



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA
CENTRO DAS CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA

FERNANDO DO PRADO VIEIRA

**MECANISMOS DE PROTEÇÃO IMUNOLÓGICA INDUZIDOS POR
VITAMINA D3 EM *C. ELEGANS* DURANTE A INFECÇÃO POR *SALMONELLA*
TYPHIMURIUM**

Barreiras - BA

2022

FERNANDO DO PRADO VIEIRA

**MECANISMOS DE PROTEÇÃO IMUNOLÓGICA INDUZIDOS POR
VITAMINA D3 EM *C. ELEGANS* DURANTE A INFECÇÃO POR *SALMONELLA*
TYPHIMURIUM**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal do Oeste da Bahia, como requisito
parcial para obtenção do Diploma de Graduação no
Curso de Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Jonilson Berlink Lima

Coorientador: Prof. Dr. Raphael Contelli Klein

Barreiras - BA

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

V657 Vieira, Fernando do Prado.

Mecanismos de proteção imunológica induzidos por vitamina D3 em *C. elegans* durante a infecção por *Salmonella* Typhimurium. / Fernando do Prado Vieira. – 2022.

56f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Jonilson Berlink Lima.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) –. Universidade Federal do Oeste da Bahia. Centro das Ciências Biológicas e da Saúde. Barreiras, BA, 2022.

1. Salmonela e doenças bacilares. 2. Resposta imune inata. 3. Colecalciferol. I. Lima, Jonilson Berlink. II. Universidade Federal do Oeste da Bahia - Centro das Ciências Biológicas e da Saúde. III. Título.

CDD 614.51

Biblioteca Universitária de Barreiras - UFOB

FERNANDO DO PRADO VIEIRA

**MECANISMOS DE PROTEÇÃO IMUNOLÓGICA INDUZIDOS POR
VITAMINA D3 EM *C. ELEGANS* DURANTE A INFECÇÃO POR
SALMONELLA TYPHIMURIUM**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal do Oeste da Bahia, como
requisito parcial para obtenção do Diploma de
Graduação no Curso de Farmácia.

Aprovado em 12 de julho de 2022.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Jonilson Berlink Lima

Prof. Dra. Dayane Otero Rodrigues

Prof. Dra. Jamile Souza Fernandes

Este trabalho é dedicado, primeiramente, a Deus, o escritor da minha história. E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram durante a minha jornada acadêmica e na produção desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

A finalização do tão temido “trabalho de conclusão de curso” está sendo um marco importante durante a minha jornada acadêmica. Durante toda a produção vários desafios e obstáculos foram surgindo e com o apoio de muitos foi possível superá-los. Aproveito a oportunidade para agradecer a todos que de alguma forma fizeram parte disso.

Agradeço primeiramente a Deus por sempre estar ao meu lado e não me permitir desistir, por fazer surgir forças quando eu já não tinha mais, pelas oportunidades que me foram dadas durante todo o percurso até aqui e todas as outras muitas coisas que Ele vem realizando em minha vida.

Sou muito grato à minha família pelo apoio e incentivo durante os anos de graduação. Em especial a minha mãe pelo companheirismo em todos os momentos, principalmente naqueles de dificuldades em que ela nunca me abandonou.

Aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado me dando apoio, me incentivando e acreditando em mim. Até aqueles que de alguma forma sempre estiveram presentes apesar da distância. Em especial o Murilo, a Hélbya (minha parceira de estudos) e o Lucas por sempre ouvirem as minhas lamentações, me apoiarem e estarem ao meu lado nos momentos mais difíceis e por não permitirem eu me sentir insuficiente ou incapaz, sempre acreditarem em mim e por compartilhar tantos momentos durante toda a trajetória na faculdade. Muita gratidão.

Não posso deixar de agradecer aos outros muitos amigos que também fizeram parte da minha trajetória acadêmica e da minha vida em diversos momentos: Shâmara, Giovanna, Raquel, Leidiane, Eduarda, Leoney, Douglas, Daniel, Luara, Dayse, Vitória, Nilde, Jonatas, Manoel, Ingrid, Bruna, Lucileia e o Uelton.

Agradeço ao pessoal do NAIVE pelo apoio, em especial as professoras Mary Hellen e Larissa por sempre estarem dispostas a nos ajudar quando surgiam dificuldades. Os colegas de iniciação científica que também me ajudaram muito: Ilana, Itana, Nino, Mara e a Uandala. Em especial, queria agradecer aos colegas Vitor, Dany, Bárbara e Julia por todo o apoio no laboratório quando era preciso e por compartilharem conhecimentos e experiências comigo.

