



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**DINÂMICA DE EXPRESSÃO DE INTERLEUCINAS NO INTESTINO DE
PINTAINHOS DE DIFERENTES LINHAGENS DESAFIADOS COM *SALMONELLA*
ENTERITIDIS**

MAYLANE RAYANE BRITO DOS SANTOS

**AREIA – PB
MARÇO – 2018**

MAYLANE RAYANE BRITO DOS SANTOS

**DINÂMICA DE EXPRESSÃO DE INTERLEUCINAS NO INTESTINO DE
PINTAINHOS DE DIFERENTES LINHAGENS DESAFIADOS COM *SALMONELLA*
ENTERITIDIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de “*Magister Scientiae*” em Zootecnia, com área de concentração em Produção Animal.

Comitê de orientação:

Profa. Dr^a. Patrícia Emília Naves Givisiez

Prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira

Dr. Alexandre Lemos de Barros Moreira Filho

**AREIA – PB
MARÇO – 2018**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S237d Santos, Maylane Rayane Brito dos.

Dinâmica de expressão de interleucinas no intestino de pintainhos de diferentes linhagens desafiados com salmonella enteritidis / Maylane Rayane Brito dos Santos. - Areia, 2018.
39 f. : il.

Orientação: Patrícia Emília Naves Givisiez.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCA.

1. Zootecnia. 2. Frangos label rouge - Manipulação embrionária. 3. Salmonella enteritidis. I. Givisiez, Patrícia Emília Naves. II. Título.

UFPB/BC



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

PARECER DE DEFESA DO TRABALHO DE DISSERTAÇÃO

TÍTULO: “DINÂMICA DE EXPRESSÃO DE INTERLEUCINAS NO INTESTINO DE PINTAINHOS DE DIFERENTES LINHAGENS DESAFIADOS COM SALMONELLA ENTERITIDIS”

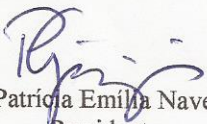
AUTOR: Maylane Rayane Brito dos Santos

ORIENTADOR: Patrícia Emília Naves Givisiez

JULGAMENTO

CONCEITO: APROVADO

EXAMINADORES:


Prof. Dr. Patrícia Emília Naves Givisiez
Presidente
Universidade Federal da Paraíba


Profª. Dra. Danila Barreiro Campos
Examinadora
Universidade Federal da Paraíba


Profª. Dra. Tânia Freitas Raso
Examinador
Universidade de São Paulo

Areia, 05 de março de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MAYLANE RAYANE BRITO DOS SANTOS-ingressou no curso de Zootecnia da Universidade Federal do Vale do São Francisco de 2010, diplomando-se em abril de 2016.

Durante a graduação foi bolsista de monitoria no primeiro semestre de 2011 nas disciplinas de Química Geral e Química Analítica Experimental, e bolsista de iniciação científica do CNPq de 2011 a 2012 nos Laboratórios de Microbiologia e Bromatologia Animal, e no período de 2012 a 2014 no laboratório de Nutrição Animal na Embrapa Semiárido, Petrolina-PE. Realizou trabalho de conclusão de curso intitulado: Desempenho de codornas europeias em desconforto térmico alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de energia, sob a orientação da professora Dr^a Débora Cristine de Oliveira Carvalho.

No ano de 2016 ingressou no curso de Mestrado em Zootecnia da Universidade Federal da Paraíba na área de concentração em Produção animal, tendo como linha de pesquisa Fisiologia de Não Ruminantes sob a orientação da professora Dr^a Patrícia Emília Naves Givisiez.

**“Sessenta anos atrás, eu sabia tudo. Hoje sei que nada sei.
A educação é a descoberta progressiva da nossa ignorância.”**

Will Durant

**À minha família.
À família LAPOA.
À amizade, ao companheirismo e por não medirem esforços para
auxiliar-me na rotina laboratorial e no conhecimento científico.**
Dedica

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e oportunidade de presenciar tudo isso.

A universidade pela infraestrutura para realização do experimento.

Aos meus pais pelo apoio durante toda a minha formação e pelo empenho a mim dados para que conseguisse atingir um objetivo, e por acreditarem no meu potencial. E a meus irmãos por me ajudarem em todos os momentos, e me darem o ombro quando tive medo.

A minha orientadora Patrícia Givisiez pela orientação, paciência, amizade e por me abrir a porta para o conhecimento e aprendizagem tanto nos assuntos profissionais como os da vida.

A meus avós em memória: Chiquinho, Lica e Osvaldo, ao qual tenho um enorme apreço e não tiveram a oportunidade de presenciar tudo isso.

As minhas amigas: Artenia Gama, Cintia Araújo e Núbia Araújo por me apoiarem e dividirem seu tempo comigo, mesmos nos momentos mais difíceis, bem como abrirem mão de seus interesses para ajudar quando preciso, mesmo que distantes.

Aos meus colegas e amigos: Alexandre Moreira Filho, Candice Maria, Silvana Lima, Mauro Saraiva, Núbia Silva, Laelia Pessoa, Maria de Fátima e Priscylla Carvalho pelo convívio no laboratório.

A Capes pelo financiamento da bolsa de estudos.

As minhas melhores amigas Fernanda Sassaki e Graziela Martino, por sempre estarem comigo e me apoiando mesmo distantes.

Aos meus familiares pelo apoio e ajuda tanto financeira como assistencialismo. Principalmente minha querida avó Lucinda, meus tios Marlene e Francisco pelo apoio nas minhas condutas, sempre me dando estrutura para atingir o objetivo de concluir o curso. Ao meu cunhado Elismar Barbosa pelo seu apoio, conhecimento e amizade; sempre dialogando e me ajudando nos assuntos a fim quanto a nosso curso em comum.

Ao Laboratório de Produtos de Origem Animal pela assistência nas condutas das avaliações para o experimento, bem como aos pós-doutorandos Alexandre Moreira Filho e Núbia Silva pelos apoios dados nas avaliações laboratoriais e auxílio nas decisões. Ao professor Paulo Azevedo pela amizade, conselhos e auxílio no ambiente de trabalho.

Aos professores Celso Oliveira, Oliveira Caetano e Danila Campos pelo apoio na conduta do experimento. A banca avaliadora de qualificação e defesa: Leonardo Pascoal e Tânia Raso por toda colaboração no trabalho e sugestões dadas.

Aos colegas de pós-graduação: Márcia, Jonathan, Rafael, Danilo, Yohana, Aldevan e Natalia.

E por fim a todos que me ajudaram direto ou indiretamente: os funcionários da instituição (eletricistas, vaqueiro, tratoristas, pessoal da limpeza, seguranças, bibliotecários, etc).

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO	13
2.REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1. Salmonelose na produção de frangos de corte.....	15
2.2. Genótipos de frangos de corte	16
2.3. Resposta imune.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1. Incubação dos ovos.....	20
3.2. Instalações e dieta.....	20
3.3. Preparo do inóculo e inoculação	21
3.4. Coletas de amostras cecais e contagem bacteriana	21
3.5. Extração de RNA e expressão gênica	22
3.6. Tratamento de dados e análise estatística	22
4. RESULTADOS.....	23
5. DISCUSSÃO	29
6. CONCLUSÃO	33
7. IMPLICAÇÕES FINAIS.....	34
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Genes em estudo, identificação da sequência de referência e sequência dos primers utilizados na qPCR	22
---	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Contagem de bacteriana cecal (UFC/g) de frangos Cobb500® e Label Rouge® desafiados com Salmonella com inoculação aos 2 dias de idade das aves. Dentro de cada período de avaliação, letras diferentes indicam respostas diferentes entre linhagens.23
- Figura 2.** Expressão relativa do mRNA de interleucinas 1 (IL-1, A), 8 (IL-8, B), 17 (IL-17, C) e 22 (IL-22, D) em aves Cobb500® e Label Rouge® não infectadas. Não houve diferenças entre as linhagens para níveis de mRNA de ILs às 24 ou 168 hpi pelo Teste t ($P>0,05$).25
- Figura 3.** Expressão relativa do mRNA de interleucinas 1 (IL-1), 8 (IL-8), 17 (IL-17) e 22 (IL-22) em aves Cobb500® não infectadas (barras brancas) ou infectadas (barras pretas) às 24 e 168 hpi. Letras minúsculas indicam diferença significativa entre infecção e não infecção às 24 hpi pelo Teste t ($P<0,05$). Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre infecção e não infecção às 168 hpi pelo Teste t ($P<0,05$).26
- Figura 4.** Expressão relativa do mRNA de interleucinas 1 (IL-1), 8 (IL-8), 17 (IL-17) e 22 (IL-22) em aves Label Rouge® não infectadas (barras cinza claras) ou infectadas (barras cinza escuras) às 24 e 168 hpi. Letras minúsculas indicam diferença significativa entre infecção e não infecção às 24 hpi pelo Teste t ($P<0,05$).26
- Figura 5.** Expressão relativa do mRNA de interleucina 1 (IL-1, A), 8 (IL-8, B), 17 (IL-17, C) e 22 (IL-22, D) em aves Cobb500® (linhas negras) e Label Rouge® infectadas (linhas cinza). Letras diferentes em cada ponto de avaliação indicam diferença significativa entre aves infectadas de diferentes linhagens pelo Teste t ($P<0,05$). Não há diferença entre linhagens para a expressão de IL-1 quando as aves são infectadas.28

RESUMO

SANTOS, MAYLANE RAYANE BRITO DOS SANTOS. **Dinâmica de expressão de interleucinas no intestino de pintainhos de diferentes linhagens desafiados com *Salmonella Enteritidis***. 2018. 39 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB, 2018.

