteriana por meio do *software* GraphPad Prism versão 6.02 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California, USA).

3.3.3. Infecção de macrófagos

A avaliação da necessidade do gene *mgtC* para SG infectar macrófagos foi conduzida em duas linhagens distintas de células denominadas de HD11 e macrófagos primários derivados de monócitos do sangue periférico de aves (*peripheral blood mononuclear cells* – PBMC). Os experimentos foram conduzidos conforme Huang et al. (2017) e Huang et al. (2019) com modificações.

Um fluxo de trabalho foi estritamente seguido para evitar a contaminação dos cultivos celulares. Como via de regra, todo material a ser introduzido na cabine de fluxo laminar era previamente sanitizado com Etanol 70 % (Modelo 1,8, Holten LaminAir, Holm and Halby, Dinamarca) e as células eram mantidas durante o cultivo em incubadora a 37 °C sob atmosfera controlada de CO₂ a 5 % (CO₂ Water Jacketed Incubator, Forma Scientific, EUA). Antes do início dos experimentos, a atividade do sistema complemento dos soros foi termicamente inativada em banho-maria (Thermo Haake® W46, Thermo Scientific, EUA) a 56 °C por 45 minutos (Gondwe et al., 2010). Ademais, todos os meios de cultivo utilizados foram pré-aquecidos nesse mesmo equipamento a 37 °C por 20 minutos previamente à manipulação das células. Por último, uma placa de cultivo celular foi utilizada para cada tempo de colheita.

3.3.3.1. Obtenção e manutenção das culturas de células

3.3.3.1.1. Células semelhantes aos macrófagos de galinhas da linhagem HD11

As células semelhantes aos macrófagos de galinhas da linhagem HD11 (*Chicken macrophage-like cell line* HD11) são derivadas da medula óssea e foram transformadas pelo vírus da leucose aviária MC29 (Beug et al., 1979). As amostras de células foram recuperadas de tanques de nitrogênio armazenados no *Department*

of Veterinary and Animal Sciences da Faculty of Health and Medical Sciences da University of Copenhagen (Københavns Universitet - KU), Dinamarca. Após descongeladas, foram transferidas para 40 mL de meio Roswell Park Memorial Institute 1640 com GlutaMAX™ (RPMI Medium 1640 (1x) + GlutaMAX™-1, Gibco™, Catálogo nº 61870036, ThermoFisher Scientific, EUA) suplementado com 5 % de Soro de Galinha inativado (*Chicken Serum* – CS – Sterile filtered, Catálogo nº C5405-500ML, Sigma-Aldrich, EUA), 5% de Soro Fetal Bovino (*Fetal Bovine Serum* – FBS – EU Origin, Catálogo nº S1400-100, Biowest, França) e 25 µg/mL de gentamicina (*Gentamicin* 50 mg/mL, Gibco™, Catálogo nº 15750-037, ThermoFisher Scientific, EUA). Daqui em diante, esse meio suplementado será denominado como RPMI-25. Vale ressaltar que todos os meios RPMI foram suplementados com 5 % de CS e 5 % de FBS, variando somente na presença e concentração de gentamicina.

Em seguida, a suspensão celular foi igualmente dividida em dois frascos para cultivo celular com filtro de 75 cm² (TPP® tissue culture flask – Code 90076, Switzerland) e mantida a 37 °C em incubadora com CO₂ a 5 %. A morfologia e a multiplicação celular foram diariamente avaliadas utilizando um microscópio binocular de contraste de fase (Hund Wetzlar Wilovert S Microscope, Helmut Hund GmbH, Alemanha) (Figura 6). O meio de cultivo foi substituído a cada dois ou três dias. Para isso, RPMI-25 foi removido e as células foram lavadas com 20 mL de Tampão Salina Fosfato fórmula Dulbecco (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* - DPBS (1x), Gibco™, Catálogo nº 14190-094, ThermoFisher Scientific, EUA). Em seguida, 20 mL de RPMI-25 estéril foi adicionado aos frascos que, por sua vez, foram novamente incubados.



Figura 6. Imagem aproximada destacando (círculo) uma célula da linhagem HD11 com morfologia semelhante ao macrófago (Objetiva 10x).

Ao atingirem uma confluência aproximada de 80 % (porcentagem da monocamada aderente de células cobrindo o fundo do frasco), as células foram duplamente lavadas com 20 mL de DPBS e, na última ressuspensão, as células foram destacadas do frasco com o auxílio de um raspador estéril de células. Por conseguinte, a suspensão celular foi transferida para um tubo Falcon de 50 mL e centrifugado (Z 300 K Universal Centrifuge with cooling system, Hermle Labortechnik, Alemanha) a 5000 x g por 8 minutos. O sobrenadante foi descartado e 3 mL de RPMI-25 foi adicionado. As células foram cuidadosamente resuspensas com uma pipeta e RPMI-25 foi adicionado até completar o volume final de 40 mL, o qual foi dividido igualmente em dois novos frascos de cultivo celular.

Enquanto o primeiro frasco foi utilizado para dar continuidade ao experimento (item 3.3.3.2), o segundo foi para cultivar as células a serem armazenadas no tanque de nitrogênio. Nesse último caso, após descartar o sobrenadante posteriormente à última centrifugação, como descrito anteriormente, o meio foi cuidadosamente retirado por meio de uma pipeta e 1 mL de meio de congelamento de células foi adicionado para resuspendê-las. A suspensão celular foi transferida para criotubo de 2 mL e armazenado a – 80 °C por 24 horas no interior de uma caixa de isopor térmica previamente seu armazenamento no interior do tanque de nitrogênio.

3.3.3.1.2. Macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico de aves

Os cultivos dos macrófagos primários derivados de monócitos do sangue periférico de aves foram realizados conforme Wigley et al. (2002), Menck et al. (2014) e Huang et al. (2019). Para isso, foram adquiridas 15 aves de linhagem semi-pesada de 12 a 18 semanas de vida e livres de *Salmonella* spp. Foram puncionados de 20 a 25 mL de sangue periférico da veia braquial de cada animal e depositados em tubos heparinizados (heparina de lítio) que, por sua vez, foram imediatamente armazenados em gelo triturado e transportados para o laboratório para processamento.

Posteriormente, 20 mL de sangue foram transferidos para um tubo Falcon de 50 mL contendo DPBS na proporção 1:1 (v/v). Em seguida, 20 mL da mistura foram transferidos cuidadosamente para a superfície de 20 mL de Ficoll-Paque 1.084 (Ficoll-Paque™ Premium 1.084, Código - 17544602, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suécia) em um novo tubo Falcon, evitando-se a mistura de ambas as fases (Figura

6). As amostras foram centrifugadas a 1200 x g por 40 minutos (Aceleração = 1, Desaceleração = 0, centrífuga horizontal) a 25 °C e, assim, foi formada uma interface de células mononucleares com partículas de sedimentos entre o plasma e a camada de Ficoll-Paque. Em seguida, a camada superior, representada pelo plasma, foi gentilmente retirada com uma pipeta para facilitar o acesso à interface de células mononucleares que, por sua vez, foram transferidas para um novo tubo Falcon. Assim, foram realizados *pools* de até 20 mL de células mononucleares os quais foram novamente centrifugados com Ficoll-Paque como realizado anteriormente para reduzir a contaminação por células vermelhas do sangue. Uma nova interface de células mononucleares foi formada e subsequentemente transferida com uma pipeta para um novo tubo Falcon de modo a formar um novo *pool*. As amostras foram triplamente lavadas com igual volume de DPBS (1:1) a 5000 x g por 8 minutos (Figura 7). Após a última centrifugação, o *pellet* foi gentilmente ressuscitado em 10 mL de RPMI-25.

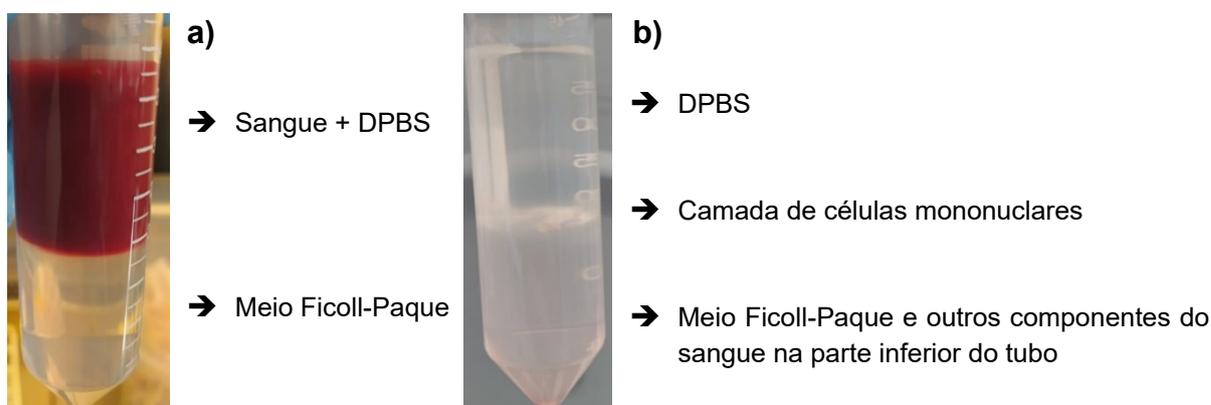


Figura 7. Segregação de células mononucleares do sangue de galinhas: (a) sangue depositado na superfície de Ficoll-Paque na proporção 1:1 (v/v) formando duas interfaces previamente à centrifugação e (b) camada de células mononucleares com reduzida contaminação por células vermelhas do sangue após a segunda centrifugação utilizando-se meio Ficoll-Paque.

Em seguida, 2 μ L de Azul de Tripán 0,4 % (Catálogo 15250-061, Gibco™, ThermoFisher Scientific, EUA) foram homogeneizados em 18 μ L do cultivo celular aliqotado em uma lâmina histológica, dos quais 10 μ L da mistura foram transferidos para uma câmara hemocitométrica coberta com uma lamínula (Figura 8). Através de do microscópio binocular de contraste, a quantificação de células foi realizada nos

dois quadrados grandes em diagonal e a densidade foi calculada conforme a fórmula abaixo. Assim, foi possível ajustar a concentração para 5×10^7 células por mL (cél/s/mL) considerando que o número de células viáveis até o momento da infecção reduziria para 5×10^6 células/mL.

$$\text{Células por mL} = \text{Média do número de células entre ambos quadrados} \times 10000$$

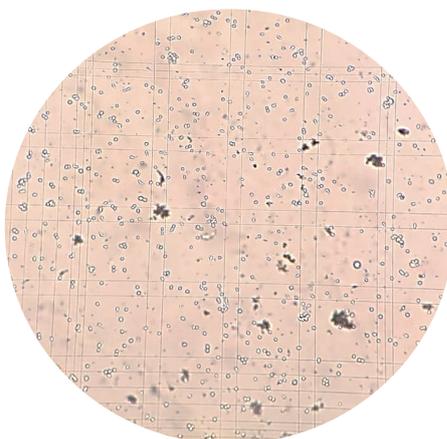


Figura 8. Contagem de células mononucleares viáveis (bordas azuladas e incolores internamente) em câmara hemocitométrica (objetiva de 10x).

Ajustada a concentração das células, 1 mL da suspensão foi transferida para cada poço a ser utilizado da placa de cultivo celular de poliestireno de 24 poços de fundo chato (TPP® Tissue Culture Plates, Código Z707791, Merck, Alemanha) e incubadas a 37 °C sob CO₂ 5 %. No dia seguinte, as placas foram mantidas no interior da incubadora de modo que as células pudessem se aderir ao fundo das mesmas (Figura 9a). No segundo dia, o meio foi cuidadosamente retirado com auxílio de uma pipeta, as células foram triplamente lavadas com 1 mL de DPBS e, em seguida, 1 mL de RPMI-25 foi adicionado (Figura 9b). A morfologia dos macrófagos era avaliada no terceiro dia e, caso não correspondessem ao esperado, o meio era repostado por 1 mL de meio RPMI-25 fresco. As placas eram novamente incubadas até obter a morfologia adequada (Figura 9c).

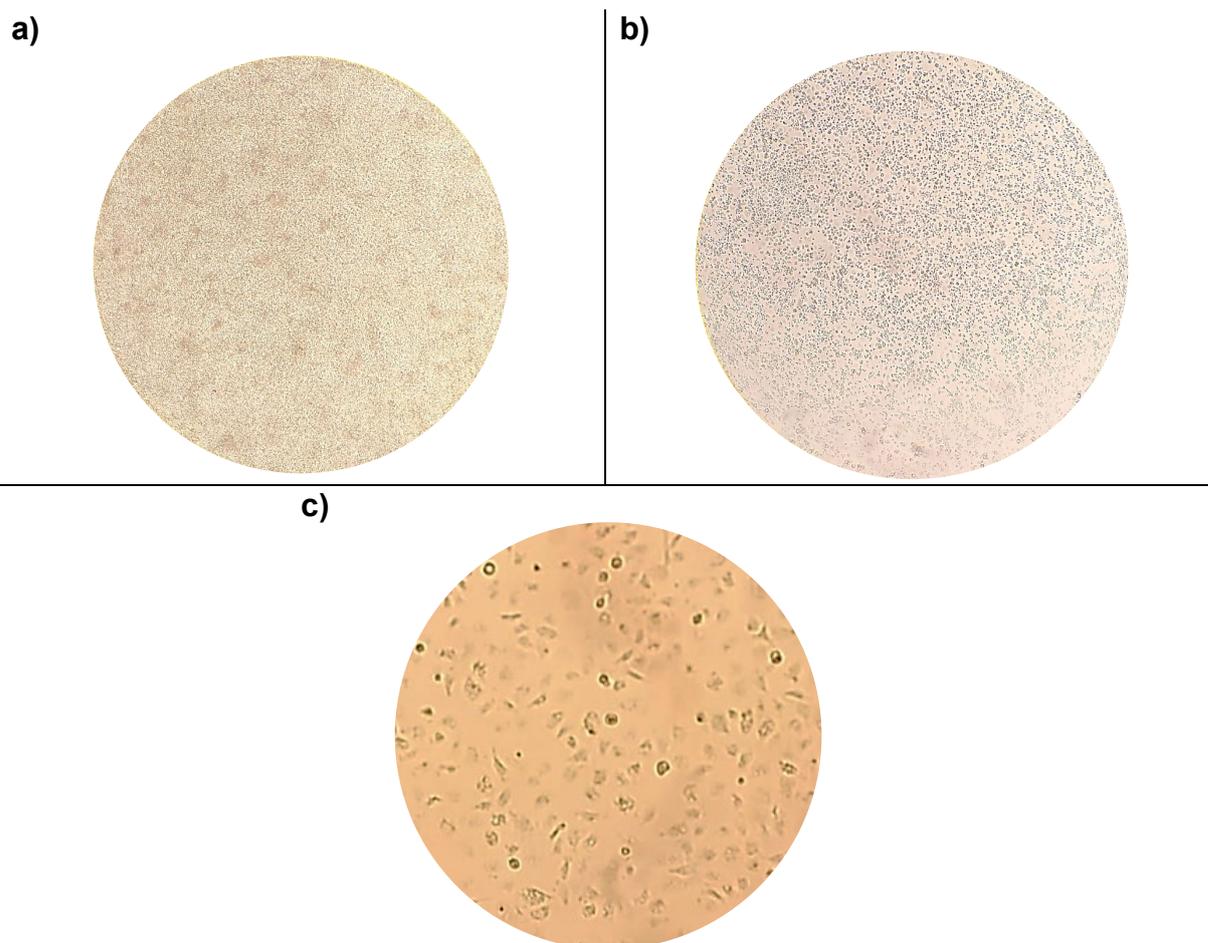


Figura 9. Cultivo de macrófagos primários derivados de monócitos do sangue periférico de galinhas (objetiva 10x). (a) As células isoladas foram depositadas no fundo do poço de placa de cultivo celular de 24 poços e (b) o meio foi repostado no segundo dia. (c) Observar a morfologia celular alongada em imagem aproximada no terceiro dia de cultivo.

3.3.3.2. Preparo para a infecção em macrófagos

As células HD11 utilizadas nos ensaios de infecção estavam entre os subcultivos cinco a 10. No dia anterior à infecção, os frascos contendo as células foram triplamente lavados com 20 mL de DPBS para retirada de restos celulares e outros componentes presentes no meio. Na última lavagem, as células foram destacadas do fundo do frasco com auxílio de um raspador estéril. A suspensão foi transferida para um tubo Falcon de 50 mL e centrifugada a 5000 x g por 8 minutos. O sobrenadante foi descartado e 3 mL de RPMI sem gentamicina foi adicionado para ressuspender as células. Em seguida, mais meio foi adicionado até completar 10 mL e a contagem celular foi realizada conforme descrita anteriormente (item 3.3.3.1.2). A

concentração foi ajustada para 5×10^5 céls/mL e 1 mL dessa suspensão foi adicionada em cada poço das placas de cultivo a serem utilizados. As células foram incubadas novamente. De forma semelhante, os poços contendo macrófagos primários derivados de monócitos do sangue periférico de galinhas foram triplamente lavados com 1 mL de DPBS e, em seguida, 1 mL de RPMI sem gentamicina foi adicionado. As placas foram novamente incubadas até o dia seguinte.

Três dias previamente à infecção, SG $\Delta mgtC$ e SG foram recuperadas do ultrafreezer – 80 °C e transferidas para 10 mL de LB estéril com auxílio de uma alça descartável. As bactérias foram incubadas a 37 °C sob agitação constante de 180 rpm por 18 horas. As culturas *overnight* foram plaqueadas em LA e incubadas a 37 °C por 24 horas. No dia anterior à infecção, uma colônia isolada foi transferida para 10 mL de LB estéril, o qual foi incubado sob as mesmas condições. Concomitantemente, todos os meios utilizados para a infecção foram mantidos a 37 °C.

3.3.3.3. Captura bacteriana e sobrevivência intracelular

No dia da infecção, 0,5 mL da cultura *overnight* foram transferidos para 9,5 mL de LB estéril em tubo Falcon de 50 mL e incubados a 37 °C sob agitação constante de 180 rpm por aproximadamente 4 horas. Posteriormente, os inóculos foram centrifugados a 5000 x g por 5 minutos e ressuspensos em 10 mL de DPBS suplementado com 20 % de soro de galinha livre de anticorpo contra *Salmonella*, sendo incubados estaticamente a 37 °C por 45 minutos de modo a opsonizar a bactéria. Durante esse período, os meios dos poços foram substituídos por RPMI fresco sem adição de gentamicina e um poço extra foi utilizado para a enumeração de células por mL.

As culturas foram triplamente lavadas com NaCl 0,9 % sob centrifugação de 5000 x g por 5 minutos e ressuspensas em 10 mL de RPMI sem gentamicina. A DO_{600} foi mensurada em espectrofotômetro. Tendo em vista que valores da fase Log variando entre 0,6 e 0,8 representam aproximadamente 6×10^8 e 8×10^8 UFC/mL, as culturas bacterianas foram ajustadas para 10^7 UFC/mL de acordo o número de células a serem infectadas, respeitando-se uma Multiplicidade de Infecção (*Multiplicity Of Infection* – MOI) de 10:1 (bactérias:células). Assim, 0,1 mL das culturas bacterianas

foram adicionados em cada poço. As contagens dos inóculos foram verificadas por meio de diluições seriadas em LA.

Para facilitar a captura bacteriana pelas células fagocíticas, as placas de cultivo celular foram centrifugadas a 455,59 x g por 5 minutos a 25 °C (Aceleração = 1, Desaceleração = 0, centrífuga horizontal). Subsequentemente, as placas foram incubadas a 37 °C com CO₂ a 5 %. Após 30 minutos pós-inoculação, o meio foi retirado cuidadosamente e foi adicionado 1 mL de RPMI suplementado com 100 µg/mL de gentamicina (RPMI-100) de modo a eliminar bactérias presentes no meio extracelular. Essa etapa foi determinada como a captura bacteriana. Em paralelo, os poços da placa utilizada para determinar a taxa de captura bacteriana foram lavados triplamente com NaCl 0,9 % e, posteriormente, 1 mL de Triton-X 0,1 % foi adicionado para lisar os macrófagos e liberar as bactérias para o meio extracelular. Após 10 minutos, a contagem bacteriana foi realizada por meio de diluição seriada decimal em LA.

Por outro lado, depois de outros 30 minutos de incubação das placas para avaliar a sobrevivência intracelular contendo RPMI-100, o meio foi retirado gentilmente e os poços lavados triplamente com NaCl 0,9 %. Em seguida, 1 mL de RPMI-25 foi adicionado e as placas mantidas em estufa bacteriológica a 37 °C com nível de CO₂ a 5 % até os períodos de colheita. As etapas de lavagem tripla, lise celular e enumeração de células bacterianas viáveis sucederam-se conforme descritos anteriormente.

A sobrevivência bacteriana intracelular em células HD11 foi analisada com 1, 4, 8 e 20 horas pós-infecção (hpi) enquanto que em macrófagos primários derivados de monócitos do sangue periférico de galinhas foi com 1, 4 e 20 hpi. Todas as infecções foram realizadas em três replicatas biológicas independentes e cada ensaio foi conduzido em triplicata (HD11) e duplicata (macrófagos primários). Essa diferença foi adotada devido ao fato de que a obtenção de altas concentrações de células da segunda linhagem era mais difícil e laboriosa em relação à linhagem HD11.

3.3.3.4. Teste de citotoxicidade de macrófagos

Foi determinada a exigência do gene *mgtC* para SG provocar a lise de macrófagos primários. Para isso, 50 µL de cada poço das placas de 4 e 20 hpi foram transferidos em duplicatas para uma placa de microtitulação de 96 poços. Foram

utilizados dois controles: o negativo (células não-infectadas) e dos níveis máximos de lise celular. Assim, a atividade da Desidrogenase Láctica Citosólica (DHL) foi mensurada conforme o manual de instruções do kit colorimétrico CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega Corporation, EUA). O experimento foi conduzido em três repetições biológicas independentes. Baseando-se na leitura da Densitometria Óptica à 490 nm (DO₄₉₀) das reações, os cálculos das porcentagens indiretas de lise celular compreendem a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Citotoxicidade} = \frac{(\text{DO céls. infectadas} - \text{DO céls. não infectadas})}{(\text{DO máxima} - \text{DO células não infectadas})} \times 100$$

3.4. Experimentos *in vivo*

Os experimentos *in vivo* seguiram as diretrizes dos Princípios Éticos na Experimentação Animal desenvolvido pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados (Processo nº 019047/17, aprovado em 07 de Dezembro de 2017) pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP - Câmpus de Jaboticabal, São Paulo.

3.4.1. Aves utilizadas

Foram utilizadas 355 aves fêmeas semipesadas para postura comercial adquiridas com um dia de vida direto de incubatório e já vacinadas contra a doença de Marek. No momento da chegada, foi conduzida pesquisa de *Salmonella* spp. em amostras de mecônio presentes no interior das caixas de transporte (Zancan et al., 2000; de Paiva et al., 2006). Para isso, foi realizado suabe de arrasto com gazes estéreis embebidas em Água Peptonada 1 % (Oxoid®, Basingstoke, Hampshire, UK - CM0509) na superfície do assoalho da caixa de transporte. O material foi acondicionado em frasco contendo a mesma solução e incubado a 37 °C por 18 horas. Posteriormente, 1 mL da amostra foi transferido para caldo Selenito (SN) (Oxoid, RU – código CM0395) e 1 mL para caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) (Oxoid®, Basingstoke, Hampshire, UK - CM866) nas proporções 1:100 e 1:10 (v/v), respectivamente. Ambos os caldos foram previamente suplementados com 40 µg/mL de novobiocina (Merial, FR – lote 8041706) e, após inoculados, foram incubados nas mesmas condições anteriormente descritas. Ao término desse período, as amostras

foram semeadas por esgotamento com auxílio de alça bacteriológica a partir dos caldos SN e RV em ágar VB e ágar MacConkey (MC) (Oxoid®, Basingstoke, Hampshire, UK - CM0115). Após incubação de 24 horas a 37 °C, os meios de cultura foram analisados para identificar a presença de colônias sugestivas de *Salmonella* spp.. Dessa forma, foi constatada a ausência dessa bactéria e, assim, deu-se continuidade aos experimentos *in vivo*.

Os animais foram alojados em baterias metálicas no interior de sala climatizada e receberam água e alimento *ad libitum*. O período de luz e a temperatura seguiram os parâmetros descritos no Manual de Manejo da linhagem. As aves permaneceram nesse ambiente até o 19º dia de vida, momento em que foram transferidas para os infectórios e divididas nos grupos experimentais.

3.4.2. Preparo dos inóculos

Os inóculos foram preparados conforme descrito por Berchieri Junior et al. (2001). As estirpes selvagem e mutante, armazenadas em meio crioprotetor, foram retiradas do freezer – 80 °C e semeadas em LA com auxílio de uma alça bacteriológica estéril. Por conseguinte, as placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C em estufa bacteriológica e, após o cultivo, uma colônia foi tocada com alça estéril e inoculada em 10 mL de LB. A cultura (pré-inóculo) foi acondicionada em estufa bacteriológica a 37 °C por 18 horas sob agitação constante de 150 rpm. Ao término, o preparo dos inóculos seguiu conforme descrito para os experimentos de avaliação da patogenicidade e das infecção sistêmica e resposta imune (item 3.4.2.1), além da DL50 (item 3.4.2.2).