Muita gratidão também as “tias da limpeza” por toda a simpatia diária que elas me traziam no laboratório, pelas conversas e apoio em muitos perrengues.

Por fim e não menos importante eu gostaria de agradecer aos meus orientadores, os professores Jonilson e Raphael. Sou imensamente grato a vocês por todo o conhecimento que vocês compartilharam comigo, pela dedicação, paciência e por não desistirem do nosso trabalho mesmo com tantas dificuldades enfrentadas. Ao professor Jonilson, em especial, gostaria de

agradecer por tudo e por tanto, muitas das minhas realizações acadêmicas não teriam se concretizado se você não tivesse acreditado em mim e me apoiado tanto.

Enfim, eu agradeço do fundo do meu coração a todos vocês.

“Não é sobre ganhar, é sobre não desistir. Se você tem um sonho, lute por ele. Existe uma disciplina. Não é sobre quantas vezes você foi rejeitado, caiu e teve que levantar. É quantas vezes você fica em pé, levanta a cabeça e segue em frente”

Lady Gaga

RESUMO

Introdução: *Caenorhabditis elegans* é um nematóide que apresenta uma imunidade inata, que pode ser ativada durante a infecção por microrganismos patogênicos, como *Salmonella*. O Sorotipo *S. entérica* Typhimurium é uma bactéria gram-negativa que atua colonizando as células intestinais do hospedeiro, sendo um dos principais agentes causadores da febre não tifóide. A vitamina D3 aparece como um importante modulador da resposta imune inata intestinal, o que torna importante a realização de estudos para explorar o seu papel protetor no contexto da infecção por *Salmonella* Typhimurium. **Objetivo:** Neste estudo, foi utilizado o organismo modelo *C. elegans* para investigar o efeito protetor de vitamina D3 durante a infecção por *S. Typhimurium*. **Métodos:** O organismo modelo *C. elegans* foi infectado em sua fase L1 com *S. Typhimurium* na presença e ausência de vitamina D3. A sobrevivência e expressão gênica do nematóide em resposta a infecção foi avaliada, além do crescimento bacteriano e a formação de biofilme pela *S. Typhimurium* na presença de vitamina D3. **Resultados:** Foi observado que durante a infecção a vitamina D3 induziu a expressão de genes SKN-1, SPP-1, SEK-1 e PMK-1, constitutivos da resposta imune inata de *C. elegans*, aumentando a sobrevivência desse nematóide. Por outro lado, a presença da vitamina não teve influência no crescimento bacteriano. A vitamina D3 foi capaz de induzir a formação de biofilme nas culturas de forma dose dependente. **Conclusão:** A vitamina D3 foi capaz de aumentar a sobrevivência do *C. elegans* de forma dose dependente e modulou a expressão genes envolvidos na resposta imune inata durante a infecção por *S. Typhimurium*. Além disso, esta vitamina promoveu a indução da formação de biofilme pela *S. Typhimurium*, mecanismo anteriormente descrito como ativador da resposta imune em *C. elegans*.

Palavras-chave: *Salmonella*. Organismo modelo. Colecalciferol. Resposta imune inata. Biofilme

ABSTRACT

Introduction: *Caenorhabditis elegans* is an innate pathogen that can be activated during infection by microorganisms such as *Salmonella*. The *S. enterica* Typhimurium serotype is a gram-negative bacterium that colonizes the host's intestinal cells, being one of the main causes of non-typhoid fever. Vitamin D3 as an important modulator of the intestinal innate immune response, which makes it important to carry out studies to explore its protective role in the context of *Salmonella* Typhimurium infection. **Objective:** In this study, the model organism *C. elegans* was used to investigate the protective effect of vitamin D3 during *S. Typhimurium* infection. **Methods:** The model organism *C. elegans* was infected in its L1 phase with *S. Typhimurium* in the presence and absence of vitamin D3. Survival and nematode gene expression in response to infection were evaluated, in addition to bacterial growth and biofilm formation by *S. Typhimurium* in vitamin D3. **Results:** It was observed that during the infection by a vitamin D3 induced the expression of genes SKN-1, SPP-1, SEK-1 and PMK-1, constitutive of the innate immune response of *C. elegans*, increasing the survival of this nematode. On the other hand, the presence of the vitamin had no influence on bacterial growth. Vitamin D3 was able to induce a biofilm formation in cultures in a dose-dependent manner. **Conclusion:** Vitamin D3 was able to increase *C. elegans* survival in a dose-dependent manner and modulate the expression of genes involved in the innate immune response during *S. Typhimurium* infection. Furthermore, this vitamin promoted the induction of biofilm formation by *S. Typhimurium*, a response previously described as activating the immune mechanism in *C. elegans*.