Objetivou-se avaliar o comportamento de interleucinas nas linhagens comercial e de pescoço pelado desafiadas com *Salmonella Enteritidis*. Foram utilizados 200 ovos das linhagens Cobb500® e Label Rouge® na incubação, destes 100 pintinhos foram utilizados no experimento. As avaliações foram realizadas na fase pré-inicial (1-9 dias). Os parâmetros analisados foram contagem bacteriana (UFC/mL) e expressão relativa de interleucinas (IL-1, IL-8, IL-17 e IL-22). Os animais foram arranados em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 25 repetições, formando 4 tratamentos: linhagem Cobb500® sem desafio de *Salmonella* pós-eclosão (Cobb-SS); linhagem Cobb500® e desafio com *Salmonella* pós-eclosão (Cobb-CS); linhagem Label Rouge® sem desafio de *Salmonella* pós-eclosão (LR-SS); linhagem Label Rouge® e desafio com *Salmonella* pós-eclosão (LR-CS). A linhagem Cobb500® apresentou maiores contagens bacterianas cecais no período de 168 hpi. Os diferentes genótipos utilizam rotas diferenciadas nas duas situações de desafio, Label Rouge® tem ligação com as citocinas que são expressas pelos heterófilos. A expressão relativa das interleucinas mostrou que há uma dinâmica diferente entre as linhagens. A linhagem Label Rouge® apresenta desenvolvimento mais precoce da tolerância à *S. Enteritidis* que a linhagem Cobb500®.

Palavras-chave: ceco; genótipos; inoculação; linhagens; pro-inflamatórias; tolerância;

ABSTRACT

SANTOS, MAYLANE RAYANE BRITO DOS SANTOS. **Dynamics of interleukin expression in the gut of chicks from different lineages challenged with *Salmonella Enteritidis***. 2018. 39 p. Dissertation (Master in animal Science).

The objective of this study was to evaluate the behavior of interleukins in poultry commercial and neck naked challenged *Salmonella Enteritidis* challenged. A total of 200 eggs from the Cobb500® and Label Rouge® lines were used in the incubation, of these 100 chickens were used in the experiment. The evaluations were performed in the pre-initial phase (1-9 days). The parameters analyzed were bacterial count (CFU / mL) and relative expression of interleukins (IL-1, IL-8, IL-17 and IL-22). The animals were arranged in a completely randomized design (CRD) with 25 replicates, forming 4 treatments: Cobb500® line without challenge of *Salmonella* after hatching (Cobb-SS); Cobb500® line and challenge with post-hatching *Salmonella* (Cobb-CS); Label Rouge® line without challenge of *Salmonella* after hatching (LR-SS); Label Rouge® line and post-hatch *Salmonella* challenge (LR-CS). The Cobb500® line presented higher cecal bacterial counts in the period of 168 hpi. The different genotypes use differentiated routes in the two challenge situations, Label Rouge® is linked to the cytokines that are expressed by heterophiles. The relative expression of interleukins showed that there is a different dynamics between the lines. The Label Rouge® line shows earlier development of tolerance to *S. Enteritidis* than the Cobb500® lineage.

Keywords: cecum; inoculation; genotypes; lineages; pro-inflammatory; tolerance

1. INTRODUÇÃO

A *Salmonella* é uma das principais zoonoses associadas ao consumo de produtos avícolas no mundo, e a redução do agente em sistemas de produção de aves é uma preocupação constante dos países exportadores de carne de frango. A *Salmonella* Enteritidis é um dos sorovares envolvidos em surtos de infecção alimentar em humanos, surtos esses decorrentes do consumo de produtos de origem animal (USDA, 2017).

Historicamente, a indústria avícola tem voltado os programas de melhoramento para obtenção de animais cada vez mais precoces, com alta taxa de crescimento, eficiência de conversão alimentar e rendimento de carne. No entanto, tem sido observado que animais altamente melhorados e com altas taxas de crescimento tendem a apresentar diminuição da imunocompetência, tornando-se mais sensíveis a infecções por agentes patogênicos. Associado a isso, é cada vez maior a preocupação com segurança dos produtos avícolas, devido ao crescente número de intoxicações alimentares causadas pela ingestão de produtos de origem animal, destacando-se ovos e carne de frango. Como consequência, os consumidores estão cada vez mais exigentes, buscando produtos com qualidade e que ofereçam segurança para sua saúde.

A susceptibilidade a infecções por *Salmonella* em aves é dependente da idade; animais mais jovens com até 3 dias de idade apresentam maior tendência a desenvolver reações inflamatórias e lesões intestinais, o que não ocorre com animais adultos, refletindo a importância do desenvolvimento da competência imunológica intestinal (Smith et al., 2014). Após a infecção com microrganismos, o sistema imune desencadeia mecanismos de proteção na tentativa de eliminar o patógeno do organismo. Há a proliferação de células de defesa e, consequentemente, produção de citocinas que irão atuar no combate à infecção (Janeway et al., 2001).

As diferentes linhagens de frangos de corte apresentam características fisiológicas e imunológicas específicas e que ainda não foram totalmente elucidadas. Porém, sabe-se que aves com intenso melhoramento genético perderam as características como rusticidade e resistência a doenças, enquanto aves pouco melhoradas e com crescimento lento, como as de criações orgânicas ou alternativas, possuem elementos genéticos que as capacita para uma melhor resistência a algumas enfermidades (Wigley, 2004). A linhagem Label Rouge® é uma linhagem de aves rústicas que se adaptam bem a várias condições de clima e manejo, atingem idade ao abate no período de 80-90 dias, com peso de cerca de 2,3kg (Albino et al., 2013). Aves da linhagem Cobb500® são utilizadas nas criações comerciais para alta produção e rendimento, e pesam cerca de 3,5kg aos 42 dias de idade (Lupatini, 2015).

No presente estudo, testamos a hipótese de que os animais de crescimento rápido possuem uma rota diferenciada de resposta imune ao desafio por *Salmonella*, com o desenvolvimento da tolerância ao patógeno mais tardia que aves de crescimento lento. Para tanto, estudou-se a expressão gênica de interleucinas no ceco em frangos de corte Cobb500® e Label Rouge® desafiados com *Salmonella* Enteritidis. Os possíveis achados podem ser utilizados com o intuito de produzir aves mais resistentes no melhoramento genético ou podem respaldar pesquisas de imunonutrição.

2.REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Salmonelose na produção de frangos de corte

As salmoneloses aviárias são doenças causadas por bactérias do gênero *Salmonella*, que possuem aproximadamente 2400 sorotipos, entre os quais cerca de 200 estão relacionadas a toxinfecções alimentares. As *salmonelas* zoonóticas são responsáveis pela maioria dos problemas relacionados a gastroenterite ou por doenças transmitidas por alimento. São responsáveis por significantes índices de morbidade e mortalidade, tanto em países emergentes quanto desenvolvidos, determinando pequenos e grandes surtos, envolvendo, principalmente, o consumo de alimentos de origem animal, como ovos, aves, carnes e produtos lácteos (Albino et al., 2013; Brasil, 2011).

Segundo dados do Ministério da Saúde, a principal via de transmissão de *Salmonella* spp. está na cadeia alimentar, sendo este o microrganismo mais incidente e o mais relevante agente etiológico de enteroinfecções. *Salmonella* spp causa perdas de milhões de dólares para a indústria, particularmente de bovinos, suínos e aves. No Brasil, o início da vigilância de surtos começou em 1999 e aqueles causados por doenças transmitidas por alimentos (DTA) são considerados Eventos de Saúde Pública, isto é, “situação que pode constituir potencial ameaça à saúde pública, (...) considerando o potencial de disseminação, a magnitude, a gravidade, a severidade, a transcendência e a vulnerabilidade.” Após detecção, os surtos devem ser notificados em no máximo 24 horas e de forma compulsória, conforme determinado pela Portaria 204 de 17 de fevereiro de 2016 e devem ser registrados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) em até 7 dias (Brasil, 2016).

Entre os anos de 2007 e 2016, houve o registro no Brasil de 6.632 surtos e 118.104 pessoas acometidas, das quais 109 vieram a óbito. A *Salmonella* foi identificada como o agente causador dos surtos em 7,5% desse total e a ingestão de produtos da indústria avícola (carne de frango e ovos) foram considerados as principais fontes de infecção (5%) (Brasil, 2016). Em 2016 foram registrados 8 surtos de infecção com *Salmonella* nos Estados Unidos, decorrentes do contato de pessoas com animais infectados, totalizando 895 pessoas infectadas. Dentre os sorotipos que apresentaram maior ocorrência destaca-se a *S. Enteritidis* e *S. Infantis* (USDA, 2017). Na União Europeia de 2007 a 2016, foram reportados mais de 425 mil casos de *S. Enteritidis*, apesar da redução dos casos pela metade nesse intervalo de tempo decorrentes dos processos intensos de vigilância desde 2007 (ECDC, 2017).

O processo de contaminação em aves ocorre da seguinte forma: as *Salmonellas* entram em contato com a cavidade oral, atingem as mucosas do intestino delgado e grosso (CDC,

2013), passam através da camada epitelial intestinal, alcançam a lâmina própria e se proliferam (Ramanan e Cadwell, 2016). As Salmonellas são fagocitadas pelos monócitos e macrófagos (Linehan e Fitzgerald, 2015) resultando em resposta inflamatória, decorrente da hiperatividade do sistema reticuloendotelial (Foley et al., 2013). A *S. Enteritidis* tem maior invasividade na lâmina própria e com isso maior expressão de genes no ceco de aves, isso ocorre porque esse sorovar possui alto potencial para desencadear influxo ou proliferação de populações celulares (granulócitos, Células T $\gamma\delta$ e CD8 α^+) na mucosa intestinal (Berndt et al., 2007).

2.2. Genótipos de frangos de corte

As aves comerciais são submetidas a intensos processos de melhoramento genético para aumento da produtividade (Bayyari et al., 1997), mas que as tornam mais sensíveis a doenças diversas, incluindo problemas respiratórios e cardiovasculares (Crossley & Altimiras, 2012). Além disso, as diferentes linhagens de frangos de corte apresentam características fisiológicas e imunológicas específicas, aves com intenso melhoramento genético perderam as características como rusticidade e resistência a doenças, enquanto aves pouco melhoradas e com crescimento lento, como as de criações orgânicas ou alternativas, possuem elementos genéticos que as capacitam para uma melhor resistência a algumas enfermidades (Wigley, 2004).