3.4.2.1. Para avaliação da patogenicidade, da infecção sistêmica e da resposta imune

Para o experimento, 400 µL das culturas *overnight* (pré-inóculo) foram transferidos para 39,6 mL de LB estéril (1:100) e incubados nas mesmas condições anteriormente descritas. Após 18 horas, foi realizada a contagem bacteriana dos inóculos (itens 5.3 e 0) por meio de diluição decimal seriada (v/v) em solução tampão (PBS pH 7,4) e depositados pela técnica de gotejamento na superfície de ágar VB como descrito no item 3.3.2.

Para a inoculação por via subcutânea, conduzida no experimento de avaliação da infecção sistêmica e da resposta imune (item 3.4.5), foi adotada uma etapa extra (Rodrigues Alves et al., 2018) em que foram realizadas quatro lavagens consecutivas dos inóculos com 10 mL de PBS. Em cada lavagem, a amostra foi centrifugada a 4000 x g por 10 minutos a 4 °C em centrífuga refrigerada (Andreas Hettich GmbH & Co., Alemanha – Modelo Universal 320), o sobrenadante foi descartado e o sedimento, por sua vez, ressuspendido em PBS. Após a última ressuspensão, a estimativa de UFC/mL dos inóculos por meio de diluição decimal seriada (v/v).

3.4.2.2. Para determinação da DL50

Após o cultivo *overnight* dos pré-inóculos de SG e SG $\Delta mgtC$ (item 3.4.2), 40 mL de inóculo foi preparado em frasco Erlenmeyer transferindo-se uma alíquota do pré-inóculo para LB estéril na proporção de 1:100 (v/v) e novamente incubados por três horas a 37 °C sob agitação constante de 150 rpm. O período de cultivo seguiu o encontrado no experimento *in vitro* da curva de multiplicação bacteriana (item 5.5.1) de modo que ambas as estirpes estivessem na concentração de 10^8 UFC/mL para sucessivas diluições decimais seriadas (v/v) dos inóculos. Para cada diluição, foram preparados 40 mL de inóculo. Ao término, foi realizada a contagem bacteriana em ágar VB por meio de diluição seriada dos inóculos (10^8 , 10^7 , 10^6 e 10^5 UFC/mL) em solução tampão PBS pH 7,4, na proporção 1:10 (v/v), conforme descrito no item 3.3.2.

3.4.3. Avaliação da patogenicidade

Aos 21 dias de vida, 60 aves foram distribuídas igualmente em dois grupos (A e B) e inoculadas oralmente com 1 mL das culturas das estirpes mutante (SG $\Delta mgtC$) e selvagem (SG) contendo 10^9 UFC/mL (item 3.4.2.1), conforme descrito na Tabela 14. A mortalidade e os sinais clínicos foram registrados diariamente ao longo de 21 dias.

Tabela 14. Distribuição das aves inoculadas oralmente com 1 mL das culturas das estirpes SG $\Delta mgtC$ e SG.

Estirpe	Grupo	Número de aves
SG $\Delta mgtC$	A	30
SG	B	30

3.4.4. Determinação da Dose Letal 50 (DL50)

Aos 21 dias de vida, 200 aves foram distribuídas igualmente em oito grupos (Tabela 15) e inoculadas oralmente com 1 mL das culturas (item 3.4.2.2) das estirpes mutante (Grupos C a F) e selvagem (Grupos G a J) nas diferentes doses (10^8 , 10^7 , 10^6 e 10^5 UFC/mL). A mortalidade foi registrada diariamente ao longo de 21 dias.

Tabela 15. Distribuição dos grupos inoculados com diferentes doses para determinar a DL50 das estirpes mutante (SG Δ mgtC) e selvagem (SG).

Estirpes inoculadas	Grupos	Número de aves	Doses (UFC/mL)
SG Δ mgtC	C	25	10^8
	D	25	10^7
	E	25	10^6
	F	25	10^5
SG	G	25	10^8
	H	25	10^7
	I	25	10^6
	J	25	10^5

3.4.5. Avaliação da infecção sistêmica

Aos 21 dias de vida, 95 animais foram distribuídos em cinco grupos (L a P) e inoculados com as estirpes mutante (SG Δ mgtC) e selvagem (SG), conforme descrito na Tabela 16. As colheitas de órgãos para avaliação da infecção sistêmica e da resposta imune dos animais foram conduzidas conforme os itens 3.4.5.1 e 3.4.5.2.

Tabela 16. Protocolo de inoculação para avaliação da infecção sistêmica de SG Δ mgtC em comparação com SG em aves susceptíveis.

Grupos	Número de aves	Administração do inóculo		
		Estirpe	Via	Quantidade
L	20	SG Δ mgtC	Oral	1 mL
M	20	SG Δ mgtC	Subcutânea	0,2 mL
N	20	SG	Oral	1 mL
O	20	SG	Subcutânea	0,2 mL
P	15	LB estéril	Oral	1 mL

3.4.5.1. Colheita de órgãos para avaliação da infecção sistêmica

Aos dois, cinco, sete e 10 dias pós-infecção (dpi), cinco aves por grupo foram eutanasiadas para a estimativa de células viáveis de *Salmonella* spp. em fígado e baço e para a avaliação de alterações anatomopatológicas. As amostras colhidas

foram acondicionadas em microtubos de 2 mL previamente pesados e mantidas sob refrigeração.

Para a contagem de células bacterianas viáveis, os fragmentos foram macerados por meio de pistilos estéreis e os microtubos novamente pesados de modo a determinar o volume de PBS pH 7,4 a ser adicionado para a primeira diluição (m/v). Em seguida, realizou-se a diluição seriada decimal (v/v) até 10^{-4} , conforme descrito anteriormente no item 3.3.2. De cada diluição foram retirados 100 μ L os quais foram espalhados por gotejamento na superfície de ágar VB contendo ácido nalidíxico na concentração de 100 μ g/mL (VB Nal). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e o número de UFC por grama de órgão (UFC/g) encontrado foi convertido em Log_{10} para análise dos resultados. Paralelamente, foi adicionado 500 μ L de SN duplamente concentrado aos microtubos contendo as amostras homogeneizadas em PBS que, por sua vez, foram incubados concomitantemente com as placas. Dessa forma, constatada a ausência de colônias na superfície do ágar, as amostras enriquecidas foram semeadas por esgotamento em VB Nal e incubadas a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, caso observado o crescimento de colônias nesse ágar, a amostra foi considerada positiva, sendo atribuído o valor de 10^2 UFC/g para as análises estatísticas.

3.4.5.2. Colheita de tecidos para avaliação da resposta imune

Três das cinco aves de cada grupo daquelas utilizadas para contagem microbiológica também tiveram seus órgãos colhidos tanto para RT-qPCR quanto para imuno-histoquímica. Assim, três animais dos grupos L (SG Δ *mgtC*), N (SG – Controle Positivo) e P (Controle Negativo) foram eutanasiados para colheita de tonsilas cecais e baço aos 2º, 5º e 7º dpi para realizar PCR via transcriptase reversa quantitativa em tempo real (RT-qPCR). Os tecidos foram imersos individualmente em criotubos RNase-/DNase-free de 2 mL (Corning, EUA) contendo 300 μ L de RNA^{later}® (Sigma-Aldrich, EUA - código R0901). Posteriormente, foram acondicionados a 4 °C por 24 horas e o excesso do reagente foi retirado após esse período. As amostras foram armazenadas em freezer -80 °C e e processadas para a RT-qPCR.

Paralelamente, aos dois, cinco, sete e 10 dpi foram colhidos fragmentos de fígado e tonsila cecal de três aves dos grupos L (SG Δ *mgtC*), N (SG – Controle

Positivo) e P (Controle Negativo) para imuno-histoquímica. Para isso, as amostras foram submersas em n-Hexano (n-Hexano P.A., Código - 01H1026.01.BJ, Synth, Brasil) previamente resfriado em nitrogênio líquido. Imediatamente após o congelamento dos fragmentos, os mesmos foram acondicionados em criotubos de 2 mL (Corning, EUA) e transferidos para nitrogênio líquido. Ao término, as amostras foram armazenadas em freezer – 80 °C até a realização do corte dos órgãos em criostato para imuno-histoquímica.

3.4.6. Avaliação da resposta imune do hospedeiro

3.4.6.1. Mensuração de citocinas por RT-qPCR

A validação dos métodos de RT-qPCR seguiram as diretrizes do *Minimum Information for Publication of Quatitative Real-Time PCR Experiments* (MIQE), conforme publicado por Bustin et al. (2009).

3.4.6.1.1. Maceração de tonsilas cecais e baço e purificação de RNA total

No dia anterior ao processo de maceração de tecidos, as pinças cirúrgicas, os bisturis, as gazes e os papéis-alumínio foram individualmente envoltos por papel kraft e tratados a temperatura de 270 °C por 4 horas para que quaisquer contaminantes, sejam inibidores, microrganismos, RNA ou DNA, fossem eliminados. Para todo o procedimento relacionado à RT-qPCR, foram utilizados microtubos e ponteiros livres de DNase e RNase, além de luvas sem talco. Ademais, foi preparada água DEPC por meio da purificação de água ultrapura Tipo I (Milli-Q®) com 0,1 % (v/m) de dicarbonato de dietila (DEPC, Sigma-Aldrich, EUA, Código – D5758-25ML). Para isso, a água e o reagente foram homogeneizados por 16 horas com auxílio de uma barra magnética e um agitador magnético (Modelo 752, Fisatom, Brasil).

No dia seguinte, a bancada de trabalho foi previamente higienizada com álcool, seguido da aplicação de solução de hipoclorito de sódio 1 % (v/v). Posteriormente, foi forrada com plástico filme de Policloreto de Vinila. Tanto o plástico quanto a balança analítica (Modelo AL500C, Marte®, Marte Balanças e Aparelhos de Precisão LTDA., Brasil) foram submetidos ao mesmo processo de sanitização descrito anteriormente, enquanto que o macerador portátil Tissue Master 125 (Omni International®, Omni, Inc, EUA, Modelo - TMP125-220) foi sanitizado em duas etapas. A primeira consistia no

uso de solução RNase AWAY® (Catalogue n. 10328-011, Invitrogen, Life Technologies Corporation, USA) para tratar o equipamento de modo a eliminar a ação de enzimas RNase. Já para a segunda etapa, a sonda do mesmo era imersa e sequencialmente acionada em 15 mL das seguintes soluções contidas em tubos Falcon: 1) álcool 70 %, 2) água Milli-Q®, 3) álcool 70 %, 4) água Milli-Q® e 5) água DPEC. Após a última lavagem, a sonda era seca com auxílio de gaze estéril tratada. Essa etapa era repetida após a maceração de cada órgão.

Os criotubos armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ foram individualmente retirados do ultrafreezer e os órgãos foram pesados em balança analítica sob um papel alumínio estéril. Foi padronizado o peso de 30 mg de amostra, mas caso necessário, os tecidos eram seccionados com auxílio de bisturi e pinça para que o peso padronizado da amostra fosse atingido. A troca dos materiais era feita após o manuseio de cada tecido. A purificação do RNA total foi realizada imediatamente após a maceração utilizando-se o RNeasyMini Kit (Qiagen, AL – código 74106), conforme as instruções do fabricante. As amostras foram armazenadas em ultrafreezer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para prosseguir-se às análises de integridade, qualidade e quantidade, além de posterior conversão em fita de cDNA.

Após purificado, o material genético foi submetido às análises de quantificação (ng/ μL) e de qualidade (relações 260/230 e 260/280) em espectrofotômetro (DeNovix DS-11 + Spectrophotometer, DeNovix, EUA). Ademais, a integridade do RNA total foi avaliado por meio de eletroforese em gel de agarose na concentração de 1 % (m/v) cujo preparo seguiu-se o descrito no item 3.2.1.4.1.4. Nesse caso, vale ressaltar que a cuba de eletroforese contendo o gel de agarose submerso em tampão TAE foi armazenada *overnight* a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ de modo a reduzir a degradação do RNA durante a corrida eletroforética, sendo retirada somente no momento da adição das amostras aos poços. Em cada poço foram adicionados 3 μL da amostra de RNA total extraído homogeneizados em 1 μL de Loading Dye. Paralelamente, no primeiro poço foram utilizados 4 μL de marcador de tamanho molecular (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen™, EUA) para determinar o tamanho dos fragmentos por comparação. Em seguida, as amostras foram submetidas a uma corrente elétrica de 25 V por 1 hora e 30 minutos. O gel de agarose foi fotografado no equipamento Gel Doc™ EZ Imager (Bio-Rad Laboratories, EUA) para visualização dos *amplicons*. Amostras de RNA total

íntegras apresentavam dois *amplicons* que representavam as regiões ribossomais 28S e 18S.

3.4.6.1.2. Conversão de RNA total em cDNA

Amostras de RNA íntegras no gel de agarose e contendo as relações de qualidade próximas a 2 (Sambrook; Russel, 2001; Brown et al., 2018) foram convertidas em cDNA. Para a conversão, as concentrações das mesmas foram previamente padronizadas para 300 ng/ μ L e a transcrição reversa foi realizada conforme as instruções presentes no QuantiTect® Reverse Transcription kit (Qiagen, AL – código 205311). Resumidamente, a primeira etapa consistiu na eliminação de DNA contaminante com a incubação em termociclador por 2 minutos a 42 °C de 2 μ L da amostra (600 ng) em 10 μ L de água UP contendo 2 μ L de gDNA Wipeout Buffer (7x). Em seguida, o mix contendo 1 μ L de Quantiscript Reverse Transcriptase, 4 μ L de Quantiscript RT Buffer (5x) e 1 μ L de RT Primer Mix foi transferido para os 14 μ L da amostra de RNA livre de DNA e incubados a 42 °C por 25 minutos, acrescido de uma etapa a 95 °C por 3 minutos para inativação da enzima transcriptase. O cDNA obtido foi quantificado e sua qualidade avaliada conforme descrito anteriormente (item 3.4.6.1.1). Em seguida, as amostras foram armazenadas em ultrafreezer – 80 °C até o momento de seu uso nas reações de RT-qPCR.

3.4.6.1.3. Padronização das reações de RT-qPCR

Para evitar contaminação, as reações foram conduzidas em capela de fluxo laminar, cuja superfície foi previamente sanitizada com álcool 70 % seguida da aplicação de hipoclorito de sódio 1 % (v/v) e acionamento por 15 minutos de luz ultravioleta (UV). Além disso, foram utilizadas pipetas monocanais calibradas (Corning® Lambda™ Plus series, Corning BV, EUA) de uso exclusivo para RT-qPCR e ponteiras estéreis RNase/DNase-free com filtro. A água UP foi alíquotada em microtubos de 0,2 μ L e, ao término da reação, a mesma era descartada caso houvesse excedente.

Para realizar as reações de RT-qPCR, foi necessário padronizar as concentrações de cDNA para 50 ng/ μ L. Concomitantemente, 2 μ L de cada amostra foram alíquotados em um único *pool* para testar as curvas-padrão dos genes de referência e dos genes de interesse. As sequências nucleotídicas dos iniciadores

estão disponíveis na literatura e descritos na Tabela 17. Foram utilizados cinco genes de referência, sendo eles os codificadores das enzimas hipoxantina-guanina fosforribosil transferase (HPRT) e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), da proteína de estrutura celular β -actina (ACTB), da proteína sinalizadora Ubiquitina (UB) e da subunidade 28S do ácido ribonucleico ribossomal (rRNA 28S). Já os genes-alvo foram o Interferon-gama (IFN- γ) e o Fator de Necrose Tumoral Alfa Induzido por Lipopolissacarídeo (LITAF) de aves.

Tabela 17. Sequência dos iniciadores referentes aos genes de referência e genes-alvo utilizados para RT-qPCR.

Gene	Nº de acesso	Sequencia (5' → 3')	Amplicon	Referência
Genes de referência	HPRT	AJ132697 F: cccaacattatgcagacga R: tgcctgtccatgatgagc	66 pb	De Boever et al. (2008)
	GAPDH	K01458 F: ggccacgccatcactatc R: cctgcatctgccattt	61 pb	De Boever et al. (2008)
	ACTB	L08165 F: acagatcatgttgagacctt R: atcacaataccagtgtacg	101 pb	De Boever et al. (2008)
	UB	M11100 F: ggatgcagatctctgtgaaa R: cttgccagcaaagatcaacctt	147 pb	Fan et al. (2012)
	rRNA 28S	XR_003078040.1 F: ggccaagccagaggaaact R: gacgaccgatttgacgctc	61 pb	Setta et al. (2012)
Genes-alvo	IFN- γ	GQ421600.1 F: gtgaagaaggtgaagatatcatgga R: gctttgcgctggattctca	71 pb	Setta et al. (2012)
	LITAF	NM_204267 F: gctgttctatgaccgccagtt R: aacaaccagctatgcacccca	56 pb	Berndt et al. (2007)

Primeiramente, foram testadas as eficiências dos iniciadores por meio da construção de curvas-padrão em *strips* de microtubos de 0,2 mL (0,2 mL *8-Tube PCR Strips*, #TLS0801, Bio-Rad, EUA). Para isso, as reações de PCR em tempo real foram realizadas em triplicata e adotou-se até a diluição -5 na base dois (1:2) do *pool* de cDNA. Em cada reação foram utilizados 6,25 μ L de SYBR Green Jumpstart™ Taq ReadyMix™ (Código S4438-500RXN, Sigma-Aldrich, San Luis, EUA) acrescidos de 0,6 μ M de cada iniciador (direto e reverso) referente ao HPRT, GAPDH, UB, IL-12 β e IFN- γ (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA) ou 0,3 μ M dos iniciadores de rRNA 28S, ACTB e LITAF, além de 50 ng de DNA molde (cDNA) e, por último, água UP (Sigma-Aldrich,

San Luis, EUA) em quantidade suficiente para completar o volume final de 12,5 µL por reação. As condições de ciclagem programadas no termociclador CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, EUA) foram a desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, seguida de 40 ciclos a 94 °C por 15 s para desnaturar e 58 °C por 30 s para parear os iniciadores e sintetizar novas fitas. A temperatura de pareamento e síntese utilizada para o gene LITAF foi de 60 °C. A leitura do sinal emitido pelo intercalante foi realizada após cada ciclo. Ao término, as curvas de melting foram geradas por meio da captação do sinal a cada 0,5 °C no aumento gradual de temperatura entre 65 °C e 95 °C.

Os arquivos gerados pelo equipamento foram analisados por meio do *software* Bio-Rad CFX Manager versão 3.1.1517.0823 para Windows (Bio-rad, EUA) onde foram determinados os valores da curva de calibração ou coeficiente de correlação (r^2) e do *slope*, além de serem geradas as curvas de eficiência ($E = 10^{(\frac{1}{\text{slope}})}$). Os ciclos de quantificação (Cq) das triplicatas com variação acima de 0,2 foram excluídos das análises. Os genes a serem testados na normalização foram selecionados com base na eficiência de amplificação (%E) cujos valores devem variar entre 90 e 110 % e de r^2 com valor acima de 0,98, sendo os valores ideais mais próximos de 100 % e 1, respectivamente (Ramakers et al., 2003; Bustin et al., 2009; Taylor et al., 2019).

A segunda etapa consistiu na escolha do gene de referência a ser o normalizador das reações de RT-qPCR. Para isso, 2 µL de cada amostra a ser testada foi aliquoteada em *pools*, respeitando-se o dia de colheita (dois, cinco e sete dpi), o tipo de tecido (baço e tonsila cecal) e o grupo (aves não infectadas ou infectadas com SG ou SG Δ mgfC). Assim, obteve-se 18 *pools* que foram utilizados em duplicata nas reações de cada gene normalizador. As condições de ciclagem foram as mesmas descritas anteriormente. Ao término, os valores de Cq foram convertidos em quantidades relativas por meio da fórmula $2^{(\text{Min valor} - \text{Cq valor})}$ e posteriormente submetidos à análise por meio dos *plug-ins* NormFinder (Andersen et al., 2004) e geNorm (Vandesompele et al., 2002) no *software* Microsoft Excel para Windows.

Em ambos os programas, as estabilidades dos genes são ranqueadas de modo que o menor valor representa genes mais estáveis. Para isso, NormFinder utiliza um modelo baseado em Análise de Variância (ANOVA) (Wang et al., 2017) em que o escore de estabilidade de expressão (valor de S) é calculado à partir das variações

intra- e inter-grupos (Ramhøj et al., 2019; Sundaram et al., 2019), enquanto que geNorm baseia-se na variação de emparelhamento (*pairwise variation*) nos fornecendo o valor de estabilidade de expressão (valor de M) (Wang et al., 2017; Ramhøj et al., 2019; Sundaram et al., 2019). No primeiro caso, valores abaixo de 0,5 são considerados estáveis (Ramhøj et al., 2019). Por outro lado, no geNorm adota-se um ponto-de-corte de até 1,5 e haverá sempre dois genes mais estáveis com o mesmo valor de M (Sundaram et al., 2019). Ademais, genes de referência adequados devem possuir valores abaixo de 0,5 (amostras homogêneas de tecidos) ou de 1 (amostras heterogêneas) (Hellemans et al., 2007).

Após determinados os genes de referência mais estáveis, as reações para determinação da expressão gênica foram realizadas em duplicata utilizando-se placas de 96 poços para RT-qPCR (Multiplate™ 96-Well PCR Plates, #MLL9601, Bio-rad, EUA) sob as mesmas condições de ciclagem do termociclador descritas anteriormente durante o processo de padronização da curva-padrão.

Dois métodos mais comumente utilizados para determinar a expressão relativa gênica são o de $2^{-\Delta\Delta Cq}$, conhecido como “Delta-Delta-Cq” (Livak e Schmittgen, 2001), e o de eficiência calibrada, também chamado de método de Pfaffl (Pfaffl, 2001). No primeiro caso, assume-se que as eficiências de amplificação de todos os genes-alvo são de 100 % (Livak e Schmittgen, 2001). Já pelo método de Pfaffl, a correção pelas eficiências específicas é realizada previamente ao cálculo da quantificação relativa (Pfaffl, 2006) para múltiplos genes de referência (Vandesompele et al., 2002; Hellemans et al., 2007). Assim, no presente estudo adotou-se o método de Pfaffl (Pfaffl, 2001; Vandesompele et al., 2002; Hellemans et al., 2007), conforme descrito nas fórmulas abaixo e conduzidos no *software* Microsoft Excel para Windows. Os dados de expressão gênica relativa foram então submetidos às análises estatísticas.

$$\text{Convers\~{a}o da efici\~{e}ncia dos primers (E)} = \left(\frac{\text{Efici\~{e}ncia do primer (\%)}}{100} \right) + 1 \quad [\text{Eq 1}]$$

$$\text{Express\~{a}o g\~{e}nica relativa} = \frac{(E_{\text{GI}})^{\Delta\text{Cq GI}}}{\bar{g}[(E_{\text{REF}})^{\Delta\text{Cq REF}}]} \quad [\text{Eq 2}]$$

Onde, E é a base da amplificação, ΔCq representa a variaç~{a}o no ciclo de quantificaç~{a}o entre amostra controle e tratada, GI refere-se ao gene de interesse, REF é o gene de refer\~{e}ncia e \bar{g} é a m\~{e}dia geom\~{e}trica.

3.4.6.2. Contagem da populaç~{a}o de macr~{o}fagos, CD4⁺ e CD8⁺ por imunohistoqu\~{i}mica

3.4.6.2.1. Corte dos tecidos

As amostras de ~{o}rg~{a}os de f\~{i}gado e tonsila cecal armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ foram transferidas para freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aproximadamente 10 minutos antes de serem seccionadas em criostato (Leica CM1860, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Alemanha) com Navalhas de Perfil Baixo (Leica 819, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Alemanha) sob temperatura de $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os ~{o}rg~{a}os foram embebidos individualmente em composto O.C.T. (Optimal Cutting Temperature) (Tissue-Tek[®], Sakura Finetek Europe B.V., Holanda) e colocados no interior do criostato por 30 minutos. Em seguida, foram realizadas as secc~{o}es histol~{o}gicas de $6\text{ }\mu\text{m}$ de tonsilas cecais e de $10\text{ }\mu\text{m}$ de f\~{i}gados. Os cortes foram posicionados na superf\~{i}ce de l~{a}minas histol~{o}gicas (StarFrost[®] Slides, Waldemar Knittel Glasbearbeitungs GmbH, Alemanha) com aux\~{i}lio de pincel e armazenadas em caixas porta-l~{a}minas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ at\~{e} o momento da marcaç~{a}o das c\~{e}lulas imunes.

3.4.6.2.2. Marcaç~{a}o das c\~{e}lulas imunes por imunohistoqu\~{i}mica

No primeiro dia, as l~{a}minas foram retiradas do freezer $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, posicionadas individualmente em suporte de l~{a}minas e alocadas em cuba histopatol~{o}gica de nylon (EasyPath[®], Grupo Erviegas, Brasil) contendo 200 mL de acetona (Acetona P.A. – A.C.S. – C~{o}digo A1017.01.BJ, Synth, Brasil) refrigerada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos para fixa~{c}~{a}o dos tecidos. Posteriormente, as l~{a}minas foram transferidas para c~{a}mara ~{u}mida (EasyPath[®], Grupo Erviegas, Brasil) de modo a secarem sob temperatura ambiente

por 5 minutos. Com auxílio de uma pisseta, foram lavadas com PBS e imersas em cuba contendo 200 mL do mesmo reagente. Após 5 minutos, o excesso de PBS das lâminas foi retirado e as mesmas foram transferidas para cuba com 200 mL de H₂O₂ 4% preparados a partir da homogeneização de peróxido de hidrogênio (Peróxido de Hidrogênio P.A. – Código 01P2233.01.BJ, Synth, Brasil) em álcool metílico (Álcool Metílico – Metanol - P.A. – A.C.S., Código – A1085.01.BL, Synth, Brasil) para bloqueio da peroxidase endógena. As lâminas foram imediatamente mantidas em ambiente sem luz por 10 minutos. Posteriormente, foram secas ao redor dos cortes com papel absorvente e os mesmos foram contornados com caneta hidrofóbica (Dako Pen – Código S2002, Dako Denmark A/S, Dinamarca). As lâminas foram novamente lavadas com PBS, repousadas no interior da caixa úmida e um excesso da solução tampão foi depositada sob os cortes por 5 minutos.