Key words: *Salmonella*. Model organism. Cholecalciferol. Innate immune response. Biofilm

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Anatomia do <i>C. elegans</i>	16
Figura 2 - Representação do ciclo de vida do <i>C. elegans</i> em 20 °C: do embrião à fase adulta.	17
Figura 3 - Representação de vias de sinalização indutoras da resposta imune inata do <i>C. elegans</i> em resposta ao estresse oxidativo e a infecção.....	20
Figura 4 - Efeitos da vitamina D3 na resposta imune.....	24
Figura 5 – Método de sincronização da população de <i>C. elegans</i>	29
Figura 6 - Metodologia para análise de qPCR.....	32
Figura 7 - Avaliação da formação de biofilme.	33
Figura 8 - Metodologia para análise de crescimento bacteriano.	33
Figura 9 – Análise de sobrevivência de <i>C. elegans</i> tratado com vitamina D3 durante infecção por <i>S.</i> <i>Typhimurium</i>	36
Figura 10 - Análise da área sob a curva (AUC) da sobrevivência de <i>C. elegans</i> durante infecção por <i>S. Typhimurium</i>	37
Figura 11 - Expressão de genes da resposta imune inata em <i>C. elegans</i>	38
Figura 12 - Formação de biofilme por <i>S. Typhimurium</i> na presença de vitamina D3.....	39
Figura 13 - Crescimento de <i>S. Typhimurium</i> na presença de vitamina D3.....	40
Figura 14 - Regulação ambiental do estilo de vida da <i>S. Typhimurium</i>	42

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Sequências de primers utilizados para qPCR	31
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg - Micrograma

µM - Micromolar

DAF 16 - Fator de transcrição ortólogo ao FOXO

DMSO - Dimetilsulfóxido ou sulfóxido dimetilo

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DNAc - Ácido desoxirribonucleico complementar

ERK - Quinase ativada por sinal extracelular

ERN - Espécie Reativa de Nitrogênio

ERO - Espécie Reativa de Oxigênio

FOXO - Fator de transcrição “Forkhead box O”

IL-1-β - Interleucina 1 beta

IFN- γ - Interferon gama

L1 - Larvas no 1^a estágio de desenvolvimento

L2 - Larvas no 2^a estágio de desenvolvimento

L3 - Larvas no 3^a estágio de desenvolvimento

L4 - Larvas no 4^a estágio de desenvolvimento

LAIVE - Laboratório de Agentes Infeciosos e Vetores

LB - Luria Bertani (meio de cultivo para bactérias)