As diferenças de desempenho dos animais estão relacionadas com o potencial genético das linhagens, idade ao abate, sexo, manejo, nutrição e sanidade. Além disso, mudanças no ambiente de criação, que diminuem as condições de estresse, são fatores essenciais para o aumento da produtividade e rentabilidade do sistema de produção (Veloso, 2012), com isso a imunologia apresenta comportamento específico em determinadas espécies e mesmo dentro de uma mesma espécie, entretanto os estudos nesse sentido ainda estão em processo de entendimento.

Ao longo do tempo, a pesquisa na imunologia tem focado na elucidação de como as células do sistema imune são ativadas e interagem para proteger o hospedeiro da invasão e da disseminação de microrganismos patogênicos. Os estudos mostram que vários aspectos da fisiologia intestinal são fundamentais para limitar o estabelecimento ou o crescimento de agentes. Uma das características mais importantes do intestino com efeito direto sobre a função imunológica é a necessidade de não ser montada resposta imune contra os componentes dos alimentos ou microrganismos comensais que habitam o intestino. Em geral, o intestino é povoado por diferentes proporções das diversas células do sistema imune (macrófagos, heterófilos, células dendríticas, linfócitos T e B, entre outras), de acordo com a localização

intestinal, idade das aves, microbiota intestinal natural, dieta, exposição a microrganismos patogênicos e genética do hospedeiro (Davison et al., 2008; Bayyari et al., 1997; Cheng et al., 2001). Consequentemente, aves de diferentes linhagens mostram comportamentos diversos e específicos ao responder contra agentes estranhos.

Além das diferenças das proporções de células do sistema imune nas diferentes linhagens de aves, há variação na microbiota intestinal, a qual tem influência direta sobre a competição entre os microrganismos e sobre o desempenho das aves. A microbiota de diferentes porções do trato gastrointestinal (TGI) mostram inter-relação com o ganho de peso (GP) das aves. As comunidades bacterianas do ceco que tem relação positiva com ganho de peso são do gênero *Lactococcus*, e relacionadas negativamente com *Anaerovibrio*, *Prevotella* e *Akkermansia*. A nível íleal, *Methanobrevibacter* e *Bifidobacterium* foram positivamente relacionados com GP, enquanto *Akkermansia* e *Streptococcus* relacionaram-se negativamente com GP (Han et al., 2016).

Frangos de corte, tanto na homeostase como após o desafio sanitário, utilizam mecanismos imunológicos que favorecem a ativação de macrófagos e células T, e intensificam o processo oxidativo (Coble et al., 2011). Redmond et al. (2009) sugerem que uma linhagem rústica da África (Fayoumis) tenha uma rápida resposta pró-inflamatória, com maior número de heterófilos, o que pode ser um fator na resistência efetiva à *Salmonella* Enteritidis. Além disso, quando inoculadas com *S. Enteritidis*, aves de linhagens com rápido crescimento apresentam maiores contagens bacterianas no fígado e redução de peso mais evidente em relação às de crescimento lento (Van Hemert et al., 2006).

2.3. Resposta imune

O sistema imune é composto pelos órgãos linfoides e estes desempenham o papel de proteção e defesa do organismo. Em aves, os órgãos linfoides primários são constituídos pela bolsa cloacal (local de desenvolvimento e diferenciação de linfócitos B) e pelo timo (local desenvolvimento e diferenciação de linfócitos T) (Bockman & Cooper, 1973; Qureshi et al., 1998). As células do sistema imune deixam os órgãos primários e seguem em direção aos órgãos linfoides secundários, dentre os quais estão o baço, a medula óssea, os tecidos linfoides associados aos brônquios (BALT) e intestino (GALT). Os linfócitos B chegam 3 dias antes da eclosão (D18) nos tecidos linfoides secundários e as células T ao 6º dia pós-incubação (D6) e tendo uma segunda onda (D12-13) (Pabst, 1987; Davison et al., 2008). Nas de aves de produção, especificamente em frangos, a GALT inclui o baço, tonsilas cecais e placas de Peyer (Yegani & Korver, 2008).

Logo após a eclosão, as aves não possuem microbiota bem definida e o desenvolvimento da maturação intestinal demora cerca de 2 semanas (Geyra et al., 2001), o que torna o intestino susceptível à infecção por microrganismos. Na produção de aves, busca-se cada vez mais acelerar o processo de maturação intestinal com a potencialização do sistema imune. Segundo Crhanova et al. (2011), isso pode ser realizado através da modificação da colonização da microbiota do intestino do frango. O contato de aves saudáveis auxilia na colonização por uma microbiota saudável e que pode ser essencial no combate a patógenos (Pan & Yu, 2014).

Quando a mucosa intestinal é submetida à ação de agentes patogênicos, o sistema imune desencadeia processos de defesa, os quais podem afetar a absorção intestinal e, dessa forma, interferir nos processos produtivos e de bem-estar animal. Apesar da ausência de sinais clínicos, as aves respondem à infecção oral por sorovares não-tifoides de *S. enterica* através de inflamação moderada no ceco, cuja mucosa mostra infiltração de heterófilos e monócitos/macrófagos (Matulova et al., 2013). A resposta à infecção depende de células do sistema imune especializadas em reconhecimento de antígenos, que irão recrutar os linfócitos para os tecidos acometidos. Esse processo leva períodos de tempo distintos para as diferentes células imunes. Os heterófilos demoram 6 a 12 horas pós-infecção, enquanto células dendríticas e macrófagos demoram cerca de 48 horas para atingirem o sítio de infecção (Harmon, 1998), sendo de fundamental importância visto que os heterófilos e macrófagos são responsáveis secreção de interleucinas e desencadeamento da resposta imune.

Segundo McGrey & McSorley (2012), durante a infecção por *Salmonella*, células efectoras de Th17 proliferam-se e desempenham importante papel na defesa do hospedeiro. Estas células atuam na defesa contra agentes extra e intracelulares, secretando citocinas (interleucinas IL-17 e IL-22), e auxiliando na ativação e recrutamento de heterófilos. A IL-17 ativa monócitos e neutrófilos, promovendo fagocitose a fim de reduzir os efeitos da infecção. A IL-22 atua produzindo peptídeos antimicrobianos e estimulando a proliferação de células epiteliais a fim de reparar os danos causados pela invasão microbiana (Zelante et al., 2011). É possível que o desenvolvimento de respostas inflamatórias Th17 ao microbioma difira substancialmente do desenvolvimento homeostático das células Th17 em resposta aos patógenos entéricos (McGrey & McSorley, 2012), a microbiota induz a produção de IL-1beta, que desencadeia a diferenciação das células Th17 (Shaw et al., 2012). Em contrapartida, há evidências de que as células Th17 e as citocinas associadas desempenham um papel importante na resistência às infecções das mucosas por *Salmonella* (McGrey & McSorley, 2012; Matulova et al., 2013).

Torna-se claro que há uma inter-relação entre o estímulo provocado pelo patógeno e a resposta através da produção de citocinas. Há aumento na produção de IL-17 após o estímulo pela presença do patógeno, ao qual atua induzindo a recrutamento e proliferação de heterófilos.

Os heterófilos secretam interleucinas pró-inflamatórias, como a IL-1 e IL-8 e que estão ligadas ao recrutamento e ativação de células do sistema imune (Zhang & An, 2007).

Verifica-se que há expressão de interleucinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-8, IL-17 e IL-22) tanto pela inflamação decorrente da *Salmonella* Enteritidis como pela colonização da microbiota intestinal natural, entretanto há maior expressão das citocinas pela presença do patógeno. O aumento da expressão decorrente da colonização natural do ceco de frangos ocorre a partir do 4º dia de vida das aves, através de aumento momentâneo da IL-8 e expressão de IL-17 no ceco de frango, o que é indicativo de inflamação fisiológica e maturação do sistema imune intestinal (Crhanova et al., 2011; Varmuzova et al., 2014), e a permanência desse acréscimo permanece até cerca da 1ª semana de vida (Barshira & Friedman, 2006).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Todas as práticas de manejo, bem como abate e procedimentos de amostragem da presente pesquisa, foram submetidas e aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba (protocolo de nº 186/2015). O experimento foi conduzido no Laboratório de Avaliação de Produtos de Origem Animal, pertencente ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), na cidade de Areia - PB.

3.1. Incubação dos ovos

Foram utilizados 200 ovos com peso médio semelhante, provenientes de matrizes da linhagem Cobb500® e Label Rouge®. Os ovos foram distribuídos em três incubadoras artificiais (IP130, incubadoras Premium Ecológica Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil) com controle de temperatura e viragem automática. As incubadoras foram mantidas em condições normais de incubação, com temperatura de 37,7°C, umidade relativa de 60% e viragem a cada duas horas. No décimo primeiro dia de incubação (DE11), procedeu-se à ovoscopia com o objetivo de descartar os embriões mortos e ovos claros. Após a eclosão, 100 pintainhos nascidos em períodos mais próximos foram utilizados no experimento.

3.2. Instalações e dieta

Após a eclosão, os pintainhos foram pesados individualmente e o estado negativo de *Salmonella* Enteritidis foi confirmado por meio de análise microbiológica de swab cloacal, colhidos em vinte animais por incubadora. Os animais foram distribuídos em delineamento experimental inteiramente, formando assim quatro tratamentos e 25 repetições por tratamento, considerando cada ave uma repetição. Os tratamentos resultantes foram: linhagem Cobb500® sem desafio de *Salmonella* pós-eclosão (Cobb-SS); linhagem Cobb500® com desafio com *Salmonella* pós-eclosão (Cobb-CS); linhagem Label Rouge® sem desafio de *Salmonella* pós-eclosão (LR-SS); linhagem Label Rouge® com desafio com *Salmonella* pós-eclosão (LR-CS). Os animais foram alojados em caixas de madeira com tampas de nylon para evitar contaminação cruzada e contaminação do ambiente por meio de vetores, como moscas. As caixas foram equipadas com bebedouro e comedouro recomendados para fase inicial. Termohigrômetros digitais foram instalados no ambiente (Oregon Scientific, Portland, EUA) para aferições de temperatura e umidade relativa. A dieta experimental foi composta principalmente por farelo de milho e farelo de soja para a fase inicial (1-10 dias), seguindo as recomendações de Rostagno et al. (2011). A ração fornecida aos animais foi a mesma para todos os tratamentos, sendo

composta de 22,20% de PB, 2.950 kcal/kg de energia metabolizável, 1,31% de lisina digestível, 0,94% de metionina + cistina digestível e 0,852% de treonina digestível.