Em seguida, foi adicionado o bloqueador de coloração de fundo inespecífico (Protein Block, Código DPB-125, Spring Bioscience Corp., EUA) sob as lâminas por meio de gotejamento. Em seguida, a caixa úmida foi mantida em ambiente sem luz por 30 minutos. Ao término, o processo de lavagem com PBS foi repetido e, após retirar o excesso, foram adicionados 200 µL de anticorpo primário (Tabela 18) diluído na concentração 1:200 (v/v) em diluente de anticorpo (Antibody diluent with background reducing components, Código – S3022, Dako®, Dako North America Inc., EUA) sob os cortes. As lâminas foram armazenadas em geladeira a 4 °C por 18 horas.

Tabela 18. Anticorpos primários (CD4⁺, CD8⁺ e Monócitos/Macrófagos) utilizados.

Célula imune	Anticorpo primário	Clone	Código	Marca
CD4 ⁺	Mouse Anti-Chicken CD4-UNLB	CT-4	8210-01	Southern BioTech, USA
CD8 ⁺	Mouse Anti-Chicken CD8α-UNLB	CT-8	8220-01	
Monócitos/Macrófagos	Mouse Anti-Chicken Monocyte/Macrophage-UNLB	Kul01	8420-01	

No segundo dia, as lâminas foram novamente lavadas com PBS, o excesso foi retirado e o anticorpo secundário rabbit anti-mouse (Reveal Complement – Código DCMT-125, Spring Bioscience Corp., USA) foi gotejado sob os cortes de tecidos. Após 30 minutos em ambiente sem luz, o anticorpo foi descartado e o conjugado HRP (HRP conjugate - Código DHRR-125, Spring Bioscience Corp., USA) foi adicionado na superfície da lâmina e mantido pelo mesmo período e nas mesmas condições

anteriores. Nos 5 minutos finais, foi preparado o DAB (3,3'-diaminobenzidine) por meio da mistura de uma gota do cromógeno (DAB Chromogen 50x, Código - DABC-004, Spring Bioscience Corp., USA) em 1 mL de substrato (DAB Substrate, Código – DABS-125, Spring Bioscience Corp., USA) para cada três lâminas. O DAB foi adicionado à superfície das lâminas e, após 4 a 5 minutos, as amostras foram transferidas para uma cuba com 200 mL de água destilada por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram imersas em corante Hematoxilina de Harris (Hematoxilina de Harris, Código - HH08362SO, Êxodo Científica, Brasil) por, no máximo, 5 minutos e depois mantidas em água corrente de baixa pressão por 10 minutos.

Posteriormente, as lâminas foram submetidas à bateria de álcool-xilol em cubas de nylon para coloração (EasyPath®, Modelo - EP-31-05101, Grupo Erviegas, Brasil) no interior de capela de exaustão (Modelo ORG 10, Série 1180, Ideoxima, Brasil). Para isso, foram utilizados xilol (Xilol P.A. – A.C.S., Código 01X1001.01.BJ, Synth, Brasil) e diferentes concentrações de álcool (70 %, 90 % e 100 %), as quais foram preparadas a partir da mistura álcool etílico absoluto (Álcool etílico absoluto P.A. – A.C.S., Código – A1084.01.BL, Synth, Brasil) com água destilada (v/v). As lâminas foram imersas nas cubas na seguinte sequência durante um período de dois segundos entre cada solução: Álcool 70 %, Álcool 90 %, Álcool 100 %, Xilol I e Xilol II. Ao término, uma gota de meio de montagem de lâminas (Entellan®, Código – 107960, Merck, Brasil) foi depositada sob os cortes embebidos em xilol para que fosse possível a aderência da lamínula para microscopia (Código – P24X60, Precision, Brasil). Foram realizadas três imagens aleatórias de cada seção dos tecidos com auxílio de microscópio binocular (Modelo N-120, Coleman®, Brasil) acoplado com câmera fotográfica utilizando-se a objetiva de 40x. As porcentagens das áreas imunomarcadas de macrófagos e linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em comparação com as áreas não-marcadas em todo o campo foram determinadas utilizando-se o *software* Image-Pro Plus® (Media Cybernetics, Inc., EUA).

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os testes estatísticos e elaboração dos gráficos foi utilizado o software GraphPad Prism versão 8.0.1 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California, USA) e adotado nível de significância menor do que 5 % ($P < 0,05$). A normalidade dos resíduos foi analisada pelo teste de D'Agostino-Pearson omnibus (K2) e por gráficos QQ Plot (Motulsky, 2022a) e confirmada a distribuição Gaussiana dos dados. A comparação das curvas de multiplicação bacteriana em caldos nutrientes (M9 ou LB) foram realizadas por meio do teste Análise de Variância de Dupla Classificação (*Two-way ANOVA*) seguido pela comparação múltipla de Sidak. Os resultados de contagem bacteriana em macrófagos e de sobrevivência *fold-net* foram previamente transformados em Log_{10} e analisados por meio da *Two-way ANOVA* seguida pelo teste de comparação múltipla de Sidak (Daniel e Cross, 2013; Motulsky, 2022b). Os dados de citotoxicidade foram analisados pelo mesmo teste. Já aqueles referentes a captura bacteriana foram também transformados em Log_{10} , mas submetidos ao Teste T não-pareado.

Nos experimentos *in vivo*, a mortalidade total foi comparada com o método de Qui-quadrado com correção de Yates enquanto que para mortalidade ao longo do tempo foi adotado o teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon. O cálculo da Dose Letal (DL50) foi realizado conforme Reed e Muench (1938) e está detalhado no Apêndice B. As contagens bacterianas em fígado e baço foram previamente transformados em Log_{10} foram analisados por meio de *Two-way ANOVA* seguido pelo teste de comparação múltipla de Sidak (Daniel e Cross, 2013; Motulsky, 2022b). Para determinar o pico das contagens bacterianas, as curvas foram ajustadas para regressões não-lineares. Os resultados referentes à expressão relativa de LITAF e IFN- γ em tonsila cecal e baço de aves foram transformados em escala logarítmica e submetidos ao teste de *Two-way ANOVA* seguido pela análise múltipla de Tukey (Setta et al., 2012; Huang et al., 2019; Motulsky, 2022b). Para comparar as porcentagens das populações de macrófagos, CD4⁺ e CD8⁺ em tonsila cecal e fígado de aves, os resultados foram submetidos ao teste de *Two-way ANOVA* seguido pela análise múltipla de Tukey (Barbosa et al., 2021; Motulsky, 2022b).

5. RESULTADOS

5.1. Preparo da estirpe mutante SG $\Delta mgtC$

Após a extração do DNA bacteriano de SG str. 287/91 (item 3.2.1.2) e dos plasmídios pKD46, pKD3 e pCP20 presentes em estirpes DH5 α de *Escherichia coli* (item 3.2.1.3) A combinação dos iniciadores de checagem *mgtC_F* e *mgtC_R* foi testada juntamente com o DNA de SG str. 287/91 extraído (item 3.2.1.4.2.3) e constatou-se a amplificação da região adjacente ao gene *mgtC* com tamanho molecular próximo ao esperado de 1,2 Kb, conforme ilustrado na Figura 10.

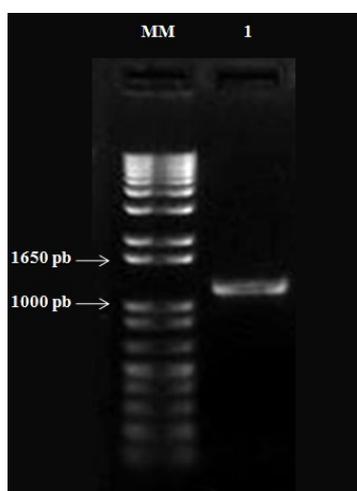


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 1,5 % de produto amplificado da região adjacente ao gene *mgtC* do genoma de SG str. 287/91 utilizando os iniciadores *mgtC_F* e *mgtC_R*. **MM:** Marcador de Tamanho Molecular (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen™, EUA); **1:** amostra de DNA de SG str. 287/91 (1,2 Kb).

Posteriormente, o plasmídio pKD46 foi inserido na estirpe SG str. 287/91 por eletroporação. Após o plaqueamento em ágar de lisogenia (LA) contendo ampicilina (100 μg / mL), foi observado o crescimento de colônias sugestivas da inserção de pKD46 (SG + pKD46) (Figura 11a) e oito delas foram selecionadas e transferidas para outra placa contendo LA e ampicilina (Figura 11b). Todas as colônias sugestivas foram consideradas lisas devido a ausência de aglutinação em acriflavina (Figura 11c) e em solução salina 2 %. As colônias sugestivas foram então transferidas para LA sem antibiótico para, assim, prosseguir-se com a confirmação da inserção do plasmídio pKD46 por PCR.

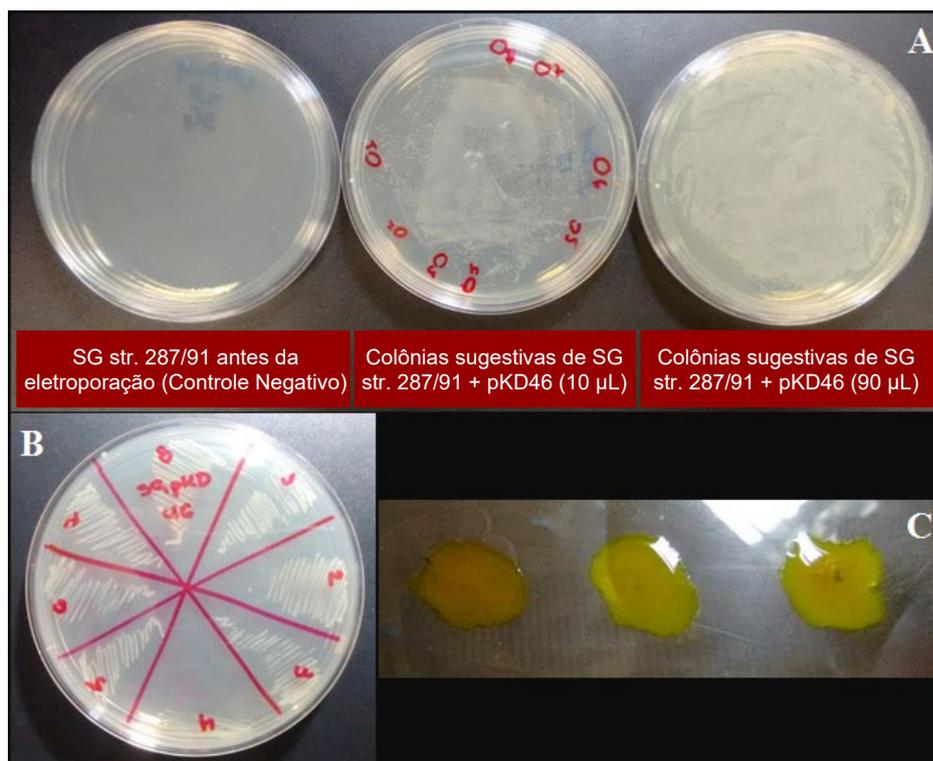


Figura 11. Após a eletroporação foi observado o aparecimento de colônias sugestivas tanto nas placas com 10 e 90 µL de SG contendo pKD46 e ausência de colônias na placa em que SG str. 287/91 foi semeado (A). Oito colônias sugestivas em LA com 10 µL do produto de eletroporação (A) foram semeadas em outra placa (B) da qual foram testadas para rugosidade (C).

Depois de comprovada a presença do plasmídio por PCR, a estirpe estava apta para a mutagênese em si. A amplificação do fragmento linear contendo a CDS do cassete de resistência ao cloranfenicol de tamanho molecular próximo aos 1114 pb foi confirmado por meio de PCR. Posteriormente, o fragmento linear de mutagênese foi purificado e introduzido na estirpe competente SG + pKD46 via eletroporação. Observado o crescimento de colônias sugestivas de SG $\Delta mgtC$ Cf^r em LA contendo cloranfenicol, foi realizada a PCR confirmatória (item 3.2.1.4.2.3) utilizando a combinação dos iniciadores *mgtC_F*, *mgtC_R*, C1 e C2 para a substituição do gene-alvo pelo cassete de resistência ao cloranfenicol. Dessa forma, a estirpe receptora estava apta a receber o plasmídio pCP20. Este foi introduzido por eletroporação e, depois de confirmada a estrutura lisa da bactéria mutada (SG $\Delta mgtC$ Cf^r + pCP20), o plasmídio foi retirado. Sua exclusão foi confirmada quando o aparecimento de colônias sugestivas (SG $\Delta mgtC$) em LA contendo ampicilina e cloranfenicol não foi mais

observada. Uma colônia sugestiva isolada em LA sem antibiótico foi selecionada para prosseguir com a PCR confirmatória da mutagênese (item 3.2.1.4.2.3; Figura 12).

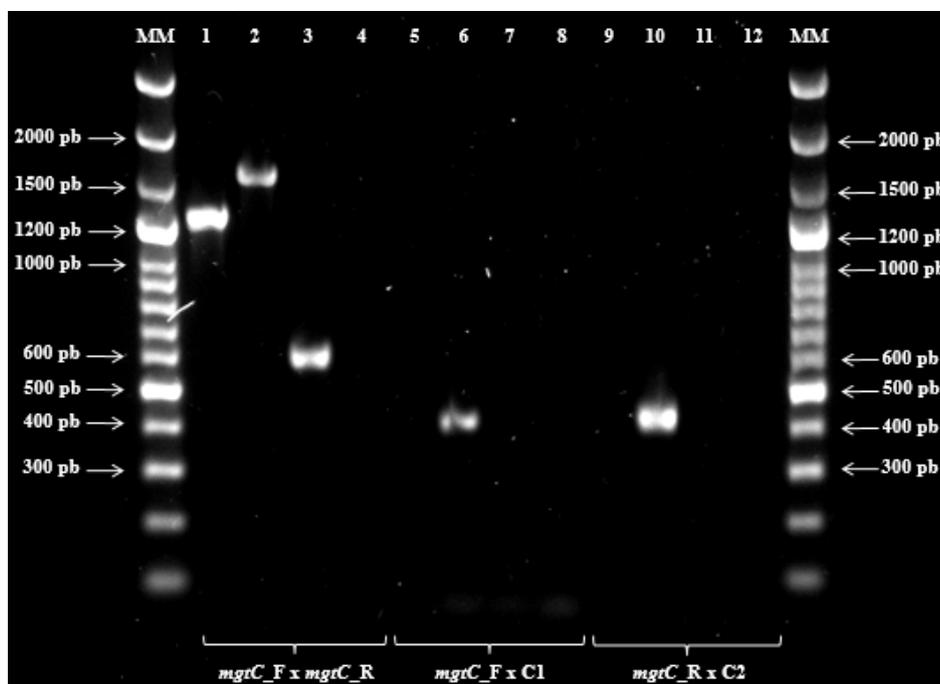


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 1,5 % da confirmação da deleção do gene *mgtC* do genoma de SG str. 287/91. **MM:** Marcador de Tamanho Molecular (100 bp Ladder Plus, Ready-to-use, Sinapse Inc, Brasil, código – M1071); **1, 5 e 9:** SG str. 287/91; **2, 6 e 10:** SG $\Delta mgtC$ Cf^r; **3, 7 e 11:** SG $\Delta mgtC$; **4, 8 e 12:** Controle negativo.

O gene *mgtC* presente na estirpe selvagem SG str. 287/91 e sua substituição pelo cassete de resistência ao cloranfenicol (SG $\Delta mgtC$ Cf^r) gerou *amplicons* próximos a 1,2 (Coluna 1) e 1,5 Kb (Coluna 2), respectivamente. Quando o cassete de resistência foi retirado com o plasmídio pCP20, obteve-se o mutante final SG $\Delta mgtC$ cuja região amplificada com os iniciadores *mgtC*_F e *mgtC*_R resultou em produto com tamanho molecular de aproximadamente 0,5 Kb (Coluna 3). Somente houve *amplicons* gerados com os iniciadores C1 (Coluna 6) e C2 (Coluna 10) quando o cassete de resistência estava inserido no genoma bacteriano (SG $\Delta mgtC$ Cf^r). Assim, não foi observado produto amplificado ao utilizar o DNA da estirpe SG str. 287/91 e do mutante final SG $\Delta mgtC$, visto que a CDS de resistência estava ausente. Dessa forma, a deleção dos 696 pb referentes à CDS do gene *mgtC* presente no genoma de SG str. 287/91 foi possível por meio da técnica sítio-dirigida de *Lambda-red*.

5.2. Multiplicação em meio limitante

De modo a elucidar o efeito da acidificação, SG $\Delta mgtC$ e SG foram cultivados em LB (Figura 13), cujo meio fornece níveis adequados de magnésio para a multiplicação bacteriana. O pH foi ajustado para 7 (Figura 13a) ou 5 (Figura 13b), as não foi observada diferença estatística ($P > 0,05$) nas curvas de multiplicação.

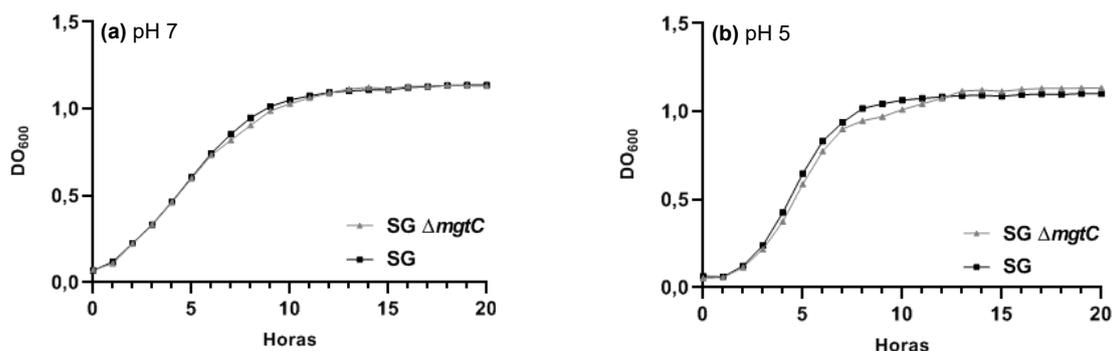


Figura 13. Curvas de multiplicação de SG $\Delta mgtC$ e da estirpe selvagem SG em LB com (a) pH 7 e (b) pH 5. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os pontos das curvas.

Aliado a isso, foi investigado o papel de *mgtC* na adaptação de SG para as condições adversas intramacrófagicas, combinando a acidificação com a baixa concentração de Mg^{2+} (Figura 14). Em elevadas concentrações desse cátion (10 mM) e em níveis neutros de pH 7 (Figura 14a), ambas as estirpes multiplicaram-se similarmente ($P > 0,05$). Entretanto, sob acidificação (pH 5) e com baixa concentração de Mg^{2+} (10 μM) (Figura 14b), SG $\Delta mgtC$ apresentou multiplicação deficiente após 13 horas de incubação em comparação com SG ($P < 0,05$).

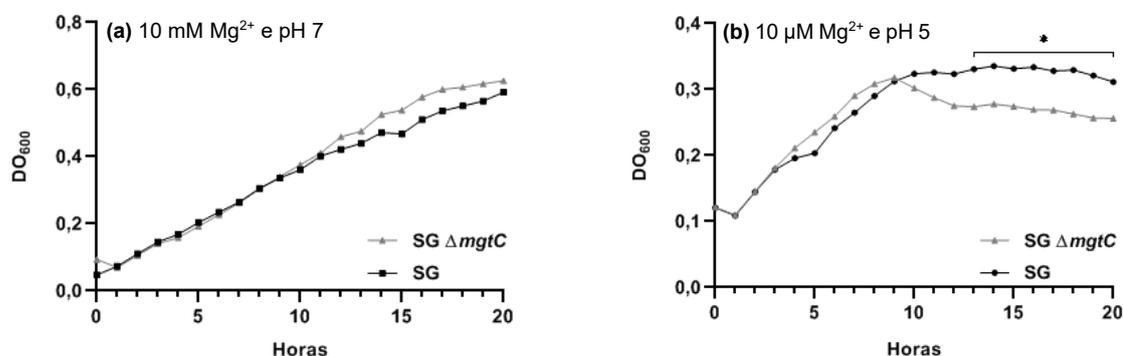


Figura 14. Curvas de multiplicação de SG $\Delta mgtC$ e SG em meio mínimo M9 limitante com (a) 10 mM de Mg^{2+} e pH 7 e com (b) 10 μM Mg^{2+} e pH 5. *, diferenças estatísticas ($P < 0,05$).

5.3. Infecção de macrófagos

5.3.1. Células semelhantes a macrófagos da linhagem HD11

Analisando os dados de captura bacteriana, não foram observadas diferenças estatísticas ($P > 0,05$) na fagocitose da estirpe mutante e da selvagem (Figura 15a). Por outro lado, as sobrevivências intracelulares e *fold-net* de SG $\Delta mgtC$ foram menores após 4 hpi ($P < 0,05$; Figura 15b) e entre 1 e 4 hpi, respectivamente ($P = 0,0004$; Figura 15c).

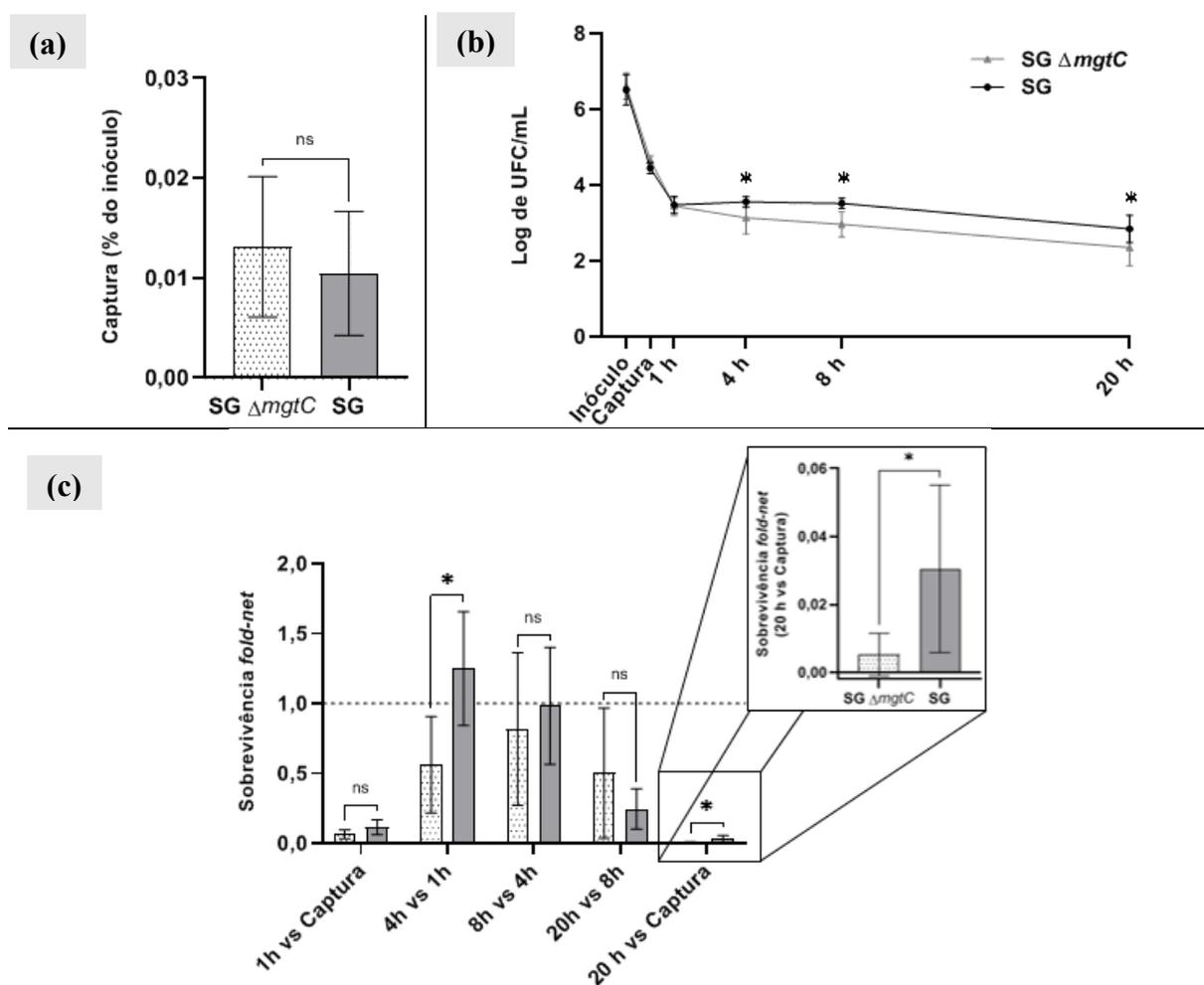


Figura 15. (a) Captura de SG $\Delta mgtC$ e SG por células semelhantes a macrófagos da linhagem HD11 e (b) sobrevivência bacteriana ao longo de 20 hpi no ambiente intracelular. Além disso, foi avaliada a (c) sobrevivência *fold-net* das duas estirpes. ns, $P > 0,05$; *, $P < 0,05$.