M9 - Tampão isosmótico

MAPK - Proteínas ativadas por mitógenos

mL - Mililitro

N2 - Cepa selvagem de *C. elegans*

NFκB - Fator nuclear κB

NGM - Meio de cultura para nematóide

OP50 - Linhagem de bactéria da espécie *Escherichia coli*

PMK-1 - Ortólogo da MAPK11 humana e MAPK14

Primer - Seguimento de ácidos nucleicos

NRF2 - Fator 2 relacionado ao fator nuclear do eritróide 2

RNA - Ácido ribonucleico

RNAi - Ácido ribonucleico de interferência

RPM - Rotação por minuto

SEK-1 - MAP2K da via da p38 em *C. elegans*

SKN-1 - SkiNhead Ortólogo de Nrf em *C. elegans*

RT-qPCR - Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase

TSB - Meio de cultura nutritivo não seletivo

UFOB - Universidade Federal do Oeste da Bahia

LISTA DE SÍMBOLOS

K - Kappa

β - Beta

γ - Gama

μ - Micro

μM – Micro molar

n - Nano

nM - Nano molar

°C - Graus centígrados

% - Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1	C. elegans.....	16
2.2	Salmonella	22
2.3	Vitamina D.....	23
3	OBJETIVOS.....	27
3.1	Objetivo geral	27
3.2	Objetivos específicos	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1	Crescimento e manutenção do C. elegans	28
4.2	Crescimento e manutenção da S. Typhimurium.....	29
4.3	Crescimento e manutenção da E. coli.....	29
4.4	Ensaio de sobrevivência	30
4.5	Extração de RNA e reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-qPCR).....	30
4.6	Ensaio da formação de biofilme	32
4.7	Ensaio de crescimento bacteriano.....	33
4.8	Análises estatísticas	34
4.9	Determinação dos grupos experimentais	34
5	RESULTADOS.....	36
5.1	Análise de sobrevivência	36
5.2	Expressão gênica.....	37
5.3	Produção de biofilme	38
5.4	Crescimento Bacteriano	39
6	DISCUSSÃO.....	41
7	CONCLUSÃO	44
	REFERÊNCIAS	45
	APENDICE A – Protocolos de execução	51

1 INTRODUÇÃO

Salmonella entérica sorotipo Typhimurium é um agente infeccioso causador da febre não tifoide (MANDAL; JIANG; KWON, 2021). Esse microrganismo está associado a altas taxas de morbidade e mortalidade, com o surgimento de várias cepas resistentes, tornando-se um problema de saúde global. *S. Typhimurium* atua colonizando células intestinais do hospedeiro e por consequência ativando a resposta imune (GAYET *et al.*, 2017).

Durante um processo infeccioso o organismo atua ativando diferentes vias do sistema imunológico para impedir a ação do agente causador e manter a homeostasia (neutralizando ou causando a morte do microrganismo) (ABBAS; LICHTMAN, 2005). Desse modo, o sistema imune e os mecanismos de proteção são alvos de vários estudos. Estes estudos são de extrema importância para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o controle de infecções.

Diversos nutrientes são essenciais para que o sistema imune atue de forma eficiente no combate ao patógeno. A vitamina D é um dos nutrientes essenciais da dieta humana e de grande relevância para vários processos fisiológicos como, por exemplo, a mineralização óssea. A deficiência desse nutriente está relacionada com uma série de distúrbios relacionados ao sistema imune em patologias, tais como psoríase, esclerose múltipla, artrite reumatoide, tuberculose e COVID-19 (CHAROENNGAM; HOLICK, 2020). Todavia, os mecanismos de ação pelos quais essa vitamina atua no sistema imune não são completamente conhecidos.

Os avanços nos estudos com o *Caenorhabditis elegans* permitiram um olhar mais ampliado quanto ao seu uso como organismo modelo e trouxe vários benefícios na área da ciência. Atualmente, o *C. elegans* vem sendo cada vez mais utilizado em estudos dos mecanismos de doenças infecciosas por apresentar características como fácil cultivo e ciclo de vida curto, o que tornam esse nematoide ideal como organismo modelo para estudos *in vivo* (MAGLIONI, 2016).

Diante dessa perspectiva, nesse estudo avaliamos os efeitos imunomoduladores da vitamina D3 durante infecção por *S. Typhimurium*, utilizando o *C. elegans* como organismo de ensaio. Trata-se de um estudo de natureza fundamental que contribuirá com o enriquecimento do conhecimento científico, por meio de dados quantitativos e qualitativos obtidos a partir de testes experimentais.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 *C. elegans*

Caenorhabditis elegans é um nematoide simples e assim como qualquer outro animal apresenta constituição anatômica básica (sistema nervoso, sistema digestório, tecido muscular, pele etc.) (Figura 1) (BLAXTER, 2011). Essas estruturas anatômicas foram adquiridas por meio da conservação de genes advindos de um ancestral comum aos humanos durante o processo evolutivo. Embora existam diferenças fisiológicas e no desenvolvimento entre esses organismos, é possível estudar os mecanismos básicos de operação dos genes em humanos a partir da expressão gênica do *C. elegans* (ABOUBAKER; BLAXTER, 2000; CUTTER, 2010). Esse nematoide é transparente durante todo o seu ciclo de vida, o que facilita a observação dos seus tecidos em diferentes tipos microscopia. Além disso, seu ciclo de vida curto permite a obtenção de uma quantidade expressiva de indivíduos para experimentação sem a necessidade de aprovação em comitê de ética experimental. Por fim, o custo de manutenção das culturas desse verme é baixo comparando com outros organismos modelos, pois o seu cultivo é realizado em placas de ágar ou culturas líquidas contendo a bactéria *Escherichia coli* como fonte de alimento (SULSTON J.E, 1985; RIDDLE, 1978 apud BLAXTER, 2011).