3.3. Preparo do inóculo e inoculação

O desafio por *Salmonella* Enteritidis foi realizado aos dois dias de idade. Para o preparo do inóculo, foi realizado o cultivo da estirpe bacteriana com resistência induzida ao ácido nalidíxico (*Salmonella* Enteritidis^{Nal⁺}) em caldo nutriente (Acumedia®, EUA) em estufa bacteriológica durante 24 horas a 37°C, até que o meio se tornasse turvo, o que indica desenvolvimento satisfatório da bactéria. Em seguida, uma alíquota de 0,1 mL da cultura foi semeada em novo caldo nutriente e incubada a 37°C por quatro horas, em incubadora com agitação orbital. Para determinação da concentração do inóculo, foi realizada a semeadura das diluições decimais seriadas em ágar verde brilhante (Acumedia®, EUA) contendo ácido nalidíxico (100 µg/mL), com incubação a 37°C, sendo posteriormente realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) de *Salmonella* Enteritidis^{Nal⁺}. Todos os pintainhos foram inoculados via intra-esofágica utilizando-se 0,5mL de cultura de *Salmonella* ($1,6 \times 10^9$ UFC/mL) ou caldo nutriente estéril. Os tratamentos foram determinados de acordo com um fatorial 2x2, sendo linhagens (Cobb500® ou Label Rouge®) x desafio (com ou sem). O arranjo fatorial resultante das duas linhagens e do desafio após a eclosão determinou os seguintes tratamentos: linhagem Cobb500® sem desafio de *Salmonella* pós-eclosão (Cobb-SS); linhagem Cobb500® e desafio com *Salmonella* pós-eclosão (Cobb-CS); linhagem Label Rouge® sem desafio de *Salmonella* pós-eclosão (LR-SS); linhagem Label Rouge® e desafio com *Salmonella* pós-eclosão (LR-CS).

3.4. Coletas de amostras cecais e contagem bacteriana

Foram realizados abates 24 e 168 horas pós inoculação, que correspondem a 3 e 9 dias de idade das aves, respectivamente. Foram colhidas amostras de mucosa cecal de cinco animais por tratamento, identificadas e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido, sendo posteriormente armazenados a -80°C até o processo de extração ser iniciado.

O conteúdo cecal de 5 pintainhos por tratamento foi colhido 24, 96 e 168 horas pós inoculação para a realização da contagem bacteriana, e diluído em série utilizando-se PBS pH 7,4. As diluições foram cultivadas em ágar verde brilhante contendo ácido nalidíxico (100 µg/mL) e as placas foram incubadas a 37° por 24 horas. O número de salmonelas viáveis foi expresso e determinado em unidades formadoras de colônia por grama de conteúdo cecal (UFC/g).

3.5. Extração de RNA e expressão gênica

As amostras congeladas a -80 °C foram utilizadas para extração de RNA. O RNA foi extraído utilizando o kit Qiagen RNeasy® Mini (Cat. n.74104, Qiagen, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração e pureza do material extraído foi avaliado em espectrofotômetro de Microvolume (Colibri), utilizando as relações de absorbância de 260/280 e 260/230 para atestar a qualidade do RNA extraído. A síntese do cDNA foi realizada utilizando o kit cDNA AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies), de acordo com as recomendações do fabricante. A expressão gênica relativa foi determinada através reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR), utilizando o Brilliant III Ultra-fast SYBR QPC Master Mix (Agilent Technologies). Os ciclos da RT-PCR foram realizados no termociclador StratageneMx3005P (Agilent Technologies). As seqüências dos genes das interleucinas e do gene de referência (beta-actina) estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Genes em estudo, identificação da sequência de referência e sequência dos *primers* utilizados na qPCR

Gene (Nome) ¹	Iniciador Direto/ Reverso	Referência
Beta-actina F	CCA CTG GCA TTG TCA TGG ACT CT	Moreira Filho et al. (2015)
Beta-actina R	TCC TTG ATG TCA CGG ACG ATT TCC	Moreira Filho et al. (2015)
IL-1Beta F	CAC ACT ATG GGC GCA TGC T	Crhanova et al. (2011)
IL-1Beta R	ATT GTC CCT GGA GGT GTT GGT G	Crhanova et al. (2011)
IL-8 F	CAA GCC AAA CAC TCC TAA CCA T	Varmuzova et al. (2016)
IL-8 R	AGC TCA TTC CCC ATC TTT ACC	Varmuzova et al. (2016)
IL-17 F	TAT CAG CAA ACG CTC AGT GG	Crhanova et al. (2011)
IL-17 R	AGT TCA CGC ACC TGG AAT G	Crhanova et al. (2011)
IL-22 F	CAG ACT CAT CGG GTC AGC AAA	Crhanova et al. (2011)
IL-22 R	GGT ACC TCT CCT TGG CCT CT	Crhanova et al. (2011)

¹F: Direto; R: Reverso; IL: Interleucina

3.6. Tratamento de dados e análise estatística

Dados referentes à contagem bacteriana (UFC/g) foram transformados em log₁₀ e posteriormente analisados em delineamento inteiramente casualizado, considerando-se apenas os dois tratamentos desafiados. A expressão gênica foi analisada em delineamento inteiramente casualizado, em cada idade de colheita das amostras. A expressão relativa foi calculada com base no método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, descrito por Pfaffl (2001), utilizando-se o gene da beta-actina como gene de referência. Médias diferentes foram analisadas pelo Teste t de Fisher a 5%.

4. RESULTADOS

Infecção por *Salmonella* e contagem cecal

A contagem bacteriana para os dois primeiros períodos (24 e 96 horas pós-inoculação) não mostrou diferenças significativas para as linhagens ($p>0.05$). No período de 168 horas pós-inoculação houve redução ($p<0,05$) da contagem bacteriana na linhagem pescoço pelado quando comparada à linhagem comercial (Figura 1). As aves não infectadas tiveram resultado negativo para contagem de *S. Enteritidis*.

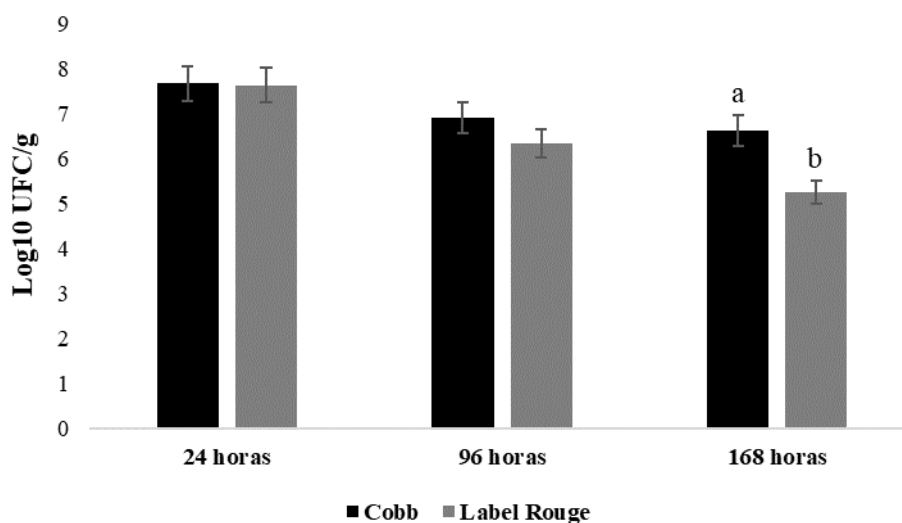


Figura 1. Contagem de bacteriana cecal (UFC/g) de frangos Cobb500® e Label Rouge® desafiados com *Salmonella* com inoculação aos 2 dias de idade das aves. Dentro de cada período de avaliação, letras diferentes indicam respostas diferentes entre linhagens.

Expressão de mRNA de citocinas

A expressão de IL-1beta, IL 8, IL-17 e IL-22 em animais não infectados não foi diferente entre as linhagens às 24 ou às 168 hpi, porém o perfil temporal de expressão foi diferente para todas as interleucinas, exceto a IL-8 (Figura 2). Por exemplo, a expressão de IL-17 em aves Cobb500® mostra-se crescente entre os dois períodos, mas sofreu pequeno decréscimo em aves Label Rouge®. A expressão das interleucinas também sofreu influência da infecção por *S. Enteritidis* (Figuras 3 a 5). Para ambos os períodos avaliados, a expressão de genes no ceco de aves infectadas com cepas de *Salmonella* aumentou significativamente em comparação com a das galinhas de controle não infectadas (Figuras 3 e 4). Aves da linhagem Cobb500® apresentaram níveis significativamente maiores de interleucinas em comparação com aves da linhagem pescoço pelado (Figura 5).

As duas linhagens apresentaram níveis semelhantes ($P>0,05$) de expressão relativa do mRNA das interleucinas 1, 8, 17 e 22 às 24 hpi (3 dias de vida) e às 168 hpi (9 dias de vida) quando não foram infectadas com *Salmonella* (Figura 2). Os níveis de mRNA de interleucinas diminuíram em aves Label Rouge® de 3 para 9 dias, enquanto ficaram semelhantes ou aumentaram no caso de aves Cobb500®, exceto para IL-8.

Ambas as linhagens aumentaram a expressão do mRNA das interleucinas após o desafio com *Salmonella*, mas os níveis somente foram diferentes ($P<0,05$) para IL-8 às 168 h e IL-17 às 24 hpi em aves Cobb500® (Figura 3) e para todas as interleucinas avaliadas às 24hpi em aves Label Rouge® (Figura 4), exceto a IL-22.