5.3.2. Macrófagos primários

Assim como nas células HD11, a ausência de *mgtC* não influenciou na captura da bactéria pelos macrófagos primários ($P > 0,05$; Figura 16a). Além disso, células

viáveis de SG $\Delta mgtC$ no ambiente intracelular foram similares ($P > 0,05$) à contagem de SG, exceto às 20 hpi ($P = 0,0004$; Figura 16b). Foi também observado que a estirpe SG $\Delta mgtC$ teve menores valores de sobrevivência *fold-net* entre 1 e 20 hpi como demonstrado na Figura 16c. Dessa forma, as taxas gerais de sobrevivência *fold-net* (20 hpi *versus* Captura) foram de aproximadamente de 0,005 (SG $\Delta mgtC$) e 0,019 (SG) vezes, sendo estatisticamente diferentes ($P < 0,0001$; enquadramento em destaque na Figura 16c).

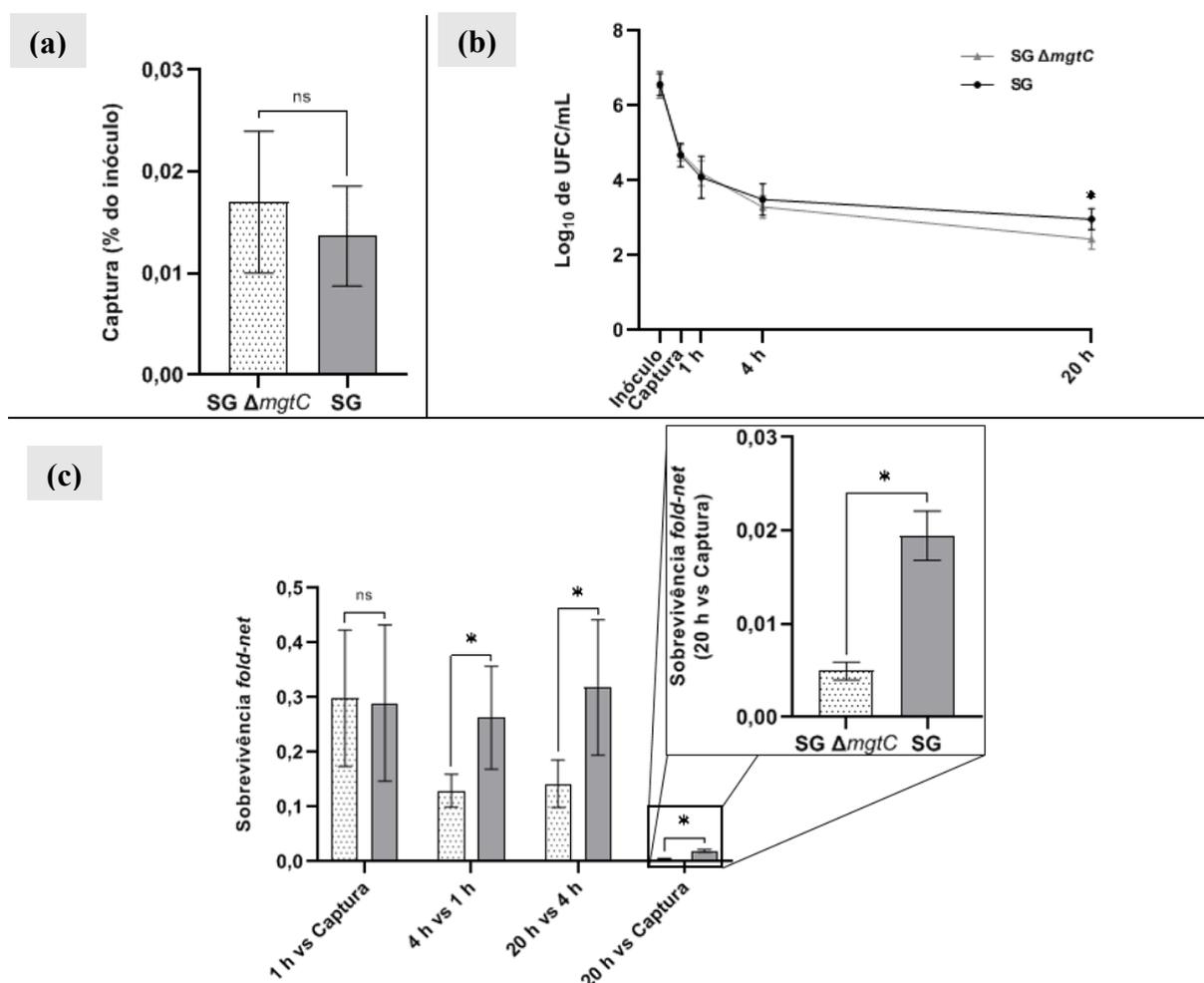


Figura 16. (a) Captura, (b) sobrevivência *fold-net* e (c) sobrevivência *fold-net* de SG $\Delta mgtC$ e SG ao longo de 20 hpi no interior de macrófagos primários derivados de monócitos do sangue periférico de galinhas. ns, $P > 0,05$; *, $P < 0,05$.

De modo a investigar se *mgtC* influencia na lise de macrófagos, foi conduzido um experimento de citotoxicidade nos estágios inicial (4 hpi) e tardio (20 hpi) da

infecção por meio da mensuração de DHL liberada no meio extracelular após a morte dessas células. Como mostrado na Figura 17, não foram observadas diferenças estatísticas nos níveis líticos de macrófagos infectados com SG $\Delta mgtC$ e SG em 4 hpi ($P = 0,2918$) e 20 hpi ($P = 0,1863$).

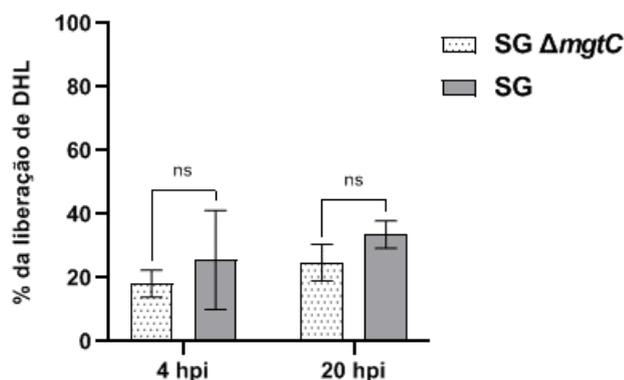


Figura 17. Porcentagem (%) da lise de macrófagos primários derivados de monócitos do sangue periférico de galinhas causado por SG $\Delta mgtC$ e SG nos estágios inicial (4 hpi) e tardio (20 hpi) da infecção. ns, $P > 0,05$.

5.4. Avaliação da patogenicidade de SG $\Delta mgtC$

Não foi isolado *Salmonella* spp. do mecônio no momento da chegada dos pintos e, assim, deu-se andamento aos experimentos *in vivo*. O início dos sinais clínicos em aves de ambos os grupos ocorreu simultaneamente, porém observou-se uma evolução mais aguda em aves do Grupo B (estirpe selvagem) em comparação com as do Grupo A (estirpe mutante). Com 1 dpi, dois animais desafiados com a estirpe mutante (2/30) e três aves inoculadas com a estirpe selvagem (3/30) estavam apáticas e sonolentas. Aos 4 dpi, houve início de diarreia esverdeada discreta no Grupo A, enquanto que no Grupo B já estava de moderada a severa e, mais aves de ambos os grupos, estavam apáticas, sonolentas, com asas caídas e penas arrepiadas. Aos 5 dpi, a diarreia estava moderada e muito severa em animais desafiados com SG $\Delta mgtC$ e SG, respectivamente. Além disso, 20 aves no Grupo A (20/28) e 26 inoculadas com SG (26/28) aparentavam enfermas. Aos 8 dpi, a diarreia tornou-se muito severa no Grupo A e apenas duas aves estavam ligeiramente apáticas enquanto que as outras apresentavam sinais clínicos severos. Por outro lado, todos os animais do Grupo B estavam severamente enfermos. Ao término do experimento, dois animais desafiados com SG $\Delta mgtC$ se recuperaram e três ainda apresentavam sinais clínicos severos. Já

a ave remanescente desafiada com SG estava se recuperando. Em ambos os grupos ainda era possível notar a presença de diarreia esverdeada.

Os óbitos (Tabela 19) de aves desafiadas com SG iniciaram-se aos cinco dpi e cessaram-se aos nove dpi, com pico entre o 6º e 7º dpi. Por outro lado, SG $\Delta mgtC$ provocou a morte dos animais entre o 5º e 13º dpi e o pico ocorreu entre o 7º e 9º dpi. Ao término do experimento, foi observado que a mortalidade total não diferiu entre os grupos ($P = 0,1967$), porém houve diferença estatística ($P = 0,0104$) no que se refere ao tempo de ocorrência da mortalidade (Figura 18). Portanto, mesmo resultando em taxas de mortalidade semelhantes, pode-se inferir que aves infectadas pela estirpe selvagem sucumbem mais precocemente em relação às inoculadas com SG $\Delta mgtC$.

Tabela 19. Registro diário de óbitos ao longo de 21 dias de aves semipesadas inoculadas com 1 mL das estirpes mutante (Grupo A) ou selvagem (Grupo B) aos 21 dias de vida.

Estirpe	Grupo	Aves	Inóculo (UFC/mL)	Mortalidade								Total	%	
				Dias pós infecção (dpi)										
				5	6	7	8	9	10	11	12			13
SG $\Delta mgtC$	A	30	1×10^9	2	2	8	4	3	2	1	2	1	25 ^a	83,33
SG	B	30	$1,4 \times 10^9$	2	8	11	4	-	4	-	-	-	29 ^a	96,66

Letras semelhantes: não houve diferença estatística ($P = 0,1967$) na mortalidade total (Qui-quadrado com correção de Yates).

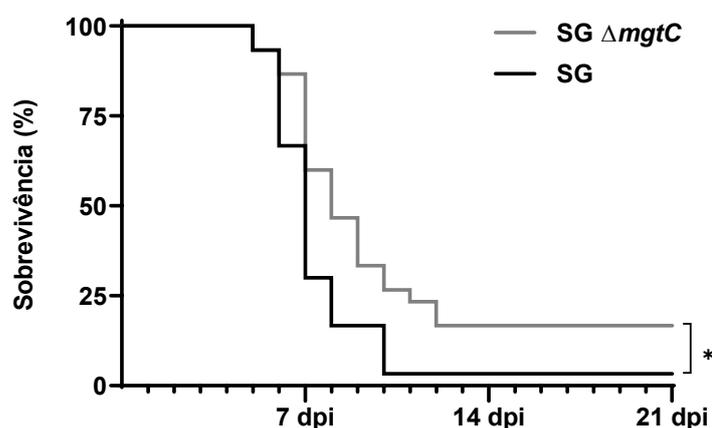


Figura 18. Curva de sobrevivência de aves infectadas com as estirpes mutante (SG $\Delta mgtC$) e selvagem (SG). *, diferença estatística significativa ($P < 0,05$) considerando os eventos de óbitos ao longo do tempo por meio do teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon.

5.5. Determinação da Dose Letal 50 (DL50)

5.5.1. Curva de multiplicação bacteriana em caldo Lisogenia

O perfil da multiplicação de ambas as estirpes em LB foram semelhantes (Figura 19) e a deleção do gene *mgtC* não afetou o metabolismo bacteriano em meio ótimo. Nota-se que, para garantir que as culturas de cada estirpe atinjam valores próximos a 10^8 UFC/mL para o experimento *in vivo* de DL50, foi necessário o cultivo bacteriano por 3 a 4 horas após a transferência do pré-inóculo para novos LB, possibilitando a padronização das diluições.

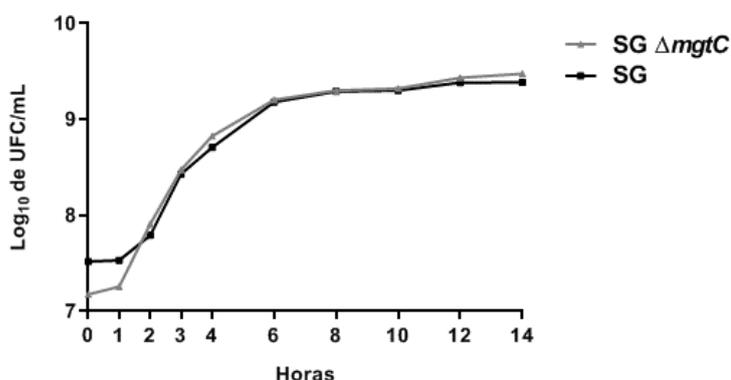


Figura 19. Curva de multiplicação das estirpes selvagem (SG) e mutante (SG $\Delta mgtC$) em LB ao longo de 14 horas.

5.5.2. Experimento *in vivo* da Dose Letal 50 (DL50)

Em relação à DL50, os cálculos estão descritos no Apêndice B. A DL50 da estirpe mutante foi de $8,7 \times 10^6$ UFC/mL (6,94 Log₁₀ de UFC/mL) e a da selvagem foi de $3,89 \times 10^5$ UFC/mL (5,59 Log₁₀ de UFC/mL) (Tabela 20). Portanto, foram necessárias 22,36 vezes ou 1,36 Log₁₀ de UFC/mL mais bactérias contendo a deleção do gene *mgtC* para causar o óbito de 50 % dos animais desafiados em comparação com a estirpe selvagem.

Tabela 20. Dose Letal 50 (DL50) de poedeiras semipesadas inoculadas com 1 mL de diferentes doses de SG $\Delta mgtC$ ou SG ao longo de 21 dias.

Estirpe	Grupo	Aves	Inóculo (UFC/mL)	Mortalidade							Total	DL50	
				3 dpi	6 dpi	7 dpi	8 dpi	9 dpi	10 dpi	11 dpi			12 dpi
SG $\Delta mgtC$	C	25	10^8	-	-	2	7	5	4	3	1	22	6,94 Log ₁₀ UFC/mL
	D	25	10^7	-	-	-	1	5	4	2	1	13	
	E	25	10^6	-	-	-	2	1	-	1	-	4	
	F	25	10^5	-	-	-	-	1	2	1	-	4	
SG	G	25	10^8	1	5	8	5	2	1	2	-	24	5,59 Log ₁₀ UFC/mL
	H	25	10^7	-	-	8	3	2	2	1	2	18	
	I	25	10^6	-	-	5	4	4	3	1	-	17	
	J	25	10^5	-	-	-	2	3	-	-	1	6	

5.6. Avaliação da infecção sistêmica

As contagens dos inóculos administrados estão descritos na Tabela 21.

Tabela 21. Contagens bacterianas dos inóculos administrados.

Estirpe	Grupo (Via de administração)	Contagem de células viáveis (UFC/mL)	
		Pré-inóculo	Inóculo
SG $\Delta mgtC$	L (Oral)	1,32x10 ⁹	9,6x10 ⁸
	M (Subcutânea)		8,8x10 ⁸
SG	N (Oral)	1,52x10 ⁹	9,2x10 ⁸
	O (Subcutânea)		6,8x10 ⁸

Durante o exame anatomopatológico, as lesões observadas foram semelhantes entre os animais de um mesmo grupo. Aos 2 dias pós-infecção (dpi) não havia alterações nos órgãos, porém aos 5 dpi foram observado emagrecimento dos animais, esplenomegalia moderada (Grupo L e M) a severa (Grupo N e O), moderada hepatomegalia e congestão do órgão. Ademais, foi possível observar processos inflamatórios nos fígados de aves dos grupos M, N e O (Figura 21). Já aos 7 dpi, uma ave do grupo L (SG $\Delta mgtC$ – Oral) apresentava hepatomegalia moderada e, tanto as demais desse grupo quanto todas do grupo M (SG $\Delta mgtC$ – Subcutâneo), tinham o quadro severo dessa alteração. Além disso, havia processos inflamatórios nos parênquimas de fígado e baço em diferentes graus nos animais de ambos os grupos. Já as aves inoculadas com a estirpe selvagem (N – Oral; O – Subcutâneo) foram observados hepatoesplenomegalia sugestivos de inflamação severa nesses órgãos em todos os animais (Figura 20).

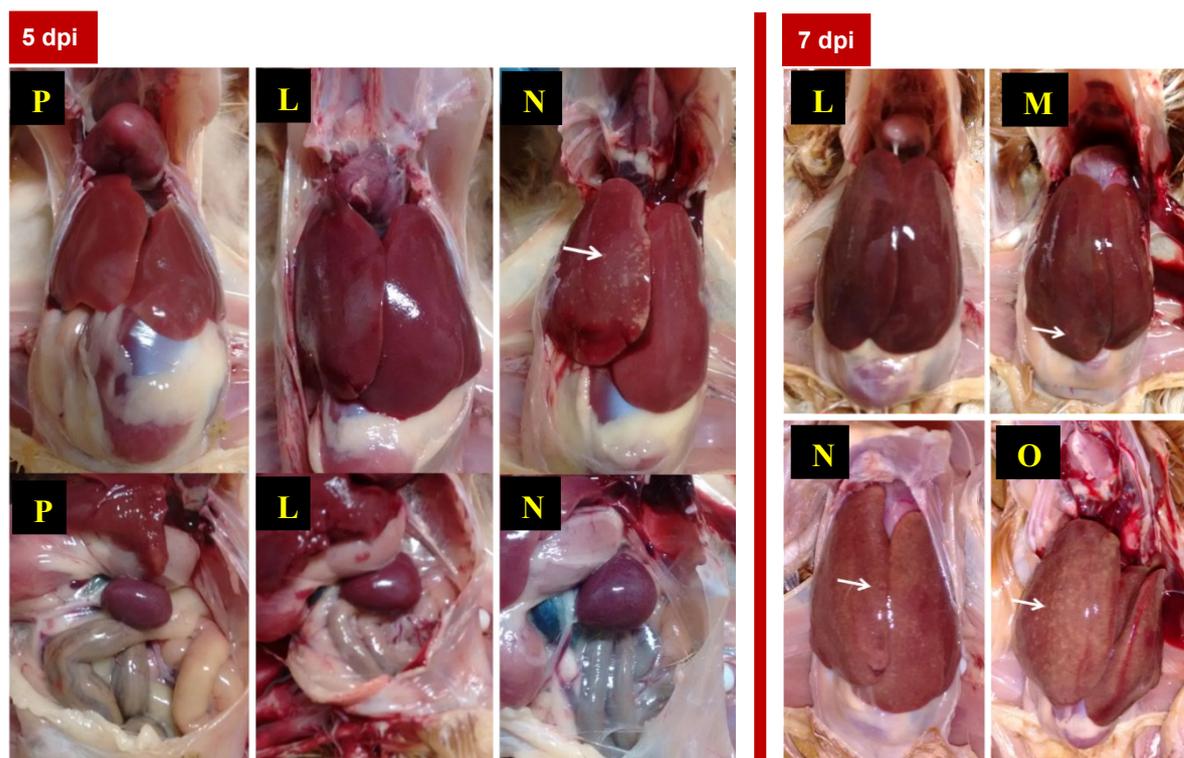


Figura 20. Aos 5 dpi, notar hepatomegalia nas aves dos grupos L e N em comparação ao controle negativo (Grupo P), além da presença de focos inflamatórios na superfície subcapsular hepática (seta branca) e esplênica do Grupo N. Ademais, houve esplenomegalia moderada (Grupo L) e severa (Grupo N). Já aos 7 dpi, os processos inflamatórios foram mais evidentes na superfície subcapsular do órgão (setas brancas) nas aves desafiadas com SG (Grupos N e O) do que nas desafiadas com SG $\Delta mgtC$ (Grupos L e M).

A severidade das lesões foi agravada aos 10 dpi (Figura 21). A perda de massa peitoral foi evidente nos animais desafiados (setas brancas - Figura 21), sendo possível observar hepatomegalia antes mesmo de incisar e acessar a cavidade celômica (setas pretas - Figura 21). Hepatoesplenomegalia, processos inflamatórios nos parênquimas de fígado e baço e colorações variando de bronzeado claro a escuro foram achados em comum entre as aves desafiadas, independente da estirpe inoculada. Hidropericárdio foi observado em uma única ave do Grupo O (SG – Subcutâneo). Apesar das alterações serem aparentemente menos severas nos grupos desafiados por SG $\Delta mgtC$ até o 7º dpi, as contagens de células viáveis entre ambas (UFC/g de órgão) não diferiram estatisticamente ($P > 0,05$) independente do órgão e do dia de colheita (Figura 22). Entretanto, foi observado por meio da regressão que as contagens de SG foram superiores na fase aguda da infecção e com picos antecipados em relação aos grupos infectados com SG $\Delta mgtC$.

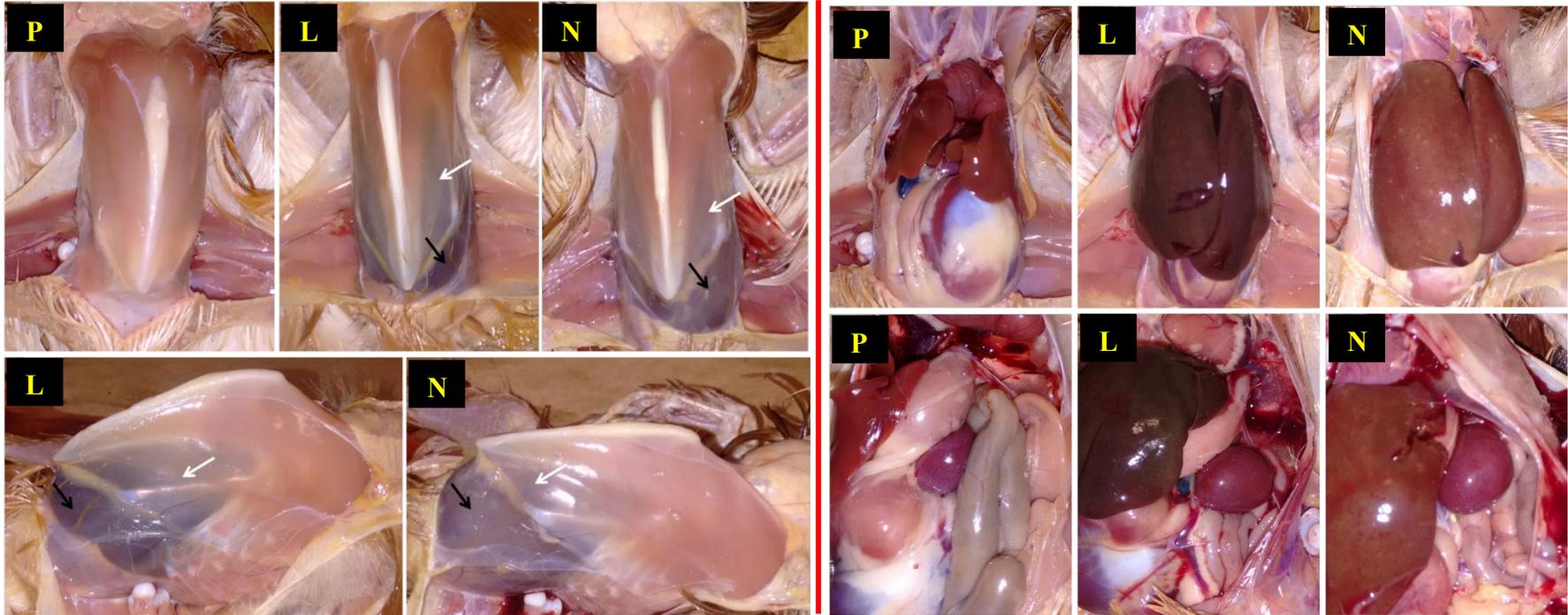


Figura 21. Aos 10 dpi, observar as massas musculares peitorais (setas brancas) e hepatomegalia (setas pretas) das aves inoculadas oralmente com as estirpes mutante (Grupo L) e selvagem (Grupo N). Aves não inoculadas (Grupo P) apresentavam bom desenvolvimento muscular e não tiveram alterações hepáticas e esplênicas. Notar perda de musculatura, hepatoesplenomegalia, alteração na coloração do fígado e presença de focos brancos nas superfícies subcapsular hepática (hepatite) e esplênica (esplenite) de aves desafiadas (Grupos L e N).