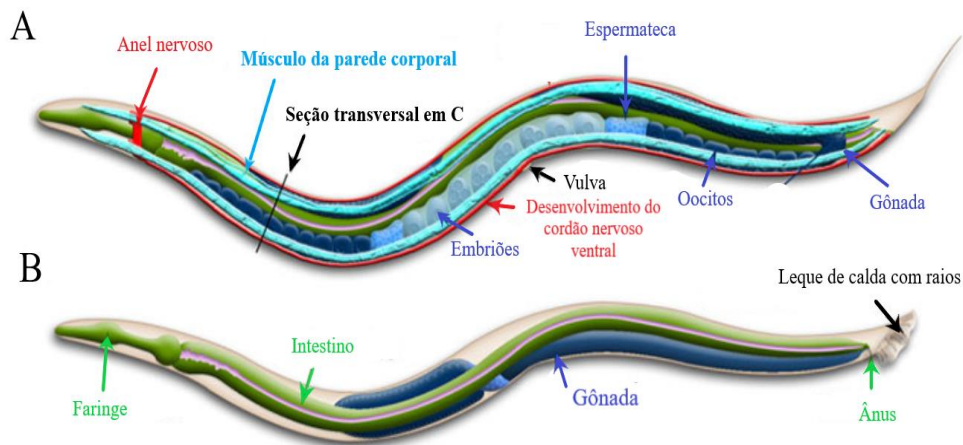


Figura 1 - Anatomia do *C. elegans*. Principais características anatômicas do verme adulto hermafrodita (A) e do verme adulto macho (B). Fonte: adaptado de Chalfie (2015).

O *C. elegans* é um animal de vida livre que inicialmente foi descrito como um nematoide de solo sendo encontrado em locais que apresentam decomposição de matéria orgânica. Na natureza ele se alimenta de diferentes tipos de bactérias, como a *Comomonas* spp. e

Pseudomonas medocina. Para estudos em laboratório o mais comum é a utilização de *Escherichia coli* cepa OP50 como fonte de alimento, pois é uma bactéria de fácil cultivo, reprodução simples e que não é virulenta para o nematoide (ZEČIĆ *et al.*, 2019).

O verme adulto é constituído por cerca de 1000 células somáticas e de 1000-2000 células germinativas. Seu corpo é alongado bilateralmente simétrico, sua boca e cérebro se localizam na extremidade anterior e seu ânus na extremidade posterior. Possui dois sexos (hermafrodita e macho). O hermafrodita pode se reproduzir por autofecundação (a partir da liberação do seu próprio esperma) ou por fecundação cruzada (a partir do acasalamento com o macho). O embrião formado é colocado no ambiente quando contém aproximadamente 28-30 células e a embriogênese é completada fora do progenitor (ALBERTS *et al.*, 2002).

O ciclo de vida do *C. elegans* passa por vários estágios de desenvolvimento que compreendem quatro fases larvais (de L1 à L4) até formar o adulto e ocorre em um período de aproximadamente 46 horas. O desenvolvimento ocorre enquanto houver alimento disponível. No entanto, há uma via alternativa no seu ciclo que é contornada quando o animal se encontra em situações precárias, como a falta de nutrientes nas fases L1 ou L2. Nessa situação, o animal entra no estágio *dauer* ou diapausa. As larvas *dauer* são mais resistentes e retornam ao ciclo de vida normal evoluindo para L4 quando as condições se tornam favoráveis novamente (CORSI, 2006). A figura 2 mostra o ciclo de vida desse nematoide.