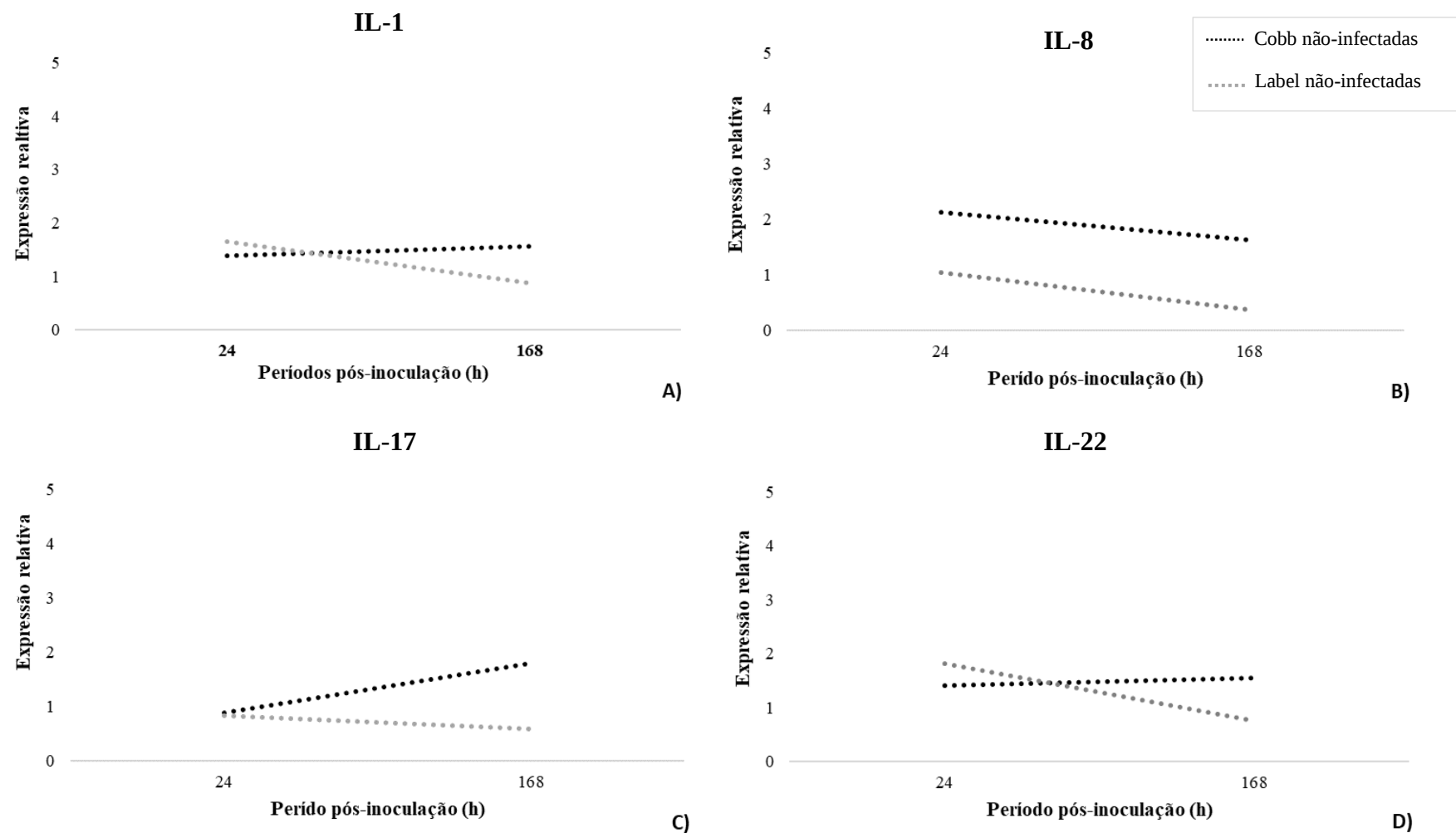


Figura 2. Expressão relativa do mRNA de interleucinas 1 (IL-1, A), 8 (IL-8, B), 17 (IL-17, C) e 22 (IL-22, D) em aves Cobb500® e Label Rouge® não infectadas. Não houve diferenças entre as linhagens para níveis de mRNA de ILs às 24 ou 168 hpi pelo Teste t ($P > 0,05$).

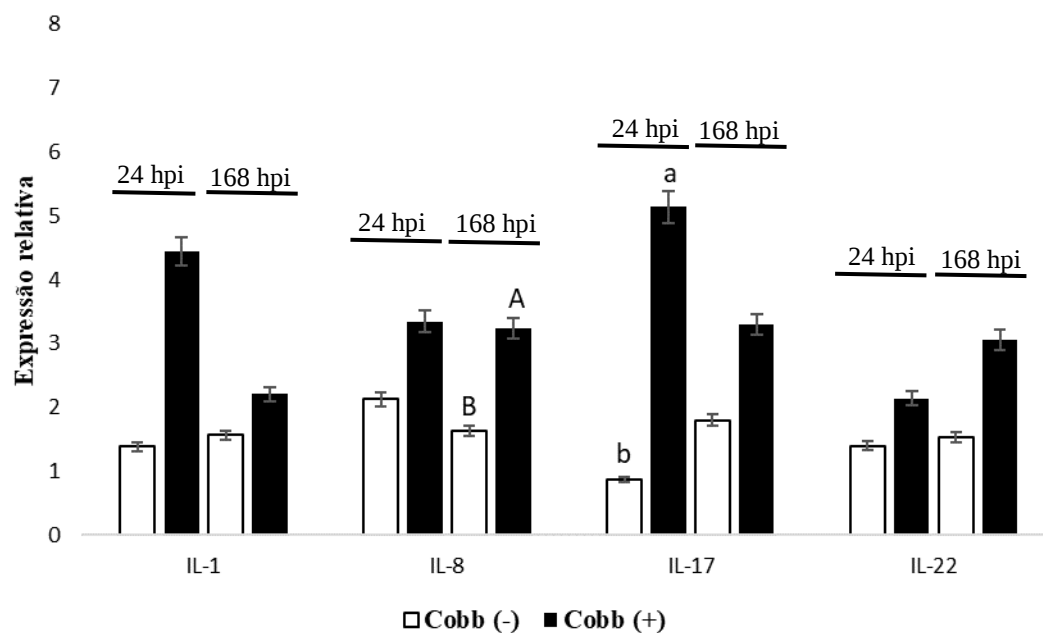


Figura 3. Expressão relativa do mRNA de interleucinas 1 (IL-1), 8 (IL-8), 17 (IL-17) e 22 (IL-22) em aves Cobb500® não infectadas (barras brancas) ou infectadas (barras pretas) às 24 e 168 hpi. Letras minúsculas indicam diferença significativa entre infecção e não infecção às 24 hpi pelo Teste t ($P < 0,05$). Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre infecção e não infecção às 168 hpi pelo Teste t ($P < 0,05$).

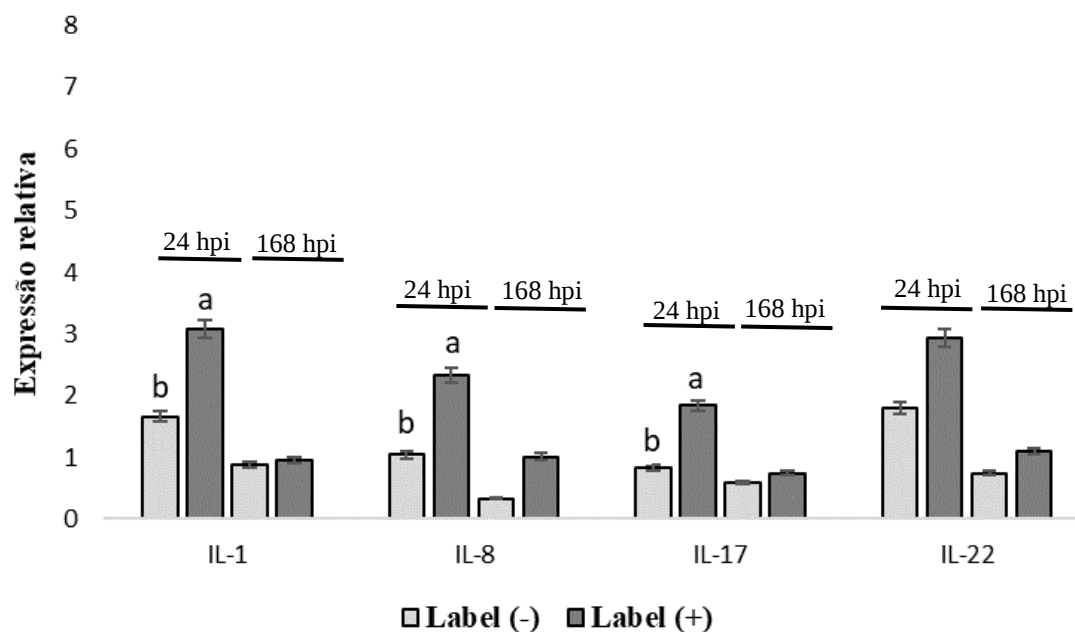


Figura 4. Expressão relativa do mRNA de interleucinas 1 (IL-1), 8 (IL-8), 17 (IL-17) e 22 (IL-22) em aves Label Rouge® não infectadas (barras cinza claras) ou infectadas (barras cinza escuras) às 24 e 168 hpi. Letras minúsculas indicam diferença significativa entre infecção e não infecção às 24 hpi pelo Teste t ($P < 0,05$).

As duas linhagens apresentaram diferenças quanto à expressão do mRNA das interleucinas frente à infecção por *Salmonella* (Figura 5). Apesar de os níveis de mRNA de interleucinas 1, 8 e 22 serem semelhantes às 24 hpi, os níveis de IL-17 são mais altos na linhagem Cobb500®. A expressão do mRNA de todas as interleucinas é maior em aves Cobb500® às 168 hpi, exceto para IL-1.