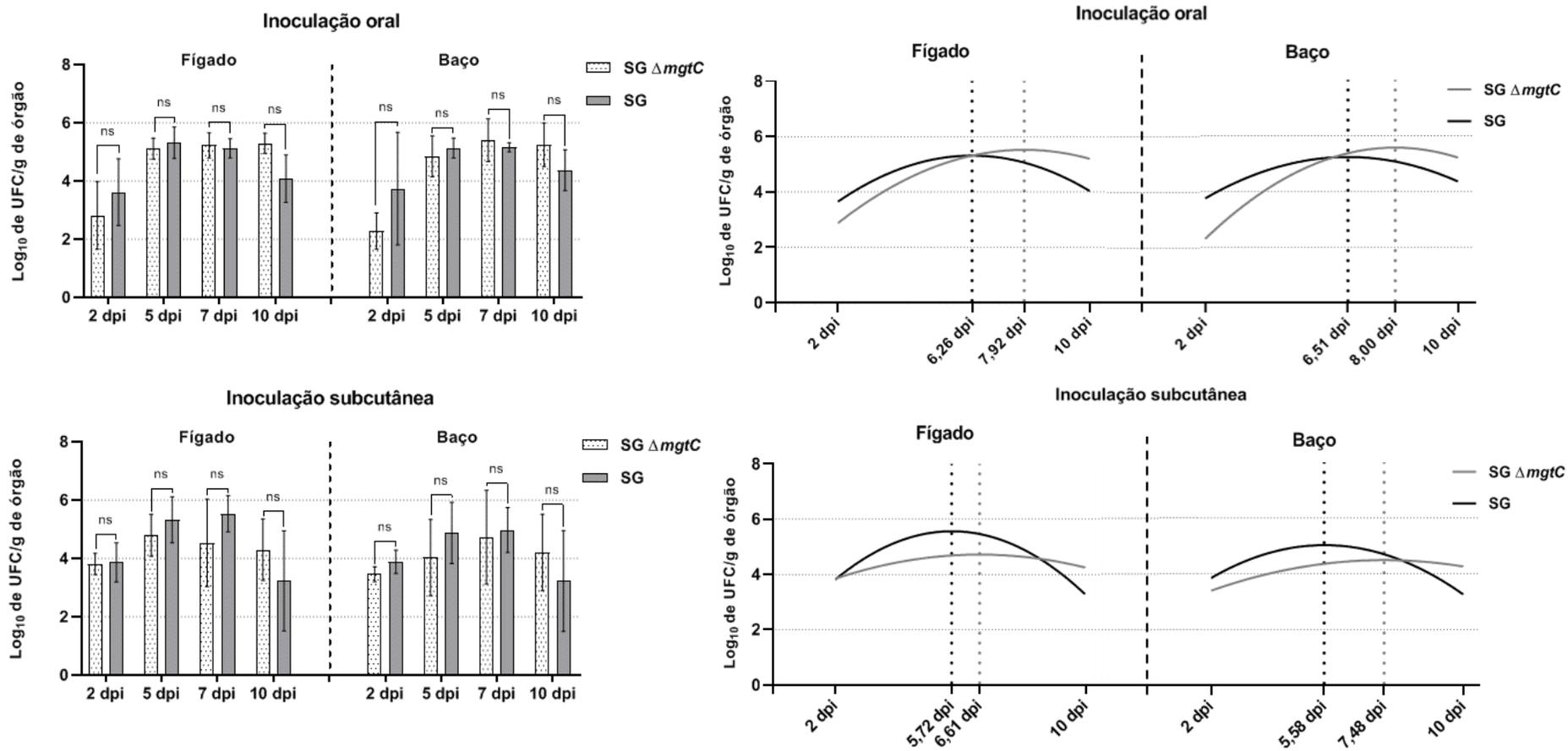


Figura 22. Contagem de células viáveis de SG $\Delta mgtC$ e SG em fígado e baço e curvas polinomiais das mesmas. ns, diferenças não-significativas ($P > 0,05$).

Quando compara-se o número de células viáveis de SG independente da via de administração e do órgão analisado, observa-se que as contagens não foram influenciadas entre um dia de colheita e o seguinte ($P > 0,05$). Entretanto, na fase inicial da infecção por SG $\Delta mgtC$ houve aumento significativo ($P < 0,05$) de células viáveis em fígado e baço de 2 para 5 dpi após desafio oral (Tabela 22).

Tabela 22. Interação do tempo com a contagem de células viáveis de SG $\Delta mgtC$ e SG em órgãos após diferentes vias de inoculação.

Interação (dpi)	Inoculação oral				Inoculação subcutânea				
	Fígado		Baço		Fígado		Baço		
	Diferença*	Valor de P	Diferença*	Valor de P	Diferença*	Valor de P	Diferença*	Valor de P	
SG $\Delta mgtC$	2 x 5	2,29	0,047	2,57	0,018	0,99	0,667	0,57	0,972
	5 x 7	0,12	0,994	0,55	0,913	-0,26	>0,999	0,70	0,928
	7 x 10	0,07	>0,999	-0,147	0,999	-0,24	>0,999	-0,52	0,982
SG	2 x 5	1,70	0,380	1,40	0,801	1,46	0,055	0,99	0,725
	5 x 7	-0,19	0,943	0,03	>0,999	0,21	>0,999	0,10	>0,999
	7 x 10	-1,04	0,348	-0,79	0,424	-2,31	0,317	-1,75	0,147

* Diferença de células viáveis em Log_{10} de UFC/g de órgão

5.7. Mensuração de citocinas por RT-qPCR

Durante a determinação da eficiência dos iniciadores, obteve-se eficiências de amplificação (%E) variando entre 85,3 e 101,3 % e coeficientes de correlação (r^2) maiores do que 0,985 (Tabela 23). Dos cinco genes de referência candidatos, apenas aquele referente à β -actina (ACTB) foi excluído da etapa seguinte por apresentar eficiência de amplificação abaixo de 90 %. Todos os genes de referência aqui testados apresentaram-se abaixo do ponto-de-corte de 0,5 no Normfinder e de 1,5 no geNorm. Em ambos os *softwares* foi indicada a combinação de GAPDH e rRNA 28S baseando-se nos valores de estabilidade de 0,045 (Normfinder) e 0,957 (geNorm).

Tabela 23. Informações de amplificação para análise da expressão gênica relativa por RT-qPCR.

	Gene	Eficiência de amplificação (%E)	Coefficiente de correlação (r^2)	Slope	y-intercept	Temperatura de melting (°C)
Genes de referência	GAPDH	100,0 %	0,997	- 3,321	28,541	81,0 °C
	rRNA 28S	101,3 %	0,997	- 3,292	22,263	83,0 °C
	UB	95,3 %	0,989	- 3,439	28,058	83,0 °C
	HPRT	91,6 %	0,995	- 3,542	34,018	77,5 °C
	ACTB*	85,3 %	0,989	- 3,733	26,721	82,5 °C
Genes-alvo	LITAF	95,3 %	0,989	-3,440	32,837	84,5 °C
	IFN- γ	91,3 %	0,985	-3,550	39,187	80,0 °C

*Não foi considerado candidato a gene normalizador devido à eficiência de amplificação estar fora do nível aceitável ($90 \% \leq \%E \leq 110 \%$).

A expressão do mRNA relativo ao LITAF (Figura 23) induzida tanto por SG quanto por SG $\Delta mgtC$ diferiu ($P < 0,05$) do grupo controle negativo (CN) aos 2 e 5 dpi em tonsilas cecais e baço, com redução ao longo do processo infeccioso. Já o mRNA relativo ao IFN- γ (Figura 23) foi mais expresso ($P < 0,05$) aos 5 dpi nas aves infectadas. Aos 7 dpi, essa diferença ($P < 0,05$) só foi observada entre o grupo infectado com SG $\Delta mgtC$ e o CN em tonsilas cecais. Não foram observadas diferenças na expressão de ambas as citocinas entre as aves infectadas por SG e SG $\Delta mgtC$.

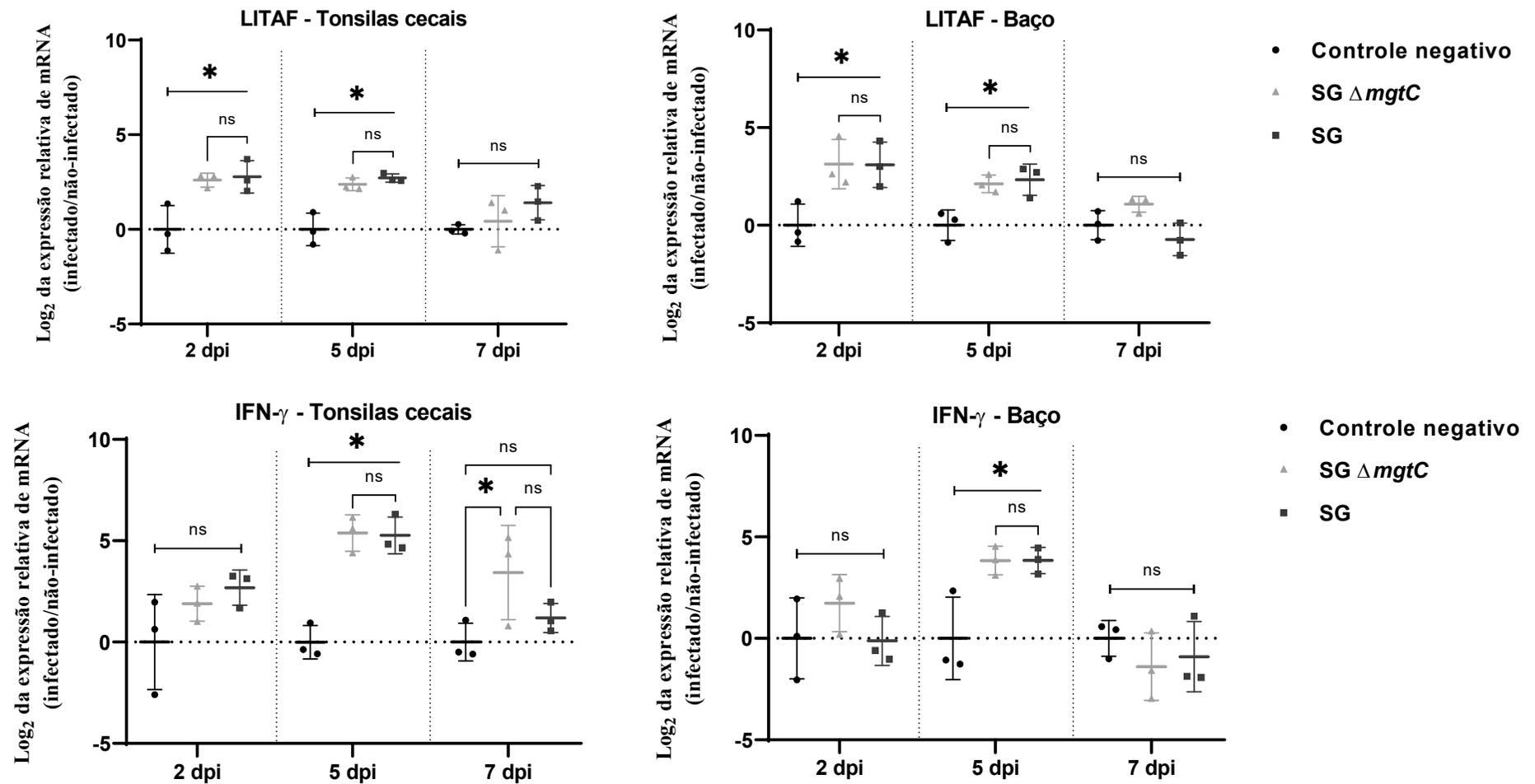


Figura 23. Níveis de expressão de mRNA relativo às citocinas LITAF e IFN- γ em baço e tonsilas cecais de aves não-infectadas e inoculadas oralmente com SG $\Delta mgtC$ e SG. *, estatisticamente diferente ($P < 0,05$); ns, diferenças estatísticas não-significativas ($P > 0,05$).

5.8. Contagem da população de macrófagos, CD4⁺ e CD8⁺

A população de macrófagos foi significativamente maior ($P < 0,05$) nos grupos infectados por ambas as estirpes (SG $\Delta mgtC$ e SG) em comparação ao grupo controle negativo (CN) após 2 dpi e 5 dpi em tonsilas cecais e fígado, respectivamente. Essa diferença não foi observada ($P > 0,05$) aos 10 dpi em ambos os órgãos. Ademais, não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre os grupos infectados.

Já as contagens de linfócitos T CD8⁺ foram mais elevadas aos 2 ($P = 0,0079$) e 5 ($P = 0,0018$) dpi em tonsilas cecais e aos 5 ($P = 0,038$) e 7 ($P = 0,0456$) dpi em fígado de aves inoculadas com SG $\Delta mgtC$ em relação ao CN. Além disso, a diferença do grupo inoculado com SG foi maior em comparação com CN aos 2 dpi ($P = 0,0007$) em tonsilas cecais e aos 2 ($P = 0,0038$) e 5 ($P = 0,0154$) dpi em fígado. Comparando-se SG e SG $\Delta mgtC$, o primeiro induziu maior ($P < 0,05$) população de CD8⁺ em fígado aos 2 dpi em comparação aos outros dois grupos. Esse cenário inverteu-se aos 5 dpi com aumento da população de CD8⁺ resultante da infecção por SG $\Delta mgtC$ ($P < 0,05$).

Não houve diferença ($P > 0,05$) na população de CD4⁺ devido a infecção por ambas as estirpes de SG. Nesses grupos foi possível observar a redução de CD4⁺ a partir de 5 dpi. Por outro lado, a concentração desse linfócito em aves do CN foi estatisticamente inferior ($P < 0,05$) a de aves infectadas com SG $\Delta mgtC$ aos 2, 5 e 7 dpi em tonsilas cecais e aos 5 e 7 dpi em fígado. Ademais, também diferiu ($P < 0,05$) de animais inoculados com SG aos 2 e 5 dpi em tonsilas cecais e aos 5 e 7 dpi em fígado. Imagens das imunomarcações de macrófagos e de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ estão disponíveis nas Figuras 24, 25 e 26, respectivamente. Os resultados das contagens das populações de células imunes estão presentes na Figura 27.

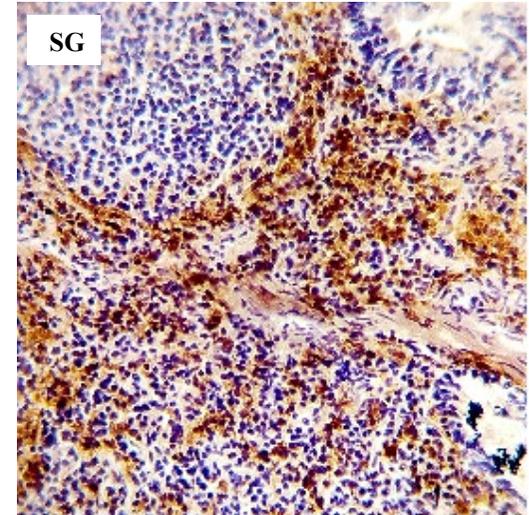
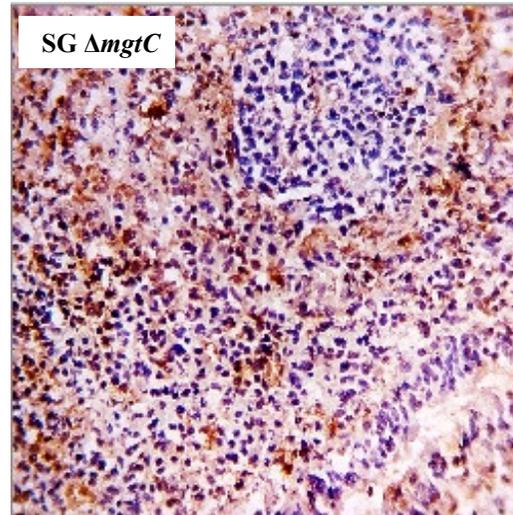
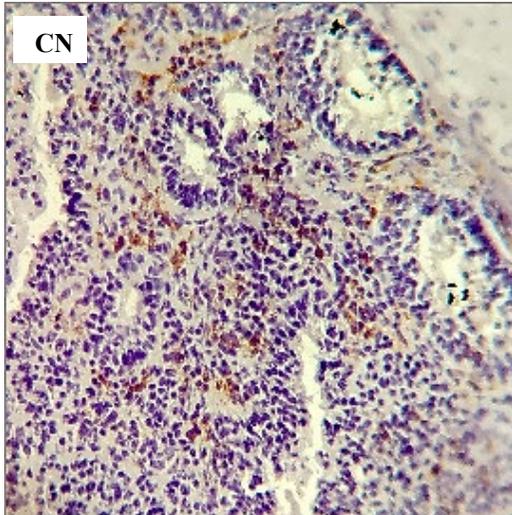
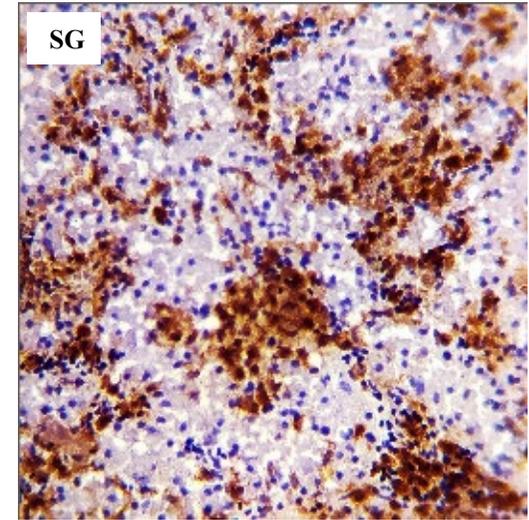
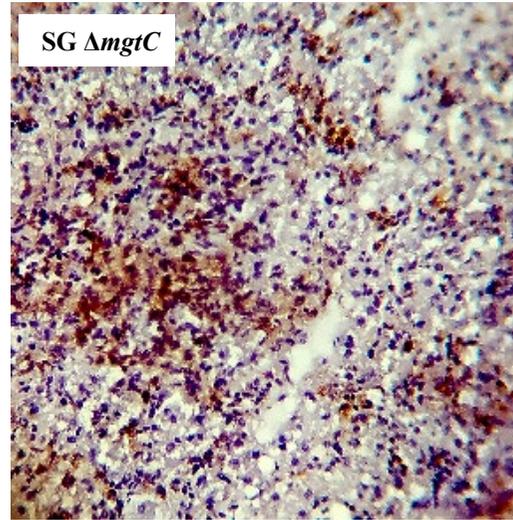
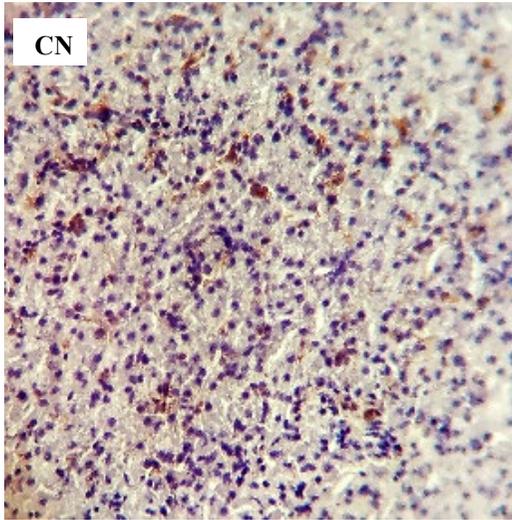


Figura 24. Secções de fígado (acima) aos 5 dpi e tonsilas cecais (abaixo) aos 7 dpi com imunomarcção de macrófagos (marrom) de aves não-infectadas (CN) ou inoculadas oralmente com SG $\Delta mgtC$ ou SG. Imagens registradas em objetiva de 40x.

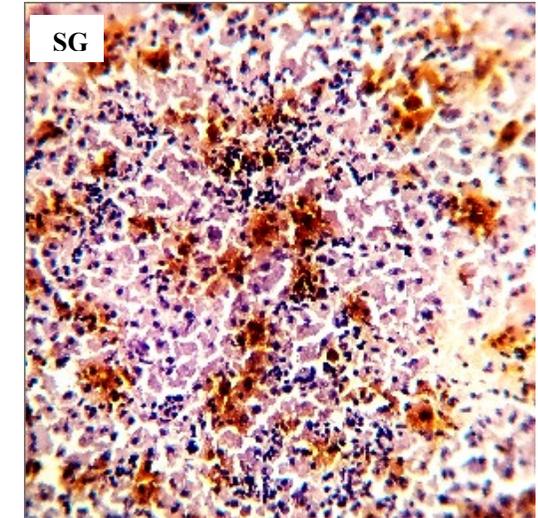
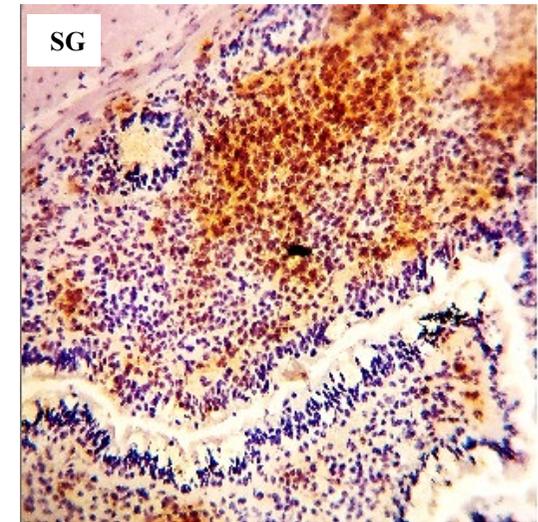
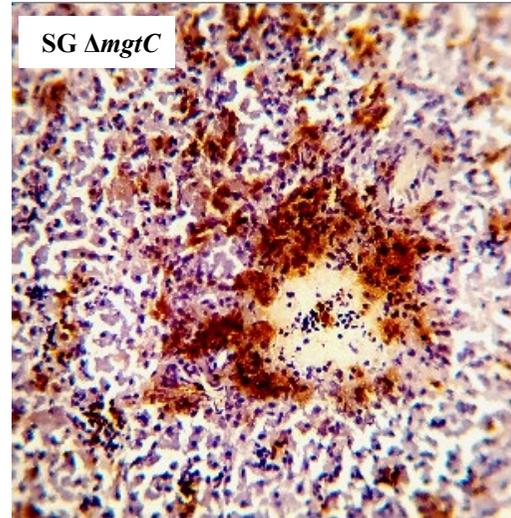
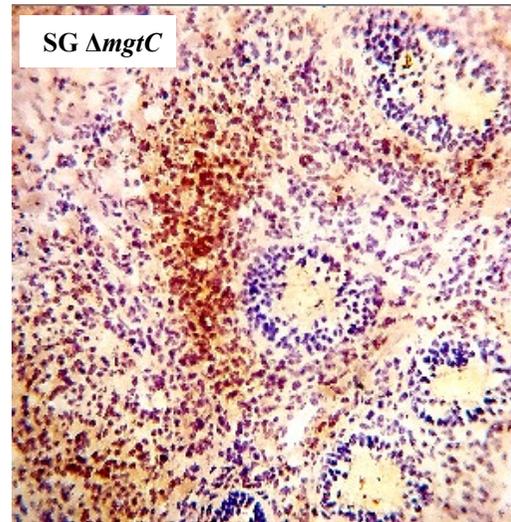
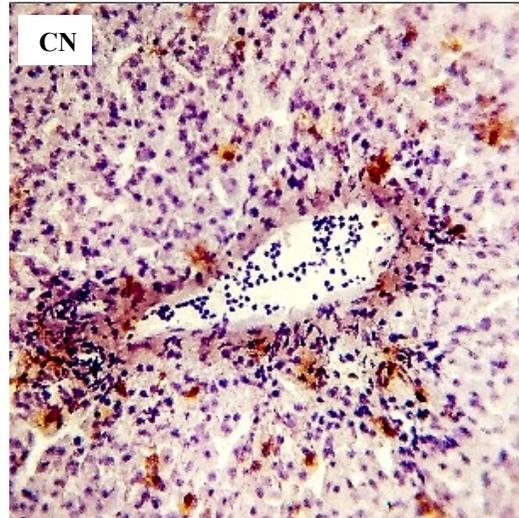
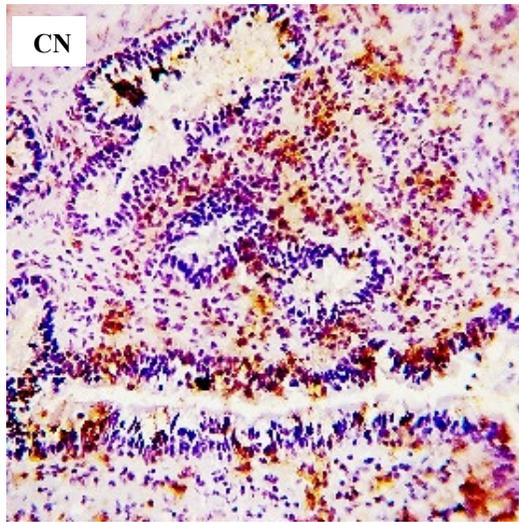


Figura 25. Secções de tonsilas cecais (acima) aos 2 dpi e fígado (abaixo) aos 7 dpi com imunomarcagem de linfócitos T CD8⁺ (marrom) de aves não-infectadas (CN) ou inoculadas oralmente com SG Δ mgtC ou SG. Imagens registradas em objetiva de 40x.