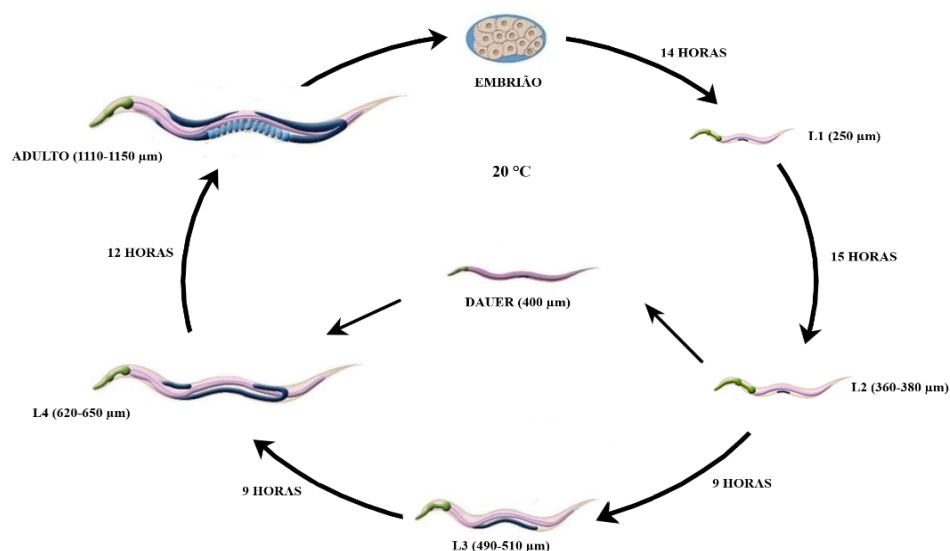


Figura 2 - Representação do ciclo de vida do *C. elegans* em 20 °C: do embrião à fase adulta. O tamanho dos estágios larvais está indicado ao lado dos esquemas em micrômetros. Fonte: adaptado de Altun & Hall, 2009.

O seu genoma totalmente mapeado, a presença de genes ortólogos aos de humanos e o dimorfismo sexual do *C. elegans* o tornam um excelente modelo de estudo e nos permite

identificar genes e vias de sinalização que regulam processos biológicos fundamentais, como a interferência de RNA (ácido ribonucleico), a morte celular programada (apoptose), diferenciação celular e senescência (CORSI, 2006). É possível, por exemplo, determinar a ação de genes específicos a partir de fenótipos gerados por ácido ribonucleico de interferência (RNAi). Existem diversas técnicas que não se restringem somente a descoberta de novos genes, mas como também, permitem o estudo e avaliação da expressão gênica (WANG; SHERWOOD, 2011).

Dentre os genes mais estudados em *C. elegans* destaca-se o SKN-1. O seu fator de transcrição é induzido por uma via de sinalização que envolve a participação de proteínas Kinase como PMK-1 (P-38), SEK-1 (ERK) (VAN DER HOEVEN *et al.*, 2011) e possivelmente pela expressão de DAF-16 (FOXO) (SUN; CHEN; WANG, 2017). A ativação de vias de sinalização específicas da resposta imune durante um processo infeccioso é capaz de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e outras moléculas inflamatórias que atuam no combate ao agente patogênico. No entanto, embora as ERO sejam capazes de atuar como agentes protetores também podem danificar tecidos do próprio organismo e implicar na diminuição do seu tempo de vida. No *C. elegans*, as ERO são capazes de ativar a via SEK – 1, que é regulada pela fosforilação de proteínas como a PMK-1 (VAN DER HOEVEN *et al.*, 2011).

Em *C. elegans* o gene SEK-1 é expresso em vários tipos celulares, tais como neurônios e células do intestino. Quando esse gene é ativado em neurônios da acetilcolina é capaz de atuar na modulação da taxa de locomoção e na sinalização Gq (proteína expressa em neurônios que regula a atividade neuronal) (HOYT *et al.*, 2017). Além disso, o SEK-1 atua em vários outros processos, como a defesa contra outros organismos, ativação da cascata PMK-1 e na regulação positiva da oviposição. Ademais, a ação do SKN-1 em neurônios da acetilcolina permite o seu uso para estudos de doenças neurodegenerativas, pois a fisiopatologia de alguma dessas doenças está relacionada com a diminuição deste neurotransmissor (WormBase: recurso de informação de nematóides, 2009).

O PMK-1 (P-38) é uma das vias conservadas em *C. elegans* que atua na ativação da resposta imune inata e, consequentemente, na defesa contra patógenos. O declínio na ativação da via PMK-1 (P-38) em *C. elegans* está relacionado com a senescência, o que acarreta perda de atividade antimicrobiana e maior suscetibilidade a infecções (YOUNGMAN; ROGERS; KIM, 2011). A partir de estudos realizados por Kamaladevi e Balamurugan (2015) utilizando *C. elegans* durante infecção por *Klebsiella pneumoniae* foi observado que houve redução de

PMK-1, o que inibiu a biossíntese de componentes antimicrobianos como as lectinas do tipo npl-29, lis-1 e C. A inibição dessa via da resposta imune e a redução na produção desses componentes químicos comprometeu a defesa do organismo contra o patógeno e houve morte dos vermes.