As duas linhagens apresentaram semelhanças em relação à expressão de mRNA de IL-1 frente ao desafio com *Salmonella* (Figura 5A), mas não em relação às demais interleucinas (Figuras 5B, 5C E 5D). O nível de expressão de IL-1 aumenta nas duas linhagens 24 horas após o desafio e depois cai às 168 hpi, atingindo valores mais baixos que os de aves não desafiadas nas duas linhagens (Figuras 3 e 4). Em aves Label Rouge®, o aumento na expressão às 24hpi é de 2x ($P<0,05$, Figura 4), enquanto em aves Cobb500® o aumento é de 4x ($P>0,05$, Figura 3). Porém, os níveis de mRNA de IL-1 são semelhantes entre as duas linhagens às 24hpi, mas são maiores em aves Cobb500® em comparação às Label Rouge® às 168 hpi ($P<0,05$, Figura 5). De forma semelhante, o nível de mRNA de IL-8 aumenta nas duas linhagens 24 h após infecção, porém o aumento é de 2,2X em aves Label Rouge® ($P<0,05$, Figura 4) e de 1,5X em aves Cobb500® ($P>0,05$, Figura 5). Os níveis de IL-8 sofrem uma queda em aves das duas linhagens às 168 hpi, mas os níveis são diferentes entre aves infectadas e não infectadas apenas para a linhagem Cobb500® (Figura 3, $P<0,05$). Os níveis de mRNA de IL-8 em aves infectadas são semelhantes entre as duas linhagens apenas às 24hpi. Às 168 horas pós-infecção, aves Cobb500® têm níveis mais elevados ($P<0,05$) de mRNA de IL-8 do que aves Label Rouge®. O comportamento dos níveis de mRNA de IL-17 é similar entre as linhagens frente à infecção com *Salmonella* (Figuras 3 e 4). O nível de mRNA de IL-17 aumenta 1X em aves Label Rouge® 24 horas após infecção ($P<0,05$, Figura 4) e depois cai ao mesmo nível que o controle às 168 hpi, enquanto em Cobb500® o nível de IL-17 aumenta 5x às 24 hpi ($P<0,05$, Figura 3), caindo a níveis 2 x mais alto que o controle 168 hpi. A expressão de IL-17 é menor ($P<0,05$) em aves Label Rouge® infectadas em comparação às aves Cobb500® infectadas, tanto às 24 como às 168 hpi (Figura 5C).

Os níveis de expressão de IL-22 agem de forma oposta às demais interleucinas às 24hpi; é a única que tem nível mais elevado em Label Rouge® infectado do que em Cobb500® infectado (Figura 5D), mas a diferença não é significativa. A expressão de mRNA de IL-22 é maior em aves Cobb500® em comparação às aves Label Rouge às 168 hpi ($P<0,05$, Figura 5D). O nível de mRNA de IL-22 em aves Label Rouge® aumenta 1x com infecção, tanto 24 hpi como 168 hpi (Figura 4). Em Cobb500®, o nível de IL-22 aumenta 1x entre 24 e 168 hpi em aves infectadas, mas permanece estável em aves não infectadas entre os dois períodos analisados (Figura 3).

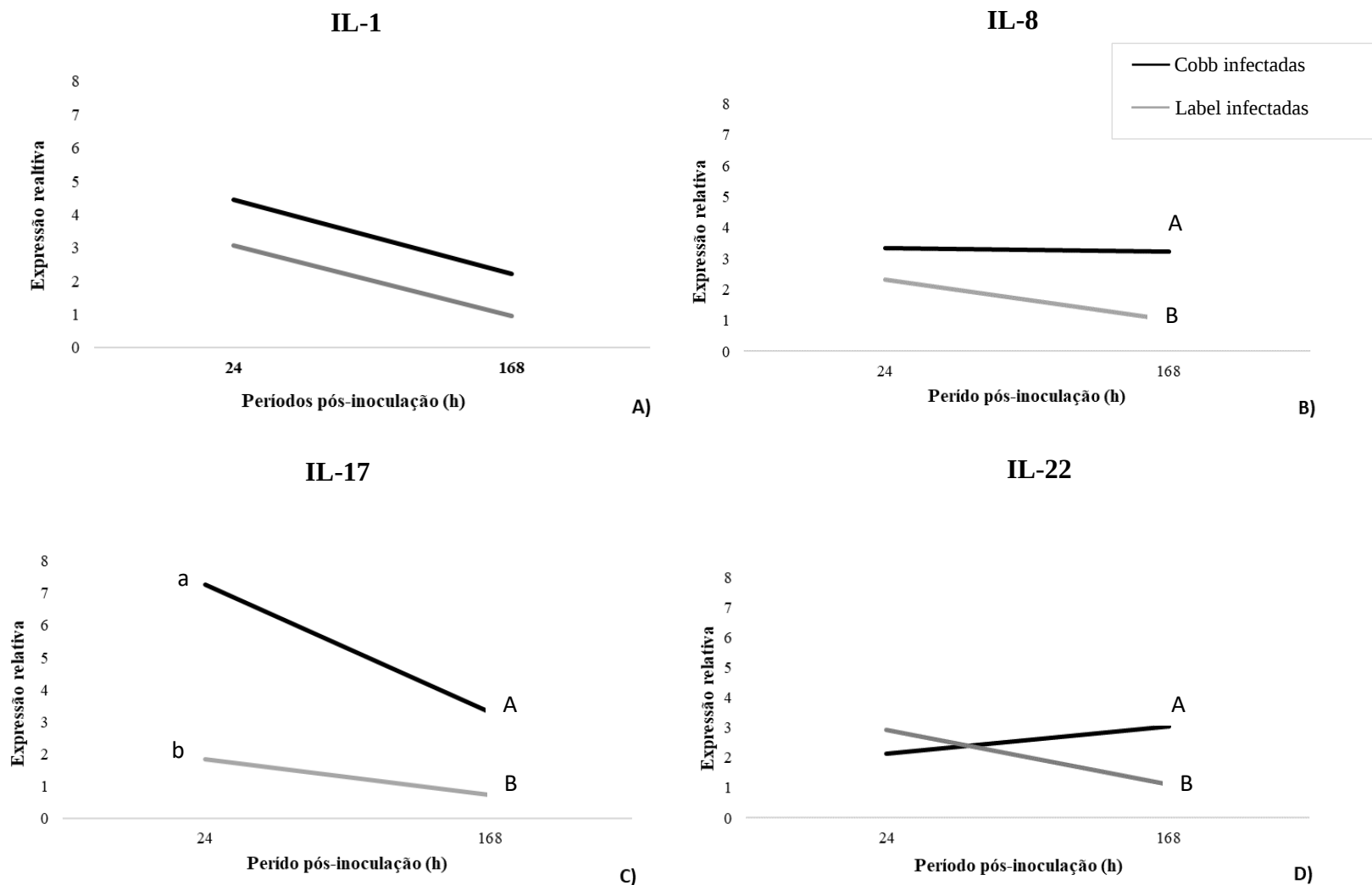


Figura 5. Expressão relativa do mRNA de interleucina 1 (IL-1, A), 8 (IL-8, B), 17 (IL-17, C) e 22 (IL-22, D) em aves Cobb500® (linhas negras) e Label Rouge® infectadas (linhas cinza). Letras diferentes em cada ponto de avaliação indicam diferença significativa entre aves infectadas de diferentes linhagens pelo Teste t ($P < 0,05$). Não há diferença entre linhagens para a expressão de IL-1 quando as aves são infectadas.

5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento da ave após a eclosão envolve uma série de alterações que capacitam o animal a sobreviver em uma condição bastante diferente daquela da incubação. Ajustes fisiológicos ocorrem em sistemas diversos e por períodos de tempo variados. Porém, o trato gastrointestinal precisa adequar-se prontamente, de forma que o alimento possa ser processado adequadamente e que haja energia para que todas as demais funções corporais sejam desempenhadas. A utilização do alimento dependerá não somente de uma série de mudanças fisiológicas, mas também do aparecimento da microbiota comensal que é essencial para a homeostasia gastrointestinal. Portanto, o desenvolvimento da resposta imune no trato gastrointestinal é crucial para permitir tolerância ao estabelecimento da microbiota de interesse. Nesse contexto, os resultados do presente estudo indicam que tal desenvolvimento varia significativamente entre aves de diferentes linhagens, já que a expressão de interleucinas reguladoras do sistema imune aumentou em aves Cobb500 e diminuiu em aves Label Rouge no período desde a eclosão até os 9 dias de idade (9d, 168hpi). Essa diferença pode estar associada a particularidades na estimulação do sistema imunológico pela microbiota comensal que está se estabelecendo no trato gastrointestinal, uma vez que os processos de maturação intestinal e estabelecimento da microbiota ocorrem paralelamente e estão interligados (Kogut et al., 2016).

A presença da *Salmonella* no intestino de aves desencadeia uma série de descritas a seguir (Matulova et al., 2013): 1) sinalização por IL-8 e IL-17 e ativação de mecanismos de defesa mais simples, como lisozima, com pico até os dois dias pós-infecção; 2) aumento da expressão de genes de macrófagos e heterófilos, incluindo a IL-1beta, com pico até os 4dpi; 3) aumento de atividade de linfócitos CD4, com consequente montagem de resposta imune Th1 e controle da infecção entre 5 e 15 dpi; 4) produção de imunoglobulinas G e A após 15dpi, provavelmente direcionadas contra antígenos células T-independentes. No presente estudo, ambas as linhagens apresentaram redução nas contagens de *Salmonella* Enteritidis entre 24 e 168 hpi, fenômeno provavelmente relacionado ao estabelecimento da microbiota comensal e ao desenvolvimento do sistema imune intestinal. Correlacionando os resultados de contagens bacterianas e expressão dos genes de interleucinas, verifica-se menor estímulo a resposta inflamatória em aves Label Rouge, ocorrendo redução significativa de *Salmonella* nas aves desta linhagem às 168 hpi. Diferenças na ontogenia gastrointestinal entre linhagens de crescimento lento e rápido, correlacionadas à menor colonização e maior *clearance* de *Salmonella* nas primeiras já foram descritas (Van Hemert et al., 2006).

O desenvolvimento normal da microbiota ocorre ao mesmo tempo em que o sistema

imune desenvolve tolerância, portanto, há redução das citocinas pró-inflamatórias como mecanismo específico de defesa do hospedeiro para que haja menos impacto sobre a saúde. A ideia central, nesse sentido, é minimizar a resposta inflamatória para reduzir os efeitos negativos sobre a saúde animal (Kogut et al., 2016). A diminuição dos níveis de expressão de todas as interleucinas no tempo em aves Label estaria relacionado, portanto, a maior rapidez no processo de desenvolvimento intestinal (Figura 1).