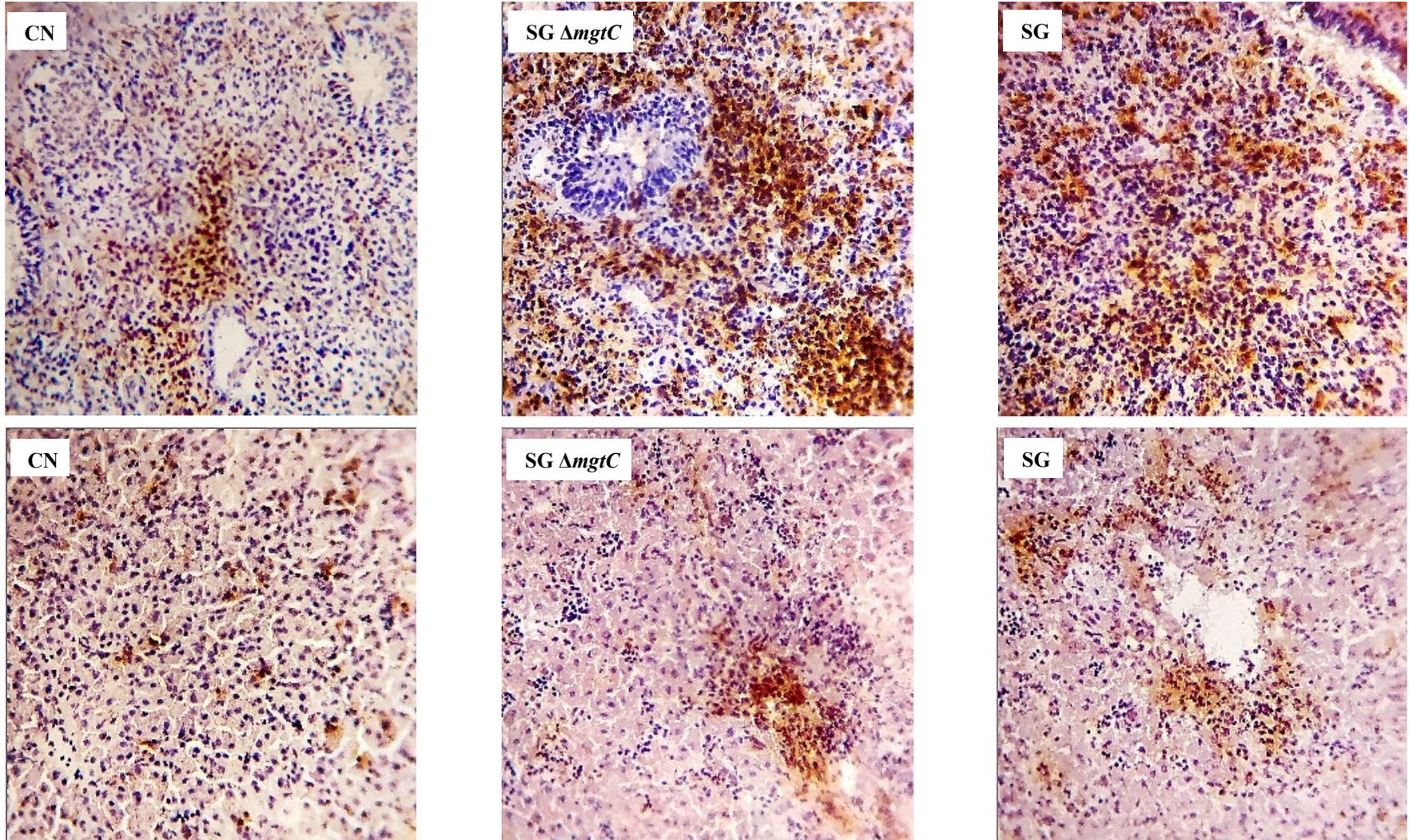


Figura 26. Secções de tonsilas cecais (acima) e fígado (abaixo) aos 7 dpi com imunomarcacão de linfócitos T CD4⁺ (marrom) de aves não-infectadas (CN) ou inoculadas oralmente com SG $\Delta mgtC$ ou SG. Imagens registradas em objetiva de 40x.

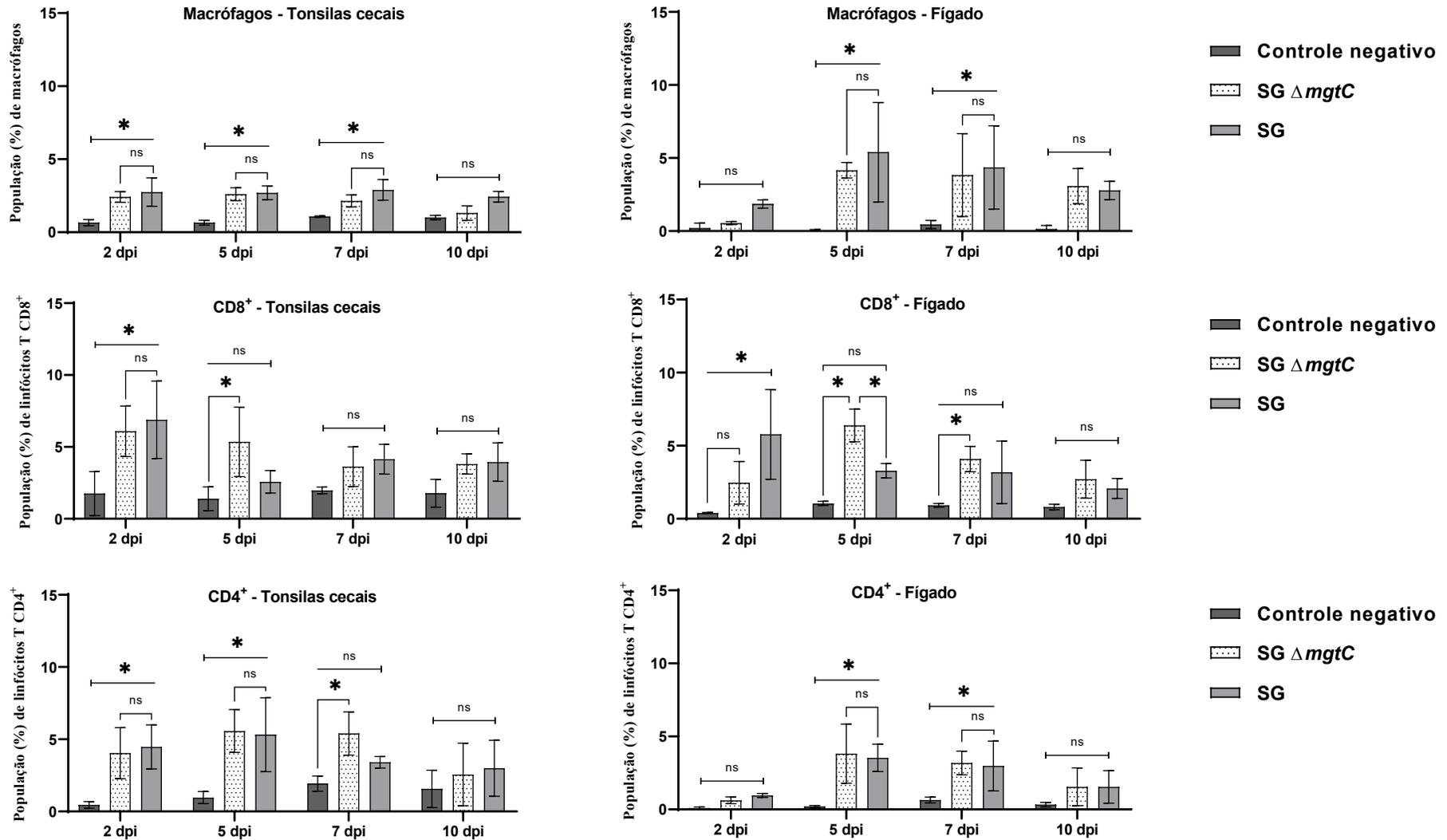


Figura 27. População de macrófagos, CD8⁺ e CD4⁺ em tonsilas cecais e fígado de aves não-infectadas ou inoculadas oralmente com SG Δ mgtC ou SG. *, estatisticamente diferente ($P < 0,05$); ns, diferenças estatísticas não-significativas ($P > 0,05$).

6. DISCUSSÃO

Salmonella Gallinarum biovar *Gallinarum* (SG) causa o tifo aviário, doença de curso agudo e que provoca alta mortalidade (Chappell et al., 2009; Freitas Neto et al., 2020). Durante a infecção sistêmica, a bactéria sobrevive no interior de células fagocíticas (Wigley et al., 2002). Para adaptar-se a esse ambiente intracelular hostil em camundongos, *Salmonella Typhimurium* transcreve o gene *mgtC*, cuja ausência compromete sua patogenicidade (Blanc-Potard e Groisman, 1997; Lee e Lee, 2015; Choi et al., 2017a; Choi et al., 2019; Yeom et al., 2020). Tendo em vista o exposto acima, hipotetizou-se que a deleção do gene *mgtC* atenuaria SG em aves devido a importância da interação do patógeno com células fagocíticas.

Primeiramente, conduziu-se um experimento para mimetizar o ambiente hostil acidificado e com baixa concentração de Mg^{2+} do interior dos macrófagos. Essas variações são detectadas pelo sistema PhoP/PhoQ que, por sua vez, ativa a expressão de *MgtC* (Retamal et al., 2009; Lee e Groisman, 2012a; Lee e Lee, 2015). Observou-se que somente a acidificação não afetou a multiplicação de SG $\Delta mgtC$ (Figura 13b). Mesmo que *MgtC* não seja um transportador de Mg^{2+} , sua expressão é necessária para a multiplicação bacteriana em meio contendo baixas concentrações desse cátion (Groisman et al., 2013). Um dos mecanismos de patogenicidade da bactéria depende da inibição da proteína F_1F_0 ATP Sintetase (Lee et al., 2013) para reduzir o influxo de H^+ e a produção excessiva de ATP, o qual possui alta afinidade em se ligar ao pouco Mg^{2+} livre no citosol (Lee et al., 2013; Lee e Lee, 2015). Dessa forma, os resultados aqui encontrados poderiam ser explicados pelo fato de que o caldo nutriente LB fornece as quantidades adequadas de Mg^{2+} tanto para o metabolismo basal quanto para a multiplicação bacteriana (Pontes et al., 2015b; Pontes et al., 2016) e que, mesmo que *MgtC* seja expresso em baixo pH, a elevada produção de ATP encontra-se em equilíbrio fisiológico com a alta quantidade de Mg^{2+} disponível.

Já a combinação entre a acidificação e a baixa concentração de Mg^{2+} reduz a multiplicação de SG $\Delta mgtC$ após 13 horas (Figura 14b). Somente o pouco Mg^{2+} foi capaz de reduzir o número de células viáveis de *Salmonella Typhi* contendo a deleção de *mgtC* em meio limitante (Retamal et al., 2009). Assim, quando esse cátion está em baixas concentrações é necessária a ação de *MgtC* e, portanto, um mutante incapaz

de expressá-la não conseguiria atingir o equilíbrio fisiológico entre ATP e Mg^{2+} , afetando sua multiplicação. Isso poderia atrasar a multiplicação bacteriana em macrófagos, conforme observado no presente estudo.

Durante a infecção de células semelhantes aos macrófagos da linhagem HD11 e de macrófagos primários derivados de monócitos do sangue periférico de galinhas, observou-se que a deleção de *mgtC* não influenciou na fagocitose de SG assim como relatado anteriormente em *Salmonella* Typhimurium sem os genes *mgtCB* (Smith et al., 1998). Notou-se que o número de células viáveis de SG $\Delta mgtC$ foi estatisticamente menor em relação à estirpe selvagem em HD11 desde 4 hpi até o término do estágio tardio da infecção. Além disso, aumentou-se a quantidade de SG com 4 hpi enquanto o mutante obteve taxas de sobrevivência inferiores (Figura 15b). Alguns estudos, utilizando células imortalizadas, demonstraram que na fase inicial da infecção com 2 hpi (Retamal et al., 2009) e 5 hpi (Yeom et al., 2018) já havia menores quantidades de *Salmonella* com *mgtC* defectivo no ambiente intracelular. Contudo, esse fenótipo não foi observado em macrófagos primários uma vez que mesmo com reduzida sobrevivência de SG $\Delta mgtC$ a partir de 4 hpi, o número de células viáveis só foi estatisticamente inferior no estágio tardio da infecção (20 hpi; Figura 16b). Entretanto, independente da linhagem celular, houve menor quantidade de SG $\Delta mgtC$ em relação à estirpe selvagem no estágio tardio, assim como reportado por estudos envolvendo STM $\Delta mgtC$ (Lee et al., 2013; Pontes et al., 2015a; Yeom et al., 2018; Park et al., 2019). Dessa forma, os resultados do presente estudo foram consistentes com os anteriores.

Apesar do exposto acima, foram notadas diferenças no controle da infecção pelas linhagens celulares. Os monócitos U937 são células imortalizadas que se diferenciam em macrófagos (Patruno et al., 2015) e *MgtC* de ST é necessário para a infecção inicial (2 hpi) e tardia (24 hpi) dessas células (Retamal et al., 2009). Vale ressaltar que as infecções em células para o estudo do gene *mgtC* são comumente realizadas em células imortalizadas (Retamal et al., 2009; Lee et al., 2013; Pontes et al., 2015a; Yeom et al., 2018). Esse tipo celular, assim como HD11, são facilmente cultivados, mas podem não apresentar as funções de uma célula normal e expressar padrões gênicos únicos não encontrados *in vivo* (Carter e Shieh, 2015). Como exemplo, HD11 não reduz a multiplicação de traquizoítos de *Toxoplasma gondii*,

enquanto macrófagos primários de aves conseguem controlar (Malkwitz et al., 2018). Portanto, os resultados oriundos das infecções em macrófagos primários nos fornecem o fenótipo próximo ao que acontece *in vivo*.

Curiosamente, considerando que a proteína *MgtC* é altamente sintetizada no ambiente intramacrófago (Srikumar et al., 2015), a literatura pouco elucidada a citotoxicidade de mutantes *mgtC*. *Pseudomonas aeruginosa* contendo a deleção desse gene provocou níveis reduzidos de lise celular (Belon et al., 2015; Garai et al., 2019) devido à expressão de níveis inferiores de genes do TTSS (Garai et al., 2019). Em *Salmonella*, o TTSS da SPI-2 (TTSS-2) promove a sobrevivência bacteriana (Jones et al., 2001; Li et al., 2009) e morte celular (Li et al., 2009). Adicionalmente, sua ação resulta na morte de macrófagos primários derivados de leucócitos do sangue periférico de galinhas durante o estágio inicial da infecção por *Salmonella* Enteritidis (Li et al., 2009). Em contradição com os estudos utilizando *P. aeruginosa*, não foi observada correlação entre *mgtC* e a lise celular, tendo em vista que SG $\Delta mgtC$ e SG apresentaram os mesmos níveis de citotoxicidade nos estágios iniciais e tardios das infecções de macrófagos (Figura 17). Semelhantemente, a lise por STM $\Delta mgtC$ não diferiu da estirpe selvagem (Yeom et al., 2018). Mesmo se *mgtC* interferisse na produção das proteínas do TTSS-2 em SG, foi demonstrado que a ausência de genes constituintes desse sistema de secreção não interfere na morte celular (Jones et al., 2001). Dessa forma, estudos devem ser conduzidos para elucidar o mecanismo citolítico provocado por SG.

Ao avaliar a exigência de *mgtC* para a patogenia do tifo aviário, verificou-se que não houve diferença de invasividade por meio da contagem de células viáveis de SG e SG $\Delta mgtC$ em fígado e baço. Por outro lado, o gene é expresso durante a colonização intestinal de *Salmonella* (Harvey et al., 2011) e pode ser necessário para a infecção inicial (Retamal et al., 2009). Essa diferença pode ser devido ao fato de que um pequeno RNA transatante (*trans-acting small RNA*) do locus *mgtCBR* cumpre papel na presença do flagelo (Choi et al., 2017b; Miranda-CasoLuengo et al., 2017) e a ausência de proteínas constituintes dessa estrutura reduzem a colonização intestinal em aves e a captura por macrófagos de sorovores do paratifo aviário (Freitas Neto et al., 2013; Olsen et al., 2013; Barbosa et al., 2017). Ademais, a expressão de flagelos por SG (SG Fla⁺) permite a colonização o intestino de aves e maior invasividade em

células CKC (Freitas Neto et al., 2013). Portanto, é possível que a ausência de *mgtC* teria pouco efeito na patogenia inicial do tifo aviário uma vez que SG é aflagelado (Kaiser et al., 2000) e não coloniza eficientemente o intestino (Setta et al., 2012; Rychlik et al., 2014).

Observou-se que as aves inoculadas com ambas as estirpes desenvolveram os mesmos sinais clínicos, porém foram mais tardios naquelas infectadas com SG $\Delta mgtC$. Ademais, a ausência do gene não afetou o número total de óbitos para SG ($P = 0,1967$; Tabela 19) como ocorreu para STM (Blanc-Potard e Groisman, 1997; Choi et al., 2017a; Choi et al., 2019). Entretanto, houve diferença ($P = 0,0104$) no tempo necessário para que as aves viessem a óbito (Figura 18). O uso do método Gehan-Breslow-Wilcoxon (Machin et al., 2006) para avaliação das curvas de mortalidade permitiu inferir que as aves inoculadas com a estirpe selvagem vieram a óbito mais precocemente do que aquelas desafiadas com SG $\Delta mgtC$.

A ausência de *mgtC* atenuou discretamente a bactéria, visto que para causar 50% de mortalidade (DL50) foram necessárias aproximadamente 1,35 Log₁₀ de UFC/mL mais bactérias da estirpe mutante (6,94 Log₁₀ de UFC/mL) em relação à estirpe selvagem (Tabela 20). A DL50 da estirpe selvagem (5,59 Log₁₀ de UFC/mL) foi semelhante à *Salmonella Gallinarum* 9 (5,20 Log₁₀ de UFC/mL) descrita por Berchieri et al. (2001). Ao nosso conhecimento, não há estudos que elucidem a DL50 envolvendo mutantes *mgtC*, mas Blanc-Potard e Groisman (1997) calcularam que 40 a 50 % dos camundongos inoculados com *Salmonella Typhimurium* com deleção dos genes *mgtCB* sobreviveram a doses de 15 a 150 vezes a DL50 da estirpe selvagem.

Salmonella Gallinarum provoca anemia e septicemia (Freitas Neto et al., 2007; Chappell et al., 2009) e a resposta imune associada à infecção varia de acordo com a patogenicidade da estirpe (Chappell et al., 2009), além da idade e da linhagem da ave (Wigley et al., 2005; Penha Filho et al., 2016; Batista et al., 2018; Psifidi et al., 2018; Huang et al., 2019). Nesse cenário, a imunidade celular é de suma importância para conter o processo infeccioso e eliminar o microrganismo (Chappell et al., 2009). LITAF e IFN- γ promovem a atração e ativação de macrófagos, respectivamente (Setta et al., 2012; Pati et al., 2013). No presente estudo, essas citocinas foram expressas em níveis mais elevados ($P < 0,05$) em comparação ao controle negativo, mas não diferiram entre aves desafiadas com SG e SG $\Delta mgtC$ (Figura 23). Isso reforça o

achado de população semelhante de macrófagos entre esses dois grupos infectados ($P > 0,05$). Em estudo prévio, foi demonstrado que a expressão de ambas citocinas por CD8⁺ não foram influenciadas pela multiplicação intracelular de STM (Sad et al., 2008).

Geralmente, as bactérias têm a habilidade de reduzir sua multiplicação e direcionar o *status* metabólico para tolerar ou persistir sob mudanças ambientais. *MgtC* tem papel crucial na homeostase de ATP para garantir a persistência do patógeno (Lee et al., 2013). Como exemplo, no quadro tifóide causado por *Salmonella* Dublin em bovinos da raça Holandesa houve redução da persistência de mutante com depleção de *mgtC* no quarto dia pós-infecção (Pullinger et al., 2007). Por outro lado, a deleção do gene não afetou a persistência de SG em fígado e baço, mas ao analisar-se as curvas polinomiais, pode-se observar uma menor quantidade de SG Δ *mgtC* nos primeiros dias pós-infecção e uma menor quantidade não-significativa ($P > 0,05$) de macrófagos em baço (Figura 22).

Linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) e auxiliares (CD4⁺) são importantes no controle da infecção sistêmica por *Salmonella* spp. (Lopez-Medina et al., 2014; Lopes et al., 2016; Penha Filho et al., 2016). Observou-se que houve maior ($P < 0,05$) população de linfócitos T CD8⁺ induzidos por SG selvagem na fase inicial da infecção (2 dpi; Figura 27). Em estudo prévio também utilizando aves susceptíveis ao tifo aviário, a patogenicidade da estirpe pode estar relacionada com maior indução dessa célula de defesa (Lopes et al., 2016). Comparando-se a estirpe selvagem de SG com um mutante expressando flagelo (SG Fla⁺), o segundo provocou lesões menos intensas, menor mortalidade e menos infiltrados de CD8⁺ (Lopes et al., 2016). Outro estudo demonstrou que *Salmonella* Typhimurium selvagem induziu a resposta de células T CD8⁺ mais intensas, porém menos funcionais do que as induzidas por estirpes atenuadas e com baixa taxa de multiplicação intramacrofágica (Sad et al., 2008). Apesar de ter ocorrido a indução de linfócitos T CD4⁺ por SG Δ *mgtC* e SG em comparação ao grupo controle, não houve diferença entre os grupos infectados (Figura 27). Esses linfócitos possuem papel central no controle da infecção aguda por patógenos intracelulares (Green, DiFazio, Flynn, 2013) e, assim como *Natural Killers* e macrófagos, secretam IFN- γ e participam do *clearance* bacteriano (Lapaque et al., 2009; Green, DiFazio, Flynn, 2013; Lopes et al., 2016). O aumento da multiplicação

do patógeno no ambiente intracelular promove uma persistência elevada na apresentação de antígenos e consequente resposta defectiva de linfócitos T CD8⁺ (Sad et al., 2008), cuja exaustão é evitada pela ação de células CD4⁺ no controle de patógenos (Lu et al., 2021).

A deleção de *mgtC* não atenuou SG, mas reduziu a proliferação bacteriana intramacrofágica. A baixa multiplicação de estirpes sem esse gene (Retamal et al., 2009; Lee, Choi e Groisman, 2014) possivelmente limita a apresentação de peptídeos de antígenos, resultando no atraso da resposta mediada por linfócitos T (Luu et al., 2006; Sad et al., 2008). Mesmo assim, SG Δ *mgtC* demonstrou-se capaz de evadir o sistema imune da ave ao induzir um pico de citocinas pro-inflamatórias e causar alta mortalidade com a redução da expressão das citocinas e das células de defesa (Wigley et al., 2002; Garcia et al., 2013; Penha Filho et al. 2016; Lopes et al., 2016) aqui mensuradas ao longo do tempo.

Entretanto, mesmo com aumento da população de CD4⁺ e CD8⁺ durante a infecção sistêmica inicial, ambos linfócitos T foram reduzidos com a agravamento do quadro clínico do tifo aviário, fato também observado anteriormente (Lopes et al., 2016; Penha Filho et al., 2016). Durante a fase aguda da infecção, SG causa efeito citopático de leucócitos, provocando lise celular e consequente liberação bacteriana ao meio extracelular (Garcia et al., 2009). Considerando a baixa sobrevivência de SG Δ *mgtC* em macrófagos após 20 hpi e semelhante taxa de citotoxicidade em comparação a SG, pode-se inferir que menos células bacterianas são liberadas de modo a realizar a disseminação célula-a-célula (Mastroeni e Grant, 2011). Além disso, debris de LPS de SG acumulam-se rapidamente nos tecidos (Buxton e Davies, 1963). Dessa forma, as ações citolítica e citopática (Buxton e Allan, 1963; Freitas Neto et al., 2020) desencadeiam quadro de leucopenia (Freitas Neto et al., 2007; Garcia et al., 2009), que tem sido correlacionado com os óbitos no tifo aviário (Garcia et al., 2009).

Baseando-se em outros patógenos, uma desregulação dos mecanismos que controlam a sinalização por TLR hiperativa as células do hospedeiro pelos debris bacterianos, resultando em choque séptico. Assim, uma inflamação excessiva pode resultar em morte (Medvedev et al., 2006). Aves resistentes às salmoneloses sistêmicas são capazes de limitar a multiplicação do patógeno e eliminá-lo, desenvolvendo resposta imune adaptativa (Wigley et al., 2002). Por outro lado, aves

susceptíveis não controlam a multiplicação bacteriana, resultando em doença e elevadas taxas de mortalidade (Wigley et al., 2002). Observamos que entre 2 e 5 dpi houve uma influência do tempo na fase aguda da infecção por SG $\Delta mgtC$ após desafio oral. A baixa concentração da bactéria mutante demandou mais tempo para atingir elevados picos. Possivelmente, menos endotoxinas de SG $\Delta mgtC$ acumularam-se nos tecidos no estágio inicial da infecção, o que resultaria no atraso dos sinais clínicos, choque séptico e óbitos.

O gene *mgtC* foi necessário para a patogênese do tifo aviário, mas não se mostrou um fator de virulência primordial para a patogenicidade de SG tendo em vista a importância da via sistêmica para o patógeno. Previamente, a deleção de toda a SPI-3 de *Salmonella* Enteritidis não afetou a virulência do patógeno em aves (Rychlik et al., 2009). Assim, os achados no presente estudo possivelmente ocorreram pela dependência da resposta das aves às salmoneloses sistêmicas ser maior pela expressão do *locus* *SAL1* (Psifidi et al., 2018), relacionado à resposta oxidativa (Wigley et al., 2002), do que pelo gene *Nramp1*, associado ao balanço de Mg^{2+} no SCV (Cunrath e Bumann, 2019) e necessário à resistência em outras categorias animais (Wigley, 2004; Cunrath e Bumann, 2019), mesmo que *Nramp1* possua algum efeito na doença sistêmica (Wigley, 2004). Portanto, no presente estudo, a ausência do gene *mgtC* alterou a patogênese do tifo aviário, mas sua presença não demonstrou ser essencial para a patogenicidade de *Salmonella* Gallinarum em aves susceptíveis como foi descrito em outros sorovares de *Salmonella* infectando distintos hospedeiros.