Outro fator de transcrição importante para a sobrevivência do *C. elegans* é o DAF-16 (FOXO). As FOXOs pertencem a uma classe de proteínas que possuem domínios Forkhead e participam de vários processos citológicos como apoptose e na resistência ao stress oxidativo atuando, assim como o SKN-1, na longevidade do verme. Diferente do *C. elegans*, os mamíferos têm quatro genes FOXO e nos humanos três proteínas codificadas apresentam estrutura semelhante àquelas que são formadas no *C. elegans* (SUN; CHEN; WANG, 2017). Esse e outros genes são essenciais na ativação da resposta imune inata e aumento na longevidade do nematoide.

O fator de transcrição SKN-1 presente no *C. elegans* é ortólogo ao fator Nrf2 presente nos mamíferos e atua na ativação de diversos processos fisiológicos desses diferentes organismos (BLACKWELL *et al.*, 2015). Em seres humanos o Nrf2 opera em diferentes vias metabólicas o que permite a sua atuação na resposta antioxidante (mecanismo importante para manutenção da homeostasia e sobrevivência das células), no metabolismo de lipídeos, manutenção da glicemia, resposta inflamatória, dentre outras (HAHN; OLIVEIRA; BOCK, 2017). No *C. elegans* o fator de transcrição SKN-1 tem funções diferentes e atua, por exemplo, na ativação de vias de detoxificação, aumenta a resistência ao stress oxidativo e anoxia, aumenta a resistência a patógenos, é essencial durante o desenvolvimento embrionário (VAN DER HOEVEN *et al.*, 2011). Sendo assim, o aumento da expressão do SKN-1 pelo verme aumenta o seu tempo de vida e a sua deficiência diminui. Não obstante, sua expressão está diretamente ligada à reprodução, proliferação celular e resposta imune inata (TULLET *et al.*, 2017). Portanto, o SKN-1 controla direta ou indiretamente vários processos biológicos. Fatores estressantes como a ação de ERO e outros diferentes tipos de sinais de estresse são capazes de ativar positivamente a via SKN-1 (Figura 3) (BLACKWELL *et al.*, 2015).

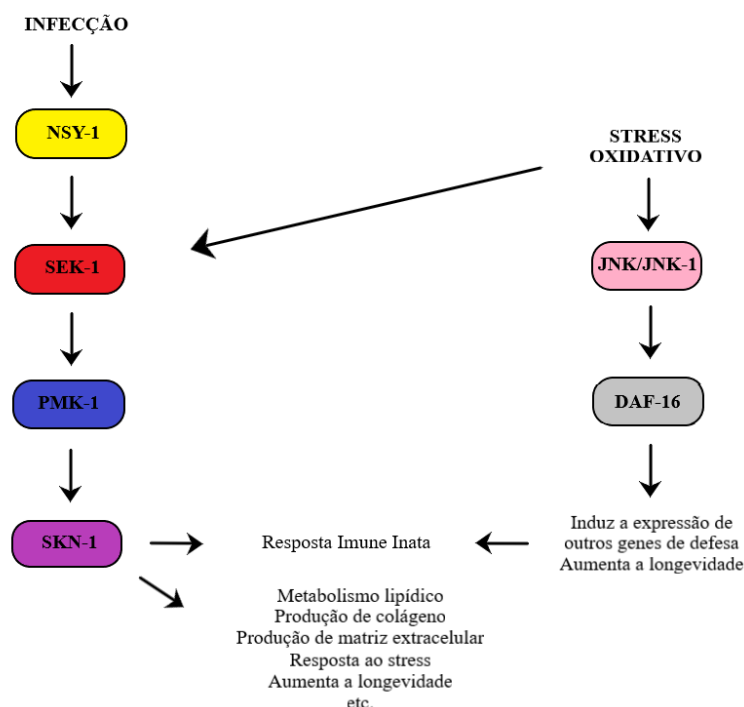


Figura 3 - Representação de vias de sinalização indutoras da resposta imune inata do *C. elegans* em resposta ao estresse oxidativo e a infecção. Ativação de genes que induzem mecanismos fisiológicos capazes de atuar em resposta ao estresse e a agentes infecciosos. Fonte: elaborada pelo autor (2021).