Os resultados do presente estudo indicam que a maior susceptibilidade das aves de crescimento rápido ao desafio com *Salmonella* foi associada à maior expressão das interleucinas secretadas pelas células Th17, conforme previamente observado (Van Hemert et al., 2006) sobre a maior ativação de células T em comparação com aves de crescimento lento. Rychlik et al. (2014) observaram maior expressão para as IL-1 e IL-8, diretamente ligadas aos macrófagos, em aves de linhagem para crescimento lento, fato não observado neste estudo.

A IL-17 estimula os heterófilos contra a invasão microbiana e aumento de células T regulatórias no ceco de aves infectadas com *Salmonella*, condição associada à maior expressão de citocinas anti-inflamatórias e menor expressão de citocinas pró-inflamatórias (Normaton e Marti, 2013). No presente estudo, as aves não infectadas de ambas linhagens apresentam comportamento de maior indução das citocinas pró-inflamatórias no tempo, mas no desafio a resposta é invertida para a linhagem Cobb500, havendo uma possível regulação da produção das células Th17 pelos heterófilos e consequentemente maior indução da IL-17.

A resposta inflamatória fisiológica à microbiota intestinal comensal ocorre por volta do 4º dia de vida da ave e, quando os animais são infectados após o período de maturação, pode-se observar que as contagens de *Salmonella* no baço e fígado reduzem com o aumento da idade das aves (Crhanova et al., 2011). A resposta inflamatória é dependente do sorotipo de *Salmonella* envolvido; alguns sorotipos podem causar inflamação e não causar a doença, como é o caso da *S. Enteritidis* (Kaiser et al., 2000), o que pode estar relacionado à maior resistência das aves pescoço pelado à cepa utilizada no presente estudo.

A redução da IL-1 no período de 168 horas pode estar relacionada a sua resposta inflamatória rápida na tentativa de combater a invasão bacteriana (Kaiser et al., 2000), tendo sua maior atuação no período de 24 horas pós inoculação. No ceco de aves não inoculadas, a expressão das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e IL-8) teve sua maior expressão aos no intervalo entre 4 e 7 dias de idade. A IL-8 revelou um aumento em 10x no 7º dia de vida e foi possível verificar uma correlação com o aumento de heterófilos (Barshira & Friedman, 2006), comprovando que há um aumento da expressão das citocinas mesmo em condições sem desafio e isso está relacionado ao processo de desenvolvimento do sistema imune, o qual sofre uma

resposta mais rápida à infecção bacteriana.

IL-17 e IL-22 são frequentemente expressos tardiamente, embora em condições específicas. Ambas tiveram aumento na expressão quando induzida pela infecção por *S. Enteritidis* após 24 horas pós inoculação (Crhanova et al., 2011), enquanto no presente estudo apenas a expressão de IL-17 foi afetada pela infecção por *S. Enteritidis* nas duas diferentes linhagens. Os receptores IL-17 foram encontrados em células dendríticas, macrófagos e linfócitos T, indicando seu potencial de regulação da resposta imune (Reynolds et al., 2010). Por outro lado, o receptor de IL-22 foi observado apenas em células não imunes, estimulando-as para a produção de peptídeos antimicrobianos e também estimulando seu crescimento e regeneração durante a infecção. A microbiota normal, portanto, estimula a resposta pró-inflamatória, que devido à ausência de regulação positiva da IL-22, não causa danos nos tecidos (Rutz et al., 2013).

O ceco de aves recém-eclodidas apresenta maior abundância de heterófilos na lâmina própria, seguidos por macrófagos e linfócitos T (Rychilk et al., 2014), células que estão diretamente relacionadas a expressão das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e IL-8). Estes mediadores pro-inflamatórios do intestino desencadeiam o recrutamento de leucócitos e posteriormente linfócitos ao intestino em desenvolvimento (Barshira e Friedman, 2006), processo que demora de uma a duas semanas durante o desenvolvimento do sistema imune. A inoculação das aves deste estudo foi realizada no 2º de vida. Nessa situação, em ambas as linhagens foi observado maior indução da expressão das citocinas IL-1 β e IL-8 às 24 hpi, porém a diferença entre linhagens apenas aos 9 dias de vida (168 horas pós-inoculação). Interessante notar que a expressão de IL-8 manteve-se elevada nas aves de crescimento rápido, e significativamente maior do que na linhagem de crescimento lento às 168 hpi, indicando que a resposta por macrófagos está ativada por um período mais longo nas aves Cobb500.

De maneira geral observou-se que os animais da linhagem Label Rouge®, quando desafiados com *Salmonella*, apresentaram menor expressão dos genes envolvidos com a resposta imune, sendo em alguns casos semelhante aos animais do grupo controle (não desafiado). Assim, o desafio com *Salmonella* parece não ter sido capaz de promover alterações que demandassem maior atenção do sistema imune, permanecendo este em estado de normalidade. Segundo Yalçin et al. (1997) a rusticidade de aves “pescoço pelado” ou “pescoço pelado melhoradas”, ou criações “coloniais”, propiciam a esses animais maior resistência à manifestação de determinadas doenças, o que explica essa melhor resposta dos animais Label Rouge®.

A seleção genética para um crescimento mais rápido nos perus pode afetar a imunidade (Bayyari et al., 1997), o que se estende para linhagens de frangos de corte (Wigley, 2004). A

criação seletiva em galinhas com base em uma característica, como imunoglobulinas G (IgG) ou peso corporal, pode afetar outros genes ou sistemas que associam características fisiológicas únicas à linhagem, em resposta à estimulação a um agente. Aves de linhagem comercial de baixa produtividade tendem a ter um sistema imune mais resistente que as de alta produtividade, entretanto sua adaptação ao meio ambiente foi modificada pela maior relação H:L (Heterófilo:Linfócito), parâmetro de avaliação de estresse ambiental (Cheng et al., 2011).

Estudos anteriores de nossa equipe têm indicado menor injúria intestinal frente ao desafio com *S. Enteritidis* quando as aves são submetidas previamente a tratamentos tão diversos quanto diferentes níveis de treonina na ração ou injetada *in ovo* e o aumento de temperatura de incubação (Santos et al., 2013; Moreira Filho et al., 2015; Hermenegildo, 2017; Moreira Filho, 2017). Kogut et al. (2016) mostraram que a presença de *Salmonella* Enteritidis provoca um processo de tolerância semelhante ao que é estabelecido para a microbiota comensal, induzindo ao aparecimento de aves com o estado de hospedeiro assintomático. Animais infectados por *S. Enteritidis* apresentam aumento do número de heterófilos na lâmina própria do intestino e da expressão de citocinas pró-inflamatórias. Na situação específica de estabelecimento da tolerância, a expressão de citocinas é diminuída e a resposta inflamatória intestinal torna-se menos exacerbada, com aumento da expressão de citocinas anti-inflamatórias e menor efeito negativo sobre a saúde.

6. CONCLUSÃO

Há diferenças na expressão de interleucinas reguladoras da resposta imune entre as linhagens Label Rouge[®] e Cobb500, indicando haver desenvolvimento mais precoce do sistema imune na primeira linhagem. Esse desenvolvimento está possivelmente associado à maior tolerância ao desafio por *S. Enteritidis* aos 2 dias de idade.

7. IMPLICAÇÕES FINAIS

A elucidação de resistência das aves a infecção para as diferentes linhagens ainda não foi totalmente decifrada, havendo necessidade de mais estudos no intuito de unir dados sobre caracterização dos sistemas nas diferentes linhagens e que possam ser utilizadas para o melhoramento das aves de linhagens comerciais de alto rendimento. Estudos que enfoquem o desenvolvimento da microbiota intestinal e a expressão concomitante de citocinas sob condições normais de crescimento ou sob desafio com *Salmonella* contribuirão para entender quais vias são utilizadas para montar a resposta imune.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBINO, L.F.T.; TAVERNARI, F.C.; VIEIRA, R.A.; SILVA, E.P.(1953) Criação de frango e galinha caipira: sistema alternativo de criação de aves. Edição 22.Viçosa: Editora Aprenda Fácil, 2014. 310p.

BARSHIRA, E.; FRIEDMAN, A. Development and adaptations of innate immunity in the gastrointestinal tract of the newly hatched chick. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 30, n. 10, p. 930–941, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde: Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimento. Brasília, DF, 2010. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_vigilancia_doencas_alimentos.pdf>

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde: Departamento de Vigilância em Apoio a Gestão de Vigilância em Saúde. Manual técnico de diagnóstico laboratorial da *Salmonella* spp. Brasília, DF, 2011. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2014/dezembro/15/manual-diagnostico-salmonella-spp-web.pdf>>

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde: Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Unidade de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil. Brasília, DF, 2016. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresenta---o-Surtos-DTA-2016.pdf>>

BAYYARI, G. R.; HUFF, W. E.; RATH, N. C.; BALOG, J. M.; NEWBERRY, L. A.; VILLINES, J. D.; SKEELES, J. K.; ANTHONY, N. B.; NESTOR, K. E. Effect of the genetic selection of turkeys for increased body weight and egg production on immune and physiological responses. **Poultry Science**, v. 76, n. 2, p. 289–296, 1997.

BERNDT, A.; WILHELM, A.; JUGERT, C.; PIEPER, J.; SACHSE, K.; METHNER, U. Chicken Cecum Immune Response to Salmonella Enterica Serovars of Different Levels of Invasiveness. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 12, p. 5993–6007, 1 dez. 2007.

BOCKMAN, D. E.; COOPER, M. D. Pinocytosis by epithelium associated with lymphoid follicles in the bursa of Fabricius, appendix, and Peyer's patches. An electron microscopic study. *Developmental Dynamics*, v. 136, n. 4, p. 455–477, 1973.

CHENG, H. W.; EICHER, S. D.; CHEN, Y.; SINGLETON, P.; MUIRT, W. M. Effect of genetic selection for group productivity and longevity on immunological and hematological parameters of chickens. **Poultry science**, v. 80, n. 8, p. 1079–1086, 2001.