7. CONCLUSÃO

Nas condições em que o estudo foi conduzido, conclui-se que:

- O gene *mgtC* de *Salmonella* Gallinarum é importante sob condições antimicrobianas como a acidificação e a privação de magnésio encontrados no ambiente intramacrófago uma vez que sua deleção afeta a multiplicação do patógeno em meio nutriente;

- A ausência do gene afeta a multiplicação de *Salmonella* Gallinarum em macrófagos de aves, mas só reduz as contagens microbianas na fase tardia da infecção sem alterar os níveis de citotoxicidade;

- *Salmonella* Gallinarum contendo a deleção de *mgtC* (SG Δ *mgtC*) foi isolada nas mesmas quantidades em fígado e baço de aves susceptíveis ao tifo aviário que a estirpe selvagem. Entretanto, o acúmulo bacteriano na fase inicial da infecção sistêmica é aparentemente menor, o que resultou em maior DL50 e óbitos tardios, sem afetar a mortalidade final. Assim, a ausência de *mgtC* afetou a patogênese do tifo aviário;

- Tanto SG Δ *mgtC* como SG provocaram os mesmos níveis de expressão gênica de LITAF e IFN- γ em aves susceptíveis, além de semelhante recrutamento de macrófagos e linfócitos T CD4⁺. Por outro lado, o aumento na população de linfócitos T CD8⁺ resultante da infecção por SG foi mais prematuro em relação àquele causado por SG Δ *mgtC*. Ainda assim, ambas estirpes provocaram a redução dessas células de defesa, fazendo com que os animais sucumbissem ao tifo aviário;

- O gene *mgtC* não demonstrou ser essencial para a patogenicidade de *Salmonella* Gallinarum em aves susceptíveis como foi descrito em outros sorovares de *Salmonella* infectando mamíferos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alix E, Blanc-Potard AB (2008) Peptide-assisted degradation of the *Salmonella* MgtC virulence factor. **EMBO J** 27: 546-557. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7601983>>.

Alix E, Miki T, Felix C, Rang C, Figueroa-Bossi N, Demettre E, Blanc-Potard AB (2008) Interplay between MgtC and PagC in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Microbial Pathogenesis** 45: 236-40. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2008.06.001>>.

Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer research** 64: 5245-5250.

Assoku RKG, Penhale WJ (1974) The pathogenesis of fowl typhoid: The influence of anaemia and erythrocyte clearance on the susceptibility of the fowl to bacterial endotoxin. **Journal of Comparative Pathology** 84: 443-453. Disponível em: <[https://dx.doi.org/10.1016/0021-9975\(74\)90037-1](https://dx.doi.org/10.1016/0021-9975(74)90037-1)>.

Baptista DQ, Santos, AFM, Aquino, MHC, Abreu DLC, Rodrigues DP, Nascimento ER, Pereira VG (2018) Prevalência e susceptibilidade antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de frangos vivos e carcaças no estado do Rio de Janeiro. **Brazilian Journal of Veterinary Research** 37: 1278-1285. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5289>>.

Barbosa FO, Freitas Neto OC, Batista DFA, Almeida AM, Rubio MS, Rodrigues Alves LB, Vasconcelos RO, Barrow PA, Berchieri Junior A (2017) Contribution of flagella and motility to gut colonisation and pathogenicity of *Salmonella* Enteritidis in the chicken. **Brazilian Journal of Microbiology** 48: 754-759. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2017.01.012>>.

Barbosa FO, Freitas Neto OC, Rodrigues Alves LB, Benevides VP, de Souza AIS, Rubio MS, Almeida AM, Saraiva MMS, de Oliveira CJB, Olsen JE, Berchieri Junior, A (2021) Immunological and bacteriological shifts associated with a flagellin-hyperproducing *Salmonella* Enteritidis mutant in chickens. **Brazilian Journal of Microbiology** 52: 419–429. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1007/s42770-020-00399-7>>.

Barrow PA, Huggins MB, Lovell MA (1994) Host specificity of *Salmonella* infection in chickens and mice is expressed *in vivo* primarily at the level of the reticuloendothelial system. **Infection and immunity**, 62: 4602–4610. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/iai.62.10.4602-4610.1994>>.

Batista DFA, de Freitas Neto OC, Lopes PD, de Almeida AM, Barrow PA, Berchieri A. (2013) Polymerase Chain Reaction assay based on *ratA* gene allows differentiation between *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovars Gallinarum

and Pullorum. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** 25: 259-262. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1177/1040638713479361>>.

Batista DFA, Freitas Neto OC, Almeida AM, Maboni G, Carvalho TF, Carvalho TP, Barrow PA, Berchieri Junior A (2018) Evaluation of pathogenicity of *Salmonella* Gallinarum strains harbouring deletions in genes whose orthologues are conserved pseudogenes in *S. Pullorum*. **PLoS ONE** 13: e0200585. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0200585>>.

Belon C, Soscia C, Bernut A, Laubier A, Bleves S, Blanc-Potard AB (2015) A macrophage subversion factor is shared by intracellular and extracellular pathogens. **PLoS Pathogens**, 11: e1004969. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1004969>>.

Benevides VP, Rubio MS, Rodrigues Alves LB, Barbosa FO, Souza AIS, Almeida AM, Casas MRT, Guastalli EAL, Soares NM, Berchieri Junior, A (2020) Antimicrobial resistance in *Salmonella* serovars isolated from an egg-producing region in Brazil. **Brazilian Journal of Poultry Science** 22: eRBCA-2020-1259. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1590/1806-9061-2020-1259>>.

Berchieri Junior A, Murphy CK, Marston K, Barrow PA (2001) Observations on the persistence and vertical transmission of *Salmonella enterica* serovars Pullorum and Gallinarum in chickens: effect of bacterial and host genetic background. **Avian Pathology** 30: 221-231. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1080/03079450120054631>>.

Berndt A, Wilhem A, Jugert C, Pieper J, Sachse K, Methner U (2007) Chicken cecum immune response to *Salmonella enterica* serovars of different levels of invasiveness. **Infection and immunity**, 75: 5993–6007. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1128/IAI.00695-07>>.

Beug H, Kirchbach AV, Döderleina G, Conscience JF, Graf T (1979) Chicken hematopoietic cells transformed by seven strains of defective avian leukemia viruses display three distinct phenotypes of differentiation. **Cell** 18: 375-390. Disponível em: <[https://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(79\)90057-6](https://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(79)90057-6)>.

Blanc-Potard AB, Groisman EA (1997) The *Salmonella* selC locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. **EMBO J** 16: 5376-5385. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1093/emboj/16.17.5376>>.

Blanc-Potard AB, Lafay B (2003) *MgtC* as a horizontally-acquired virulence factor of intracellular bacterial pathogens: evidence from molecular phylogeny and comparative genomics. **Journal of Molecular Evolution** 57: 479–486. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1007/s00239-003-2496-4>>.

Brasil (2011) Diagnóstico laboratorial do gênero *Salmonella*. Ministério da Saúde. In: Ministério da Saúde; Secretaria de Vigilância em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz; Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz (Eds.). **Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp.**

Brasília: Ministério da Saúde p. 60. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/dezembro/15/manual-diagnostico-Salmonella-spp-web.pdf>>.

Brenner DJ, Farmer, JJ (2015) Enterobacteriaceae. In: Withman WB (Ed.). **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria** Hoboken: John Wiley & Sons, Inc, p. 1-24. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1002/9781118960608.fbm00222>>.

Brown RAM, Epis MR, Horsham JL, Kabir TD, Richardson KL, Leedman PJ (2018) Total RNA extraction from tissues for microRNA and target gene expression analysis: not all kits are created equal. **BMC Biotechnology** 18:1-11. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1186/s12896-018-0421-6>>.

Buchmeier N, Blanc-Potard AB, Ehrt S, Piddington D, Riley L, Groisman EA (2000) A parallel intraphagosomal survival strategy shared by *Mycobacterium tuberculosis* and *Salmonella enterica*. **Molecular Microbiology** 35: 1375–1382. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01797.x>>.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry** 55: 611-622. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>>.

Buxton A, Allan D (1963) Studies on immunity and pathogenesis of salmonellosis. I. Antigen-antibody reactions on circulating leucocytes of chickens infected with *Salmonella Gallinarum*. **Immunology** 6: 520-529. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1423347>>.

Buxton A, Davies JM (1963) Studies on immunity and pathogenesis of Salmonellosis. II. Antibody production and accumulation of bacterial polysaccharides in the tissues of chickens infected with *Salmonella gallinarum*. **Immunology** 6: 530-538. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1423337>>.

Carter M, Shieh J (2015) Cell Culture Techniques. In: Carter M, Shieh J (Eds.). **Guide to Research Techniques in Neuroscience**. Academic Press, p. 295-310.

Carver T, Thomson, N, Bleasby A, Berriman M, Parkhill J (2009) DNAPlotter: circular and linear interactive genome visualization. **Bioinformatics** 25:119–120. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btn578>>.

Carver T, Harris SR, Berriman M, Parkhill J, McQuillan JA (2012) Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. **Bioinformatics** 28:464-469. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btr703>>.

CDC (2016) **National Salmonella Surveillance Annual Report, 2013**. Atlanta: Centers For Disease Control And Prevention, p. 89.

Celis-Estupiñan, ALP, Batista, DFA, Cardoso, MV, Souza, AIS, Rodrigues Alves, LB, Almeida, AM, Barrow, PA, Berchieri Junior, A (2017) Further investigations on the epidemiology of fowl typhoid in Brazil, **Avian Pathology**, 46: 416-425. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1080/03079457.2017.1299922>>.

Chappell L, Kaiser P, Barrow P, Jones MA, Johnston C, Wigley P (2009) The immunobiology of avian systemic salmonellosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 128:53-9. <<https://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.10.295>>.

Choi E, Choi S, Nam D, Park S, Han Y, Lee J, Lee E (2017a) Elongation factor *P* restricts *Salmonella*'s growth by controlling translation of Mg²⁺ transporter gene during infection. **Scientific Reports** 7: 1-10. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1038/srep42098>>.

Choi E, Han Y, Cho YJ, Nam D, Lee EJ (2017b) A trans-acting leader RNA from a *Salmonella* virulence gene. **PNAS**, 114: 10232-10237. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1073/pnas.1705437114>>.

Choi S, Choi E, Cho Y, Nam D, Lee J, Lee E (2019) The *Salmonella* virulence protein *MgtC* promotes phosphate uptake inside macrophages. **Nature Communications** 10: 3326. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-11318-2>>.

Clements M, Eriksson S, Tezcan-Merdol D, Hinton JC, Rhen M (2001) Virulence gene regulation in *Salmonella enterica*. **Annals of Medicine** 33: 178-185. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.3109/07853890109002075>>.

Cunrath O, Bumann D (2019) Host resistance factor SLC11A1 restricts *Salmonella* growth through magnesium deprivation. **Science** 366: 995-999. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1126/science.aax7898>>.

Daniel WW, Cross CL (Eds.) (2013) **Biostatistics: A Foundation for Analysis in the Health Sciences**. New York: John Wiley & Sons, 960p.

Datsenko KA, Wanner BL (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 97: 6640-6645. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1073/pnas.120163297>>.

De Boever S, Vangestel C, De Backer P, Croubels S, Sys SU (2008) Identification and validation of housekeeping genes as internal control for gene expression in an intravenous LPS inflammation model in chickens. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 122: 312-317. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.12.002>>.

De Paiva JB, Sterzo EV, Ribeiro SA, Pereira EA, Berchieri Junior A (2006) Isolamento de *Salmonella*: comparação das etapas de pré-enriquecimento e enriquecimento direto de amostras de fezes armazenadas por 24 e 96 horas. **Arquivos do Instituto Biológico** 73: 263-269. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/uploads/docs/arq/v73_3/paiva.pdf>.

Eriksson S, Lucchini S, Thompson A, Rhen M, Hinton JC (2003) Unravelling the biology of macrophage infection by gene expression profiling of intracellular *Salmonella enterica*. **Molecular Microbiology** 47: 103-118. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03313.x>>.

Ernest RK, Guina T, Miller SI (1999) How intracellular bacteria survive: surface modifications that promote resistance to host innate immune responses. **Journal of Infectious Diseases** 179: S326-S330. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1086/513850>>.

Fan WQ, Wang HN, Zhang Y, Guan ZB, Wang T, Xu CW, Zhang AY, Yang X (2012) Comparative dynamic distribution of avian infectious bronchitis virus M41, H120, and SAIBK strains by quantitative real-time RT-PCR in SPF chickens. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry** 76: 2255-2260. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1271/bbb.120521>>.

Foster JW, Hall HK (1990) Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. **Journal of Bacteriology** 172: 771-778. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1128/jb.172.2.771-778.1990>>.

Freitas Neto OC, Arroyave W, Alessi AC, Fagliari JJ, Berchieri Junior A (2007) Infection of commercial laying hens with *Salmonella Gallinarum*: clinical, anatomopathological and haematological studies. **Brazilian Journal of Poultry Science** 9: 133-141. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1590/S1516-635X2007000200010>>.

Freitas Neto OC, Penha Filho RAC, Barrow P, Berchieri Junior (2010) Sources of human non-typhoid salmonellosis: a review. **Brazilian Journal of Poultry Science** 12: 1-11. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1590/S1516-635X2010000100001>>.

Freitas Neto OC, Setta A, Imre A, Bukovinski A, Elazomi A, Kaiser P, Berchieri Junior A, Barrow P, Jones M (2013) A flagellated motile *Salmonella Gallinarum* mutant (SG Fla⁺) elicits a pro-inflammatory response from avian epithelial cells and macrophages and is less virulent to chickens. **Veterinary Microbiology** 164: 425-433. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.04.015>>.

Freitas Neto OC, Penha Filho RAC, Berchieri Junior A (2020) Salmoneloses aviárias. In: Andreatti Filho RL, Berchieri Junior A, Silva EN, Back A, Di Fabio J, Zuanaze MAF (Eds.) **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, p. 495-518.

Galán JE (2001) *Salmonella* interactions with host cells: type III secretion at work. **Annual Review of Cell and Developmental Biology** 17:53-86. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1146/annurev.cellbio.17.1.53>>.

Garai P, Berry L, Moussouni M, Bleves S, Blanc-Potard AB (2019) Killing from the inside: Intracellular role of T3SS in the fate of *Pseudomonas aeruginosa* within macrophages revealed by *mgtC* and *oprF* mutants. **PLoS Pathogens** 15: e1007812. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1007812>>.

Garcia KO, Berchieri Junior A, Santana AM, Freitas Neto OC, Fagliari JJ (2009) Experimental infection of commercial layers using a *Salmonella enterica* serovar Gallinarum strain: Leukogram and serum acute-phase protein concentrations. **Brazilian Journal of Poultry Science**, 11: 263-267. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1590/S1516-635X2009000400008>>.

Garcia KO, Berchieri Junior A, Santana AM, Alarcon MFF, Freitas Neto OC, Fagliari JJ (2013) Experimental infection of commercial layers with wild or attenuated *Salmonella* Gallinarum mutante strains: anatomic pathology, total blood cell count and serum protein levels. **Brazilian Journal of Poultry Science**, 15: 91-104. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1590/S1516-635X2013000200004>>.

Gogoi M, Shreenivas MM, Chakravorty D (2019) Hoodwinking the big-eater to prosper: the *Salmonella*-macrophage paradigm. **Journal of Innate Immunity** 11: 289-299. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1159/000490953>>.

Gondwe EN, Molyneux ME, Goodall M, Graham SM, Mastroeni P, Dayson MT, MacLennan CA (2010) Importance of antibody and complement for oxidative burst and killing of invasive nontyphoidal *Salmonella* by blood cells in Africans. **PNAS** 107: 3070-3075. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1073/pnas.0910497107>>.

Grabenstein JP, Fukuto HS, Palmer LE, Bliska JB (2006) Characterization of phagosome trafficking and identification of PhoP-regulated genes important for survival of *Yersinia pestis* in macrophages. **Infection and immunity** 74: 3727–3741. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1128/IAI.00255-06>>.

Green AM, DiFazio R, Flynn JL (2013) IFN- γ from CD4 T cells is essential for host survival and enhances CD8 T cell function during *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Journal of immunology**, 190: 270–277. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1200061>>.

Grimont PAD, Grimont F, Bouvet, P (2000) Taxonomy of the Genus *Salmonella*. In: Wray C, Wray A. (Eds.) **Salmonella in Domestic Animals**. New York: CABI Publishing, p. 1-17.

Grimont PAD, Weill FX (Eds.) (2007) **Antigenic formulae of the Salmonella serovars**. Paris: Institut Pasteur, 166p.

Groisman EA, Hollands K, Kriner MA, Lee EJ, Park SY (2013) Bacterial Mg²⁺ homeostasis, transport, and virulence. **Annual Reviews of Genetics** 47: 625-646. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1146/annurev-genet-051313-051025>>.

Günzel D, Kucharski LM, Kehres DG, Romero MF, Maguire ME (2006) The *MgtC* virulence factor of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium activates Na(+),K(+)-ATPase. **Journal of Bacteriology**, 188: 5586–5594. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1128/JB.00296-06>>.

Harvey PC, Watson M, Hulme S, Jones MA, Lovell M, Berchieri Junior A, Young J, Bumstead N, Barrow PA. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colonizing the

lumen of the chicken intestine grows slowly and upregulates a unique set of virulence and metabolism genes. **Infection and Immunity** 79: 4105-4121. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1128/IAI.01390-10>>.

Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome Biology** 8: R19. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1186/gb-2007-8-2-r19>>.

Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST (Eds.) (1994) **Bergey's Manual of determinative Bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 787p.

Hu J, Bumstead N, Burke D, Ponce de León FA, Skamene E, Gros P, Malo D (1995). Genetic and physical mapping of the natural resistance-associated macrophage protein 1 (NRAMP1) in chicken. **Mammalian genome: official journal of the International Mammalian Genome Society**, 6: 809–815. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/BF00539010>>.

Huang K, Wang D, Frederiksen RF, Rensing C, Olsen JE, Fresno AH (2017) Investigation of the Role of Genes Encoding Zinc Exporters *zntA*, *zitB*, and *fieF* during *Salmonella* Typhimurium Infection. **Frontiers in Microbiology** 8: 1-11. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.02656>>.

Huang K, Fresno AH, Thøfner I, Skov S, Olsen JE (2019). Interaction-differences of the avian host-specific *Salmonella* serovar Gallinarum, the host-generalist *S.* Typhimurium, and the cattle host-adapted *S.* Dublin with chicken primary macrophage. **Infection and Immunity** 87: e00552-19. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1128/IAI.00552-19>>.

Imre A, Bukovinszki A, Lovell MA, Li Hongying L, Zhou X, Barrow PA (2013) Gene expression analysis of *Salmonella* enterica SPI in macrophages indicates differences between serovars that induce systemic disease from those normally causing enteritis. **Veterinary Microbiology** 167: 675-679 Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.07.034>>.

Issenhuth-Jeanjean S, Roggentin P, Mikoleit M, Guibourdenche M, De Pinna E, Nair S, Fields PI, Weill FX (2014) Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology** 165: 526-530. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2014.07.004>>.

Ito K, Akiyama Y (2005) Cellular functions, mechanism of action, and regulation of FtsH protease. **Annual Review of Microbiology** 59: 211–231. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.59.030804.121316>>.

Jones MA, Wigley P, Page KL, Julme SD, Barrow PA (2001) *Salmonella enterica* serovar Gallinarum requires the SPI 2 type III secretion system but not the SPI 1 type III secretion system for virulence in chickens. **Infection and Immunity** 69: 5471-5476. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1128/IAI.69.9.5471-5476.2001>>.

Kaiser P, Rothwell L, Galyov EE, Barrow PA, Burnside J, Wigley P (2000) Differential cytokine expression in avian cells in response to invasion by *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Gallinarum. **Microbiology** 146: 3217–3226. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1099/00221287-146-12-3217>>.

Kipper D, Carroll LM, Mascitti AK, Streck AF, Fonseca ASK, Ikuta N, Lunge VR (2020) Genomic characterization of *Salmonella* Minnesota clonal lineages associated with poultry production in Brazil. **Animals (Basel)** 10: 2043. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.3390/ani10112043>>.

Kuo CH, Ochman H (2010) The extinction dynamics of bacterial pseudogenes. **PLoS Genetics** 6: e1001050. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1001050>>.

Lambert WV, Knox CW (1932) Selection for resistance to fowl typhoid in the chicken with reference to its inheritance. **Research Bulletin** 12: 153.

Lapaque N, Walzer T, Meresse S, Vivier E, Trowsdale J (2009) Interactions between human NK cells and macrophages in response to *Salmonella* infection. **Journal of Immunology** 182: 4339–4348. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0803329>>.

Lavigne JP, O'Callaghan D, Blanc-Potard AB (2005) Requirement of *MgtC* for *Brucella suis* intramacrophage growth: a potential mechanism shared by *Salmonella enterica* and *Mycobacterium tuberculosis* for adaptation to a low-Mg²⁺ environment. **Infection and Immunity** 73: 3160–3163. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1128/IAI.73.5.3160-3163.2005>>.

Lawley TD, Chan K, Thompson LJ, Kim CC, Govoni GR, Monack DM (2006) Genome-wide screen for *Salmonella* genes required for long-term systemic infection of the mouse. **PLoS Pathogens** 2: e11. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020011>>.

Lee EJ, Groisman EA (2010) An antisense RNA that governs the expression kinetics of a multifunctional virulence gene. **Molecular Microbiology**, 76: 1020–1033. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07161.x>>.

Lee EJ, Groisman EA (2012a) Control of a *Salmonella* virulence locus by an ATP-sensing leader messenger RNA. **Nature** 486: 271–275. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1038/nature11090>>.

Lee EJ, Groisman EA (2012b) Tandem attenuators control expression of the *Salmonella mgtC* virulence operon. **Molecular Microbiology** 86: 212–224. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08188.x>>.

Lee EJ, Choi J, Groisman EA (2014) Control of a *Salmonella* virulence operon by proline-charged tRNA^(Pro). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 111, 3140–3145. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.1316209111>>.

Lee EJ, Pontes MH, Groisman EA (2013) A Bacterial Virulence Protein Promotes Pathogenicity by Inhibiting the Bacterium's Own F1Fo ATP Synthase. **Cell** 154: 146-156. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.004>>.

Lee JW, Lee EJ (2015) Regulation and function of the *Salmonella* MgtC virulence protein. **Journal of Microbiology** 53: 667-672. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1007/s12275-015-5283-1>>.

Li S, Zhang Z, Pace L, Lillehoj H, Zhang S (2009) Functions exerted by the virulence-associated type-three secretion systems during *Salmonella enterica* serovar Enteritidis invasion into and survival within chicken oviduct epithelial cells and macrophages. **Avian Pathology**. 38: 97–106. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1080/03079450902737771>>.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods** 25: 402–408. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1006/meth.2001.1262>>.

Lopes PD, Freitas Neto OC, Batista DF, Denadai J, Alarcon MF, Almeida AM, Vasconcelos RO, Setta A, Barrow PA, Berchieri Junior A (2016) Experimental infection of chickens by a flagellated motile strain of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovar Gallinarum. **Veterinary Journal**, 214, 40–46. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.05.006>>.

Lopez-Medina M, Perez-Lopez A, Alpuche-Aranda C, Ortiz-Navarrete V (2014) *Salmonella* modulates B cell biology to evade CD8⁺ T cell-mediated immune responses. **Frontiers in Immunology** 5: 1-9. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2014.00586>>.

Lu YJ, Barreira-Silva P, Boyce S, Powers J, Cavallo K, Behar SM (2021) CD4 T cell help prevents CD8 T cell exhaustion and promotes control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Cell reports**, 36: 109696. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109696>>.

Luu RA, Gurnani K, Dudani R, Kammara R, van Faassen H, Sirard JC, Krishnan L, Sad S (2006) Delayed expansion and contraction of CD8⁺ T cell response during infection with virulent *Salmonella* Typhimurium. **The Journal of Immunology** 177: 1516–25. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.177.3.1516>>.

Machin D, Cheung YB, Parmar M (Eds.) (2006) **Survival Analysis: A Practical Approach**. Wiley, 278p.

Malkwitz I, Berndt A, Dauschies A, Bangoura B (2018) Characterisation of susceptibility of chicken macrophages to infection with *Toxoplasma gondii* of type II and III strains. **Experimental Parasitology**, 187: 22-29. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2018.03.003>>.

Maloney KE, Valvano MA (2006) The *mgtC* gene of *Burkholderia cenocepacia* is required for growth under magnesium limitation conditions and intracellular survival in

macrophages. **Infection and Immunity** 74: 5477–5486. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1128/IAI.00798-06>>.

Marcus SL, Brumell JH, Pfeifer CG, Finlay BB (2000) *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. **Microbes and Infection** 2: 145-156. Disponível em: <[https://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)00273-2](https://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00273-2)>.

Mariani P, Barrow PA, Cheng HH, Groenen MA, Negrini R, Nat Bumstead (2001) Localization to chicken Chromosome 5 of a novel locus determining salmonellosis resistance. **Immunogenetics** 53: 786–791. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1007/s00251-001-0387-7>>.

Marmur, J (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. **Journal of Molecular Microbiology** 3:208-218. Disponível em: <[https://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836\(61\)80047-8](https://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(61)80047-8)>.

Martin-Orozco N, Touret N, Zaharik ML, Park E, Kopelman R, Miller S, Finlay BB, Gros P, Grinstein S (2006) Visualization of vacuolar acidification-induced transcription of genes of pathogens inside macrophages. **Molecular Biology of the Cell**, 17: 498–510. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1091/mbc.e04-12-1096>>.

Mastroeni P, Grant AJ (2011) Spread of *Salmonella enterica* in the body during systemic infection: unravelling host and pathogen determinants. **Expert Reviews in Molecular Medicine** 13: e12. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/S1462399411001840>>.

Medvedev AE, Sabroe I, Hasday JD, Vogel SN (2006) Tolerance to microbial TLR ligands: molecular mechanisms and relevance to disease. **Journal of Endotoxin Research**, 12: 133-150. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1179/096805106X102255>>.

Menck K, Behme D, Pantke M, Reiling N, Binder C, Pukrop T, Klemm F (2014) Isolation of human monocytes by double gradient centrifugation and their differentiation to macrophages in teflon-coated cell culture bags. **Journal of Visualized Experiments** 91: e51554. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.3791/51554>>.