COBLE, D. J.; REDMOND, S. B.; HALE, B.; LAMONT, S. J. Distinct Lines of Chickens Express Different Splenic Cytokine Profiles in Response to Salmonella Enteritidis Challenge. **Poultry Science**, v. 90, n. 8, p. 1659–1663, 1 ago. 2011.

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

CROSSLEY, D. A.; ALTIMIRAS, J. Effect of selection for commercially productive traits on the plasticity of cardiovascular regulation in chicken breeds during embryonic development. **Poultry Science**, v. 91, n. 10, p. 2628–2636, 2012.

DAVISON, F.; KASPERS, B.; SCHAT, K. A. (ed.). **Avian immunology**. Amsterdam: Elsevier, AP, 2008.

FOLEY, S. L.; JOHNSON, T. J.; RICKE, S. C.; NAYAK, R.; DANZEISEN, J. *Salmonella* pathogenicity and host adaptation in chicken-associated serovars. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 77, n. 4, p. 582–607, 1 dez. 2013.

ESTADOS UNIDOS, USDA. **Statistics for Meat and Poultry**, 2017. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/home/statsByCountry>>

ESTADOS UNIDOS, CDC. Infection with *Salmonella*: *Salmonella* in the Caribbean 2013. Disponível em: <https://www.cdc.gov/training/SIC_CaseStudy/Infection_Salmonella_ptversion.pdf>

GEYRA, A.; UNI, Z.; SKLAN, D. Enterocyte dynamics and mucosal development in the posthatch chick. **Poultry Science**, v. 80, n. 6, p. 776–782, 2001.

HAN, G. G.; KIM, E. B.; LEE, J.; LEE, J.-Y.; JIN, G.; PARK, J.; HUH, C.-S.; KWON, I.-K.; KIL, D. Y.; CHOI, Y.-J.; KONG, C. Relationship between the Microbiota in Different Sections of the Gastrointestinal Tract, and the Body Weight of Broiler Chickens. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, dez. 2016.

HARMON, B. G. Avian Heterophils in Inflammation and Disease Resistance. **Poultry Science**, v. 77, n. 7, p. 972–977, jul. 1998.

HERMENEGILDO, E. B. Contagem bacteriana cecal, morfometria intestinal e desempenho de frangos comerciais e Label Rouge desafiados com *Salmonella* Enteritidis. 2017. 38 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)- Universidade Federal da Paraíba – UFPB. Paraíba, 2017.

JANEWAY Jr, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. J. The Mucosal Immune System. 5ª edição. New York, Garland Science. 2001.

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

KOGUT, M.; SWAGGERTY, C.; BYRD, J.; SELVARAJ, R.; ARSENAULT, R. Chicken-Specific Kinome Array Reveals That *Salmonella* Enterica Serovar Enteritidis Modulates Host Immune Signaling Pathways in the Cecum to Establish a Persistence Infection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, p. 1207, 27 jul. 2016.

LINEHAN, E.; FITZGERALD, D. Ageing and the immune system: focus on macrophages. **European Journal of Microbiology and Immunology**, v. 5, n. 1, p. 14–24, mar. 2015.

LUPATINI, F. Avaliação do efeito de variáveis produtivas na conversão alimentar de frangos de corte. 2015.

MATULOVA, M.; VARMUZOVA, K.; SISAK, F.; HAVLICKOVA, H.; BABAK, V.; STEJSKAL, K.; ZDRAHAL, Z.; RYCHLIK, I. Chicken innate immune response to oral infection with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Veterinary research*, v. 44, n. 1, p. 37, 2013.

MCGEACHY, M. J.; MCSORLEY, S. J. Microbial-Induced Th17: Superhero or Supervillain? **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 189, n. 7, p. 3285–3291, 1 out. 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria no. 204, de 17 de fevereiro de 2016 Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública. Disponível em: <bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2016/prt0204_17_02_2016.html>

MOREIRA FILHO, A.L. de B; OLIVEIRA, C.J.B. de, OLIVEIRA, H.B. de, CAMPOS, D.B, GUERRA, R.R; COSTA, F.G.P; GIVISIEZ, P.E.N, 2015. High incubation temperature and threonine dietary level improve ileum response against post-hatch *Salmonella* Enteritidis inoculation in broiler chicks. **PloS one**, vol.10, pp. e0131474.

MOREIRA FILHO, A.L. de B; Enriquecimento do âmnio com treonina em embriões de frangos de corte: 1. Desempenho e morfofisiologia intestinal e 2. Efeito sobre a contagem de *Salmonella* Enteritidis e microbiota cecal. 2017. 138p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal da Paraíba – UFPB. Paraíba, 2017.

NORMATON, M.; MARTI, L. C. Dados recentes em IL-17 e células Th17, e implicações na doença do enxerto contra hospedeiro. **Einstein.[si]**, v. 11, n. 2, 2013.

PABST, R. The anatomical basis for the immune function of the gut. **Anatomy and embryology**, v. 176, n. 2, p. 135–144, 1987.

PAN, D.; YU, Z. Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. **Gut Microbes**, v. 5, n. 1, p. 108–119, jan. 2014.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in Real-Time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. e45, 1 maio 2001.

QURESHI, M. A.; HUSSAIN, I.; HEGGEN, C. L. Understanding immunology in disease development and control. **Poultry science**, v. 77, n. 8, p. 1126–1129, 1998.

RAMANAN, D.; CADWELL, K. Intrinsic defense mechanisms of the intestinal epithelium. **Cell Host & Microbe**, v. 19, n. 4, p. 434–441, abr. 2016.

REDMOND, S. B.; CHUAMMITRI, P.; ANDREASEN, C. B.; PALIĆ, D.; LAMONT, S. J. Chicken Heterophils from Commercially Selected and Non-Selected Genetic Lines Express Cytokines Differently after in Vitro Exposure to *Salmonella* Enteritidis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 132, n. 2–4, p. 129–134, 15 dez. 2009.

REYNOLDS, J. M.; ANGKASEKWINAI, P.; DONG, C. IL-17 Family member cytokines: regulation and function in innate immunity. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 21, n. 6, p. 413–423, dez. 2010.

RYCHLIK, I.; ELSHEIMER-MATULOVA, M.; KYROVA, K. Gene expression in the chicken caecum in response to infections with non-typhoid Salmonella. **Veterinary research**, v. 45, n. 1, p. 119, 2014.

ROSTAGNO, H.S. ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L.; GOMES, P.C.; OLIVEIRA, R.F.; LOPES, D.C.; FERREIRA, A.S.; BARRETO, S.L.T.; EUCLIDES, R.F. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3.ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa. 252p. 2011.

RUTZ, S.; EIDENSCHENK, C.; OUYANG, W. IL-22, not simply a Th17 cytokine. **Immunological reviews**, v. 252, n. 1, p. 116–132, 2013.

SANTOS, E.G.; COSTA, F.G.P.; SILVA, J.H.V. et al. Protective effect of mannan oligosaccharides against early colonization by Salmonella Enteritidis in chicks is improved by higher dietary threonine levels. **Journal of Applied Microbiology**, v.114, p.1158–1165, 2013.

SHAW, M. H.; KAMADA, N.; KIM, Y.-G.; NÚÑEZ, G. Microbiota-Induced IL-1 β , but Not IL-6, Is Critical for the Development of Steady-State T_H 17 Cells in the Intestine. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 2, p. 251–258, 13 fev. 2012.

SMITH, A.L.; POWERS, C.; BEAL, R. The avian enteric immune system in health and disease. In: Schat KA, Kaspers B, Kaise P. editors. Avian Immunology. London: Academic Press; 2014. p 227–250.

UNIÃO EUROPEIA. European Centre for Disease Prevention and Control and European Food Safety Authority. Multicountry outbreak of Salmonella Enteritidis infections linked to Polish eggs. ECDC and EFSA: Stockholm and Parma; 2017. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/sp.efsa.2017.EN-1353/pdf>>

VAN HEMERT, S.; HOEKMAN, A. J. W.; SMITS, M. A.; REBEL, J. M. J. Gene expression responses to a Salmonella infection in the chicken intestine differ between lines. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 114, n. 3, p. 247–258, 15 dez. 2006.

VARMUZOVA, K.; MATULOVA, M. E.; SEBKOVA, A.; SEKELOVA, Z.; HAVLICKOVA, H.; SISAK, F.; BABAK, V.; RYCHLIK, I. The early innate response of chickens to *Salmonella* enterica is dependent on the presence of O-Antigen but not on serovar classification. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 24 abr. 2014.

VARMUZOVA, K.; FALDYNOVA, M.; ELSHEIMER-MATULOVA, M.; SEBKOVA, A.; POLANSKY, O.; HAVLICKOVA, H.; SISAK, F.; RYCHLIK, I. Immune protection of chickens conferred by a vaccine consisting of attenuated strains of Salmonella Enteritidis, Typhimurium and Infantis. **Veterinary Research**, v. 47, n. 1, dez. 2016.

VELOSO, R. de C. **Padrão de crescimento, parâmetros de desempenho e divergência genética de genótipos de frangos tipo caipira**. 2012. UFVJM, 2012.

WIGLEY, P. Genetic Resistance to *Salmonella* infection in domestic animals. **Research in Veterinary Science**, v. 76, n. 3, p. 165–169, jun. 2004.

YALCIN, S.; SETTAR, P.; OZKAN, S.; CAHANER, A. Comparative evaluation of three commercial broiler stocks in hot versus temperate climates. **Poultry Science**, v. 76, n. 7, p. 921–929, 1997.

YEGANI, M.; KORVER, D. R. Factors affecting intestinal health in poultry. **Poultry Science**, v. 87, n. 10, p. 2052–2063, 1 out. 2008.

ZHANG, J.-M.; AN, J. Cytokines, Inflammation, and Pain: **International Anesthesiology Clinics**, v. 45, n. 2, p. 27–37, 2007.

ZELANTE, T.; IANNITTI, R.; DE LUCA, A.; ROMANI, L. IL-22 in antifungal immunity. **European Journal of Immunology**, v. 41, n. 2, p. 270–275, fev. 2011.