Métris A, Sudhakar P, Fazekas D, Demeter A, Ari E, Olbei M, Branchu P, Kingsley RA, Baranyi J, Korcsmáros T (2017) SalmoNet, an integrated network of ten *Salmonella enterica* strains reveals common and distinct pathways to host adaptation **NPJ Systems Biology and Applications** 3: 31. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1038/s41540-017-0034-z>>.

Miranda-CasoLuengo AA, Kary SC, Erhardt M, Kröger C. Small RNA, Big Effect: Control of Flagellin Production (2017) **Trends in Microbiology**, 25: 953-954. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2017.10.003>>.

Moncrief MB, Maguire ME (1998) Magnesium and the role of *MgtC* in growth of *Salmonella* Typhimurium. **Infection and Immunity** 66: 3802-3809. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1128/IAI.66.8.3802-3809.1998>>.

Motulsky HJ (2022a) Normality (and lognormality) tests. **GraphPad Statistics Guide**. Disponível em: <https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/statistics/stat_normality_tests.htm>.

Motulsky HJ (2022b) Bonferroni and Sidak methods. **GraphPad Statistics Guide**. Disponível em: <https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/statistics/stat_the_method_of_bonferroni.htm>.

Moussouni M, Nogaret P, Garai P, Ize B, Vivès E, Blanc-Potard AB (2019) Activity of a synthetic peptide targeting *MgtC* on *Pseudomonas aeruginosa* intramacrophage survival and biofilm formation. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology** 9: 1-10. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2019.00084>>.

Ochman H, Wilson AC (1987) Evolution in bacteria: evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. **Journal of Molecular Evolution** 26:74-86.

OIE (2021) **World Animal Health Information Database (WAHIS) Interface: Disease Information**. World Organisation for Animal Health. Disponível em: <https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail>.

Oliveira GH, Berchieri Junior A, Fernandes AC (2005) Experimental infection of laying hens with *Salmonella enterica* serovar Gallinarum. **Brazilian Journal of Microbiology** 36: 51-56. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822005000100011>>.

Olsen JE, Hoegh-Andersen KH, Casadesús J, Rosenkrantz JT, Chadfield MS, Thomsen LE (2013) The role of flagella and chemotaxis genes in host pathogen interaction of the host adapted *Salmonella enterica* serovar Dublin compared to the broad host range serovar S. Typhimurium. **BMC Microbiology** 13: 1-11. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-13-67>>.

Owen KA, Meyer CB, Bouton AH, Casanova JE (2014) Activation of Focal Adhesion Kinase by *Salmonella* Suppresses Autophagy via an Akt-mTOR Signaling Pathway and Promotes Bacterial Survival in Macrophages. **PLoS Pathogens** 10: e1004159. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1004159>>.

Owen KA, Anderson CJ, Casanova JE (2016) *Salmonella* Suppresses the TRIF-Dependent Type I Interferon response in macrophages. **MBio** 7: e02051-15. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1128/mBio.02051-15>>.

Park M, Kim H, Nam D, Kweon DH, Shin D (2019) The *mgtCBR* mRNA Leader Secures Growth of *Salmonella* in Both Host and Non-host Environments. **Frontiers in Microbiology** 6: 1-12. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.02831>>.

Pati NB, Vishwakarma V, Selvaraj SK, Dash S, Saha B, Singh N, Suar M (2013) *Salmonella* Typhimurium TTSS-2 deficient mig-14 mutant shows attenuation in immunocompromised mice and offers protection against wild-type *Salmonella* Typhimurium infection. **BMC Microbiology** 13: 236. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-236>>.

Patruno A, Fornasari E, Di Stefano A, Cerasa LS, Marinelli L, Baldassarre L, Sozio P, Turkez H, Franceschelli S, Ferrone A, Di Giacomo V, Speranza L, Felaco M, Cacciatore I (2015) Synthesis of a novel cyclic prodrug of S-allyl-glutathione able to attenuate LPS-induced ROS production through the inhibition of MAPK pathways in U937 cells. **Molecular Pharmaceutics** 12: 66-74. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1021/mp500431r>>.

Penha Filho RAC, Diaz SJA, Medina TS, Chang YF, Silva JS, Berchieri Junior (2016) Evaluation of protective immune response against fowl typhoid in chickens vaccinated with the attenuated strain *Salmonella Gallinarum* $\Delta cobS\Delta cbiA$. **Research in Veterinary Science** 107: 220-227. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.06.011>>.

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**. 29: e45. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>>.

Pfaffl MW (2006) Relative quantification. In: Dorak T (Ed.) **Real Time PCR BIOS Advanced Methods**. New York, Taylor & Francis, p. 63–82.

Pontes MH, Lee EJ, Choi J, Groisman EA (2015a) *Salmonella* promotes virulence by repressing cellulose production. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 112: 5183–5188. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.1500989112>>.

Pontes MH, Sevostyanova A, Groisman EA (2015b) When too much ATP is bad for protein synthesis. **Journal of Molecular Biology** 427: 2586–2594. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.06.021>>.

Pontes MH, Yeom J, Groisman EA (2016) Reducing ribosome biosynthesis promotes translation during low Mg^{2+} stress. **Molecular Cell** 64: 480-492. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.008>>.

Popoff MY, Bockmühl J, Brenner FW, Gheesling LL (2001) Supplement 2000 (no. 44) to the Kauffmann-White scheme. **Research in Microbiology** 152:907-909. Disponível em: <[https://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01274-8](https://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01274-8)>.

Poppe C (2000) *Salmonella* Infections in the Domestic Fowl. In: Wray C, Wray A (Eds.) **Salmonella in Domestic Animals**. UK: CAB International, p. 107-132.

Psifidi A, Russell KM, Matika O, Sánchez-Molano E, Wigley P, Fulton JE, Stevens MP, Fife MS (2018) The Genomic Architecture of Fowl Typhoid Resistance in Commercial Layers. **Frontiers in Genetics** 9: 1-11. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.3389/fgene.2018.00519>>.

Pullinger GD, Paulin SM, Charleston B, Watson PR, Bowen AJ, Dziva F, Morgan E, Villarreal-Ramos B, Wallis TS, Stevens MP (2007) Systemic Translocation of *Salmonella enterica* Serovar Dublin in Cattle Occurs Predominantly via Efferent Lymphatics in a Cell-Free Niche and Requires Type III Secretion System 1 (T3SS-1)

but Not T3SS-2. **Infection and Immunity**, 75: 5191-5199. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1128/IAI.00784-07>>.

Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RHL, Moorman AFM (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, 339: 62-66. Disponível em: <[https://dx.doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)01423-4](https://dx.doi.org/10.1016/S0304-3940(02)01423-4)>.

Ramhøj L, Axelstad M, Svingen T (2019) Validation of endogenous reference genes in rat cerebral cortex for RT-RT-qPCR analyses in developmental toxicity studies. **Peer J**, 7: e7181. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.7717/peerj.7181>>.

Rang C, Alix E, Felix C, Heitz A, Tasse L, Blanc-Potard AB (2007) Dual role of the *MgtC* virulence factor in host and non-host environments. **Molecular Microbiology**, 63: 605-622. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05542.x>>.

Reed LJ, Muench H (1938) A simple method of estimating fifty per cent endpoints. **The American Journal of Hygiene** 27: 493-497. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>>.

Retamal P, Castillo-Ruiz M, Mora GC (2009) Characterization of *MgtC*, a virulence factor of *Salmonella* enterica Serovar Typhi. **PLoS One** 4: e5551. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0005551>>.

Rodrigues Alves LB (2017) **Patogenicidade de *Salmonella Gallinarum* com deleção dos genes *phoP* e *phoQ* ($SG\Delta phoPQ$) em aves comerciais**. 84 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Unesp, Jaboticabal.

Rodrigues Alves LB, Neto OCF, Batista DFA, Barbosa FO, Rubio MS, de Souza AIS, Almeida AM, Barrow PA, Junior AB (2018) Inactivation of *phoPQ* genes attenuates *Salmonella Gallinarum* biovar Gallinarum to susceptible chickens. **Brazilian Journal of Microbiology** 49: 601-609. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2017.09.006>>.

Rychlik I, Karasova D, Sebkova A, Volf J, Sisak F, Havlickova H, Kummer V, Imre A, Szmolka A, Nagy B (2009) Virulence potential of five major pathogenicity islands (SPI-1 to SPI-5) of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis for chickens. **BMC Microbiology** 9: 1-9. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-9-268>>.

Rychlik I, Elsheimer-Matulova M, Kyrova K (2014) Gene expression in the chicken caecum in response to infections with non-typhoid *Salmonella*. **Veterinary Research** 45: 119-133. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1186/s13567-014-0119-2>>.

Sad S, Dudani R, Gurnani K, Russell M, van Faassen H, Finlay B, Krishnan L (2008) Pathogen proliferation governs the magnitude but compromises the function of CD8 T cells. **The Journal of Immunology** 180: 5853–5861. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.180.9.5853>>.

Salmonella Subcommittee (1932) The Genus *Salmonella* Lignières, 1900. **The Journal of Hygiene** 34: 333-350.

Sambrook J, Russel DW (2001) **Molecular Cloning**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cap. 6, p. 6.1-6.62.

Setta AM, Barrow PA, Kaiser P, Jones MA (2012) 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** 35: 397-410. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2012.03.004>>.

Silva CA, Blondel CJ, Quezada CP, Porwollik S, Andrews-Polymenis HL, Toro CS, Zaldivar M, Contreras I, McClelland M, Santiviago CA (2012) Infection of mice by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis involves additional genes that are absent in the genome of serovar Typhimurium. **Infection and Immunity** 80: 839–849. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1128/IAI.05497-11>>.

Smith AL, Beal R (2008) The avian enteric immune system in health and disease. In: Davison F, Kaspers B, Schat KA (Ed.). **Avian Immunology** Londres: Academic Press, p.243-271.

Smith RL, Kaczmarek MT, Kucharski LM, Maguire ME (1998) Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: regulation of *mgtA* and *mgtCB* during invasion of epithelial and macrophage cells. *Microbiology (Reading)* 144: 1835-1843. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1099/00221287-144-7-1835>>.

Srikumar S, Kröger C, Hébrard M, Colgan A, Owen SV, Sivasankaran SK, Cameron AD, Hokamp K, Hinton JC (2015) RNA-seq Brings New Insights to the Intra-Macrophage Transcriptome of *Salmonella Typhimurium*. **PLoS Pathogens** 11: e1005262. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1005262>>.

Sundaram VK, Sampathkumar NK, Massaad C, Grenier J (2019) Optimal use of statistical methods to validate reference gene stability in longitudinal studies. **PLoS One** 14: e0219440. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0219440>>.

Tang Y, Foster N, Jones MA, Barrow PA (2018) Model of persistent *Salmonella* infection: *Salmonella enterica* serovar Pullorum modulates the immune response of the chicken from a TH17-type response towards a TH2-type response. **Infection and Immunity** 86:e00307-18. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1128/IAI.00307-18>>.

Tao T, Snaveley MD, Farr SG, Maguire ME (1995) Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: *mgtA* encodes a P-type ATPase and is regulated by Mg²⁺ in a manner similar to that of the *mgtB* P-type ATPase. **Journal of Bacteriology**, 177: 2654-2662. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1128/jb.177.10.2654-2662.1995>>.

Taylor SC, Nadeau K, Abbasi M, Lachance C, Nguyen M, Fenrich J (2019) The ultimate RT-qPCR experiment: producing publication quality, reproducible data the first time. **Trends in Biotechnology** 37: 761-774. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.12.002>>.

Thompson JA, Liu M, Helaine S, Holden DW (2011) Contribution of the PhoPQ regulon to survival and replication of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in macrophages. **Microbiology** 157: 2084-2093. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1099/mic.0.048926-0>>.

Thomson NR, Clayton DJ, Windhorst D, Vernikos G, Davidson S, Churcher C, Quail MA, Stevens M, Jones MA, Watson M, Barron A, Layton A, Pickard D, Kingsley RA, Bignell A, Clark L, Harris B, Ormond D, Abdellah Z, Brooks K, Cherevach I, Chillingworth T, Woodward J, Norberczak H, Lord A, Arrowsmith C, Jagels K, Moule S, Mungall K, Sanders M, Whitehead S, Chabalgoity JA, Maskell D, Humphrey T, Roberts M, Barrow PA, Dougan G, Parkhill J. (2008) Comparative genome analysis of *Salmonella* Enteritidis PT4 and *Salmonella* Gallinarum 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. **Genome Research** 18: 1624-1637. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1101/gr.077404.108>>.

Turner AK, Barber LZ, Wigley P, Muhammad S, Jones MA, Lovell MA, Hulme S, Barrow PA. (2003) Contribution of proton-translocating proteins to the virulence of *Salmonella enterica* Serovars Typhimurium, Gallinarum, and Dublin in chickens and mice. **Infection and Immunity** 71: 3392-3401. Disponível: <<https://dx.doi.org/10.1128/IAI.71.6.3392-3401.2003>>.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, de Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology** 3: research0034.1. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>>.

Véscovi EG, Soncini FC, Groisman EA (1996) Mg²⁺ as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence. **Cell** 84: 165-174. Disponível em: <[https://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81003-X](https://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81003-X)>.

Wang H, Zhang X, Liu Q, Liu X, Ding S (2017) Selection and evaluation of new reference genes for RT-RT-qPCR analysis in *Epinephelus akaara* based on transcriptome data. **PLoS One** 12: e0171646. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0171646>>.

Waterman SR, Holden DW (2003) Functions and effectors of *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. **Cellular Microbiology** 5: 501-511. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1046/j.1462-5822.2003.00294.x>>.

Wemyss MA, Pearson JS (2019) Host cell death responses to non-typhoidal *Salmonella* infection. **Frontiers in Immunology** 26: 1758. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2019.01758>>.

Wigley P, Hulme SD, Bumstead N, Barrow PA (2002) *In vivo* and *in vitro* studies of genetic resistance to systemic salmonellosis in the chicken encoded by the SAL1 locus. **Microbes and Infection** 4: 1111-1120. Disponível em: <[https://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579\(02\)01635-0](https://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01635-0)>.

Wigley P (2004) Genetic resistance to *Salmonella* infection in domestic animals. **Research in Veterinary Science** 76:165-169. Disponível em: <[https://dx.doi.org/10.1016/S0034-5288\(03\)00117-6](https://dx.doi.org/10.1016/S0034-5288(03)00117-6)>.

Wigley P, Hulme S, Powers C, Beal R, Smith A, Barrow P (2005) Oral infection with the *Salmonella enterica* serovar Gallinarum 9R attenuated live vaccine as a model to characterise immunity to fowl typhoid in the chicken. **BMC Veterinary Research**, 1, 2. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1186/1746-6148-1-2>>.

Wigley P, Hulme S, Rothwell L, Bumstead N, Kaiser P, Barrow PA (2006) Macrophages isolated from chickens genetically resistant or susceptible to systemic salmonellosis show magnitudinal and temporal differential expression of cytokines and chemokines following *Salmonella enterica* challenge. **Infection and Immunity**. 74:1425-1430. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1128/IAI.74.2.1425-1430.2006>>.

Wing JP (1968) Transduction by phage P22 in a recombination-deficient mutant of *Salmonella* Typhimurium. **Virology** 36: 271-276. Disponível em: <[https://dx.doi.org/10.1016/0042-6822\(68\)90144-x](https://dx.doi.org/10.1016/0042-6822(68)90144-x)>.

Withanage GS, Wigley P, Kaiser P, Mastroeni P, Brooks H, Powers C, Beal R, Barrow PA, Maskell D, McConnell I (2005) Cytokine and chemokine responses associated with clearance of a primary *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in the chicken and in protective immunity to rechallenge. **Infection and Immunity** 73: 5173-5182. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1128/IAI.73.8.5173-5182.2005>>.

Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL (2012) Primer-BLAST: A tool to design target-specific iniciadores for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics** 13: 134. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>>.

Yeom J, Pontes MH, Choi J, Groisman EA (2018) A protein that controls the onset of a *Salmonella* virulence program. **The EMBO Journal**, 37: e96977. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.15252/embj.201796977>.

Yeom J, Shao Y, Groisman EA (2020) Small proteins regulate *Salmonella* survival inside macrophages by controlling degradation of a magnesium transporter. **PNAS**, 117: 20235–20243. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1073/pnas.2006116117>>.

Zancan FB, Berchieri Junior A, Fernandes SA, Gama NMSQ (2000) *Salmonella* spp. investigation in transport box of day old birds. **Brazilian Journal of Microbiology** 31: 230-232. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822000000300016>>.

Zhang-Barber L, Turner AK, Barrow PA (1999) Vaccination for control of *Salmonella* in poultry. **Vaccine** 17:2538-2545. Disponível em: <[https://dx.doi.org/10.1016/s0264-410x\(99\)00060-2](https://dx.doi.org/10.1016/s0264-410x(99)00060-2)>.

APÊNDICES

A. Verificação do tamanho dos amplicons

Para prever os tamanhos dos *amplicons* a serem visualizados na PCR de checagem, foi utilizado o software CLC Sequence Viewer v. 6.4 para Windows (CLC Bio, A/S, Aarhus, Denmark). Inicialmente, a sequência do genoma no formato “.fasta” foi obtida na plataforma online NCBI e salva no computador (Figura 1A).

The screenshot shows the NCBI Nucleotide database interface. The search bar contains the text "Salmonella enterica subsp. enterica serovar Gallinarum str. 287/91". Below the search bar, the "FASTA" format is selected. A dropdown menu is open, showing options for "Complete Record", "Coding Sequences", and "Gene Features". Under "Choose Destination", the "File" option is selected. The "Download 1 item." section shows the format "FASTA" and a "Create File" button. The main content area displays the FASTA sequence for the complete genome of Salmonella enterica subsp. enterica serovar Gallinarum str. 287/91.

Figura 1A. Formato “.fasta” disponível na plataforma NCBI. Clicar em *create file* para realizar o download do arquivo.

Ao abrir o programa *CLC Sequence Viewer* v. 6.4, o ícone *Import* foi acessado de modo a abrir o arquivo com o genoma completo salvo previamente. Em seguida, na janela *Sequence Settings*, clicou-se no item *Find* e a sequência do iniciador foi incluída na caixa de texto *Sequence* (Figura 2A). Para isso, primeiramente foi adicionada a seqüência do iniciador *forward* e depois o clicou-se na caixa *Find*. Ao localizar a posição de anelamento do iniciador, a posição da primeira base nitrogenada foi registrada. Em seguida, a sequência do iniciador *reverse* foi transformada em sequência de anelamento complementar e o processo utilizado com o iniciador *forward* foi repetido, registrando-se a posição da última base nitrogenada. Foi adotado o mesmo procedimento com os iniciadores de mutagênese, porém ao invés

de selecionar as 70 bases nitrogenadas dos mesmos, foram utilizadas as bases nitrogenadas referentes ao genoma bacteriano (primeiros 50 pb).

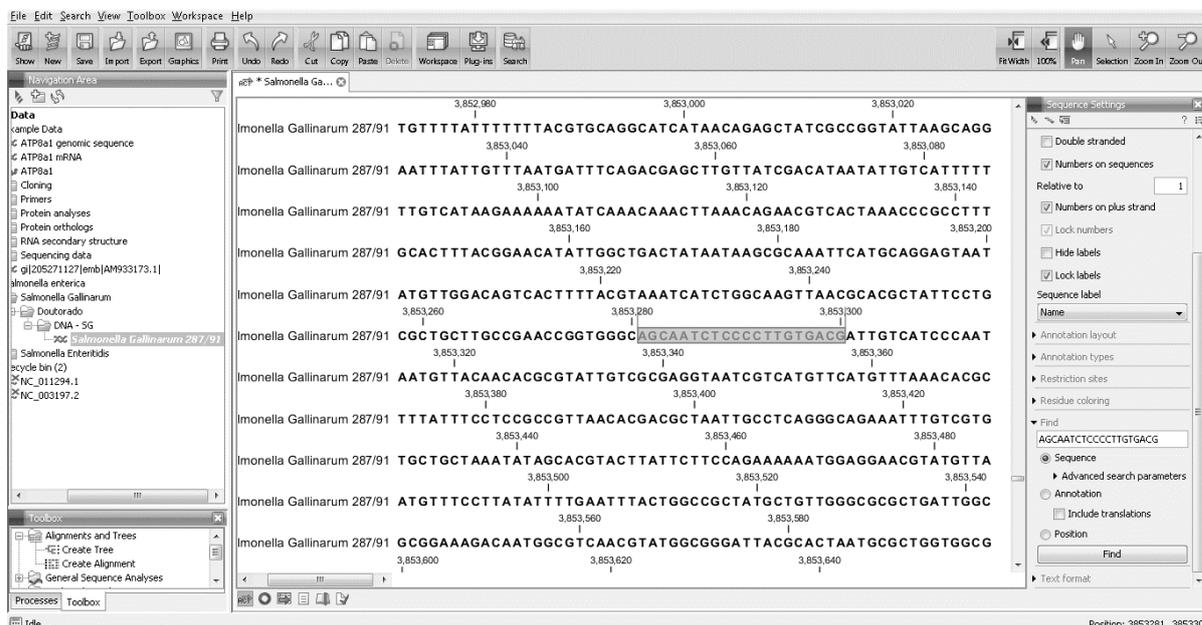


Figura 2A. Genoma de SG str. 287/91 importado para o *software* CLC Sequence Viewer. À direita, encontra-se a janela *Sequence Settings* em que são acrescentadas as seqüências dos iniciadores de checagem.

No presente estudo, as posições da primeira e da última base nitrogenada referentes aos iniciadores *forward* e *reverse* são 3853281 e 3854499, respectivamente. Dessa forma, o produto a ser gerado na estirpe selvagem com o par de iniciadores de checagem (3854499 - 3853281) é de 1219 bases nitrogenadas (aproximadamente 1,2 Kb). O cassete de resistência ao cloranfenicol possui tamanho próximo a 1000 bases nitrogenadas (1 Kb) e o gene *mgtC* a 696 bases nitrogenadas. Assim, ao realizar a substituição do gene *mgtC* pelo cassete de resistência ao cloranfenicol, a região alvo da estirpe selvagem (1219 bases) perde 696 bases referentes ao gene ($1219 - 696 = 523$ bases), porém 1000 bases do cassete de resistência ($523 + 1000 = 1523$ bases) são acrescentados. Ao final, o cassete de resistência é retirado ($1523 - 1000$) e um *amplicon* de 523 bases é gerado. Portanto, as PCRs de checagem das estirpes selvagem (SG), com cassete de resistência ao cloranfenicol (SG Δ *mgtC* + Cl^r) e da estirpe mutante final (SG Δ *mgtC*) resultam em *amplicons* de aproximadamente 1,2 Kb, 1,5 Kb e 0,5 Kb, respectivamente.

B. Cálculo da Dose Letal 50 (DL50)

O cálculo da DL50 foi realizado em três etapas. As duas primeiras representam o cálculo da DL50 em Log_{10} , conforme descrito por Reed e Muench (1938). A terceira etapa foi realizada para o cálculo da DL50 em UFC/mL. Para isso, foi encontrado o Antilog_{10} da DL50 calculado por meio das Etapas 1 e 2.

Etapa 1

$$\text{Log}_{10(\text{Estirpe})} = \frac{\text{n}^\circ \text{ logo acima de 50 \% de óbitos-metade do n}^\circ \text{ de animais}}{\text{n}^\circ \text{ logo acima de 50 \% de óbitos-n}^\circ \text{ logo abaixo de 50 \% de óbitos}}$$

SG	SG Δ mg Δ C
$\text{Log}_{10(\text{SG})} = \frac{17-12,5}{17-6}$	$\text{Log}_{10(\text{SG } \Delta\text{mg}\Delta\text{C})} = \frac{13-12,5}{13-4}$
$\text{Log}_{10(\text{SG})} = \frac{4,5}{11} = 0,409$	$\text{Log}_{10(\text{SG } \Delta\text{mg}\Delta\text{C})} = \frac{0,5}{9} = 0,055$

Etapa 2

$$\text{DL50}_{(\text{Estirpe}) \text{ Reed e Muench}} = \text{Log}_{10} \text{ acima de 50 \% de óbitos} - \text{Log}_{10(\text{Estirpe})}$$

SG	SG Δ mg Δ C
$\text{DL50}_{(\text{SG})\text{Reed e Muench}} = 6 - 0,409 = 5,59$	$\text{DL50}_{(\text{SG } \Delta\text{mg}\Delta\text{C})\text{Reed e Muench}} = 7 - 0,055 = 6,94$
$\text{DL50}_{(\text{SG})\text{Reed e Muench}} = 10^{5,59}$	$\text{DL50}_{(\text{SG } \Delta\text{mg}\Delta\text{C})\text{Reed e Muench}} = 10^{6,94}$

$$\text{DL50}_{(\text{SG})} = 5,59 \text{ Log}_{10} \text{ de UFC/mL}$$

$$\text{DL50}_{(\text{SG})} = 6,94 \text{ Log}_{10} \text{ de UFC/mL}$$

Etapa 3

$$\text{DL50}_{(\text{Estirpe}) \text{ UFC/mL}} = \text{Antilog}_{10} \text{ da DL50}_{(\text{Estirpe}) \text{ Reed e Muench}}$$

SG	SG Δ mg Δ C
$\text{DL50}_{(\text{SG})} = 3,89 \times 10^5 \text{ UFC/mL}$	$\text{DL50}_{(\text{SG } \Delta\text{mg}\Delta\text{C})} = 8,7 \times 10^6 \text{ UFC/mL}$