Vale ressaltar que esse nematoide não apresenta resposta imune adaptativa, sendo dessa forma um modelo interessante para estudo da resposta imune inata. Seus mecanismos de defesa imunológica se baseiam no reconhecimento inato de diferentes tipos de patógenos. São variados os mecanismos para reconhecimento, tais como a sensação neuronal de estímulos bacterianos e alterações da homeostasia celular (SUN; ABALLAY; SINGH, 2016). Diferentes estudos dos mecanismos imunológicos do verme na defesa contra patógenos revelaram que a sua resposta imune inata possui vias de sinalização que foram conservadas evolutivamente. Essas vias atuam regulando a expressão de moléculas efetoras (ENGELMANN; PUJOL, 2010).

A resposta imune inata do *C. elegans* pode ser ativada a partir da ação de microrganismos patogênicos (vírus, fungos, bactérias etc.) em diferentes regiões do organismo (VAN DER HOEVEN *et al.*, 2011). Segundo Hummell e colaboradores (2020) as formas tradicionais para tratar uma infecção microbiana, que se baseiam na morte ou inibição do crescimento do patógeno, podem acarretar na falta de segurança e eficácia no tratamento infeccioso. Em estudo recente utilizando o *C. elegans* os autores propõem uma nova abordagem para o tratamento de infecções. Trata-se do uso de substâncias capazes de atuar como imunomoduladores aumentando a eficiência da resposta imune e facilitando a eliminação do patógeno. Após a triagem de várias moléculas químicas com potencial terapêutico somente 5

foram selecionadas para estudos adicionais, pois foram capazes de atuar induzindo a resposta imune inata do *C. elegans* promovendo maior resistência do hospedeiro. Isso se deve a estimulação de vias de transcrição gênica essenciais para ativação do sistema imune do verme.

Poupet e colaboradores (2020) discutem em um estudo a viabilidade da utilização do *C. elegans* como organismo modelo para avaliar a ação de microrganismos com atividade probiótica para a saúde humana e concluem que o verme é uma poderosa ferramenta para esse tipo de estudo. Os probióticos já demonstraram em outros estudos a capacidade de aumentar o tempo de vida do verme e a resistência a patógenos. Isso indica uma nova alternativa terapêutica para o tratamento de infecções. Além disso, o uso do verme como organismo modelo para esse tipo de estudo é visto como vantajoso, pois permitiria uma ampliação na quantidade de microrganismos estudados e na quantidade de patologias investigadas.

Não obstante, estudos realizados por Younghoon e Eleftherios (2012) demonstraram que a bactéria probiótica *Lactobacillus acidophilus* cepa NCFM atua aumentando a resposta imune do *C. elegans* no combate a bactérias Gram positivas. Quando infectado por cepas patogênicas de *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* e tratado com *Lactobacillus acidophilus* cepa NCFM o *C. elegans* teve uma redução significativa da infecção e aumento da sobrevivência. Essa proteção proveniente da bactéria probiótica se deve a ativação de vias de sinalização imunológica que atuam na defesa do verme contra bactérias Gram-positivas, tais como a via de proteína quinase ativada por mitogênio p38 (via TIR-1 e PMK-1) e a via de sinalização de β -catenina (via BAR-1). Em contrapartida, durante a infecção do verme por bactérias Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella enterica* serovar Typhimurium) os probióticos não exerceram efeitos positivos na regulação das vias de sinalização imunológica do verme.

Wan e colaboradores (2021) utilizaram as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* PA14 e *S. Typhimurium* SL1344 para estudar a relação entre a eliminação de células apoptóticas e a resposta imune inata em *C. elegans*. No estudo foram utilizados vermes com mutação no gene PMK-1, que apresentaram maior resistência à infecção por essas bactérias quando comparados com vermes selvagens N2. Isso se deve à regulação positiva de genes responsáveis pela ativação da resposta imune inata no verme. A deficiência na eliminação de células apoptóticas promoveu a ativação das vias PMK-1 (p38 MAPK) e MPK-1. Estudos como esse são de grande importância para a comunidade científica, pois aborda novas metodologias para tratar e prevenir doenças causadas por bactérias virulentas, tais como a *Salmonella spp.*

2.2 *Salmonella*

Dentre os agentes patogênicos alimentares mais comuns destaca-se o gênero *Salmonella*, capaz de infectar animais e humanos. A infecção por *Salmonella* é considerada um problema de saúde pública em todo o mundo. Uma das formas de transmissão é o consumo de alimentos de origem animal contaminados. Diferentes tipos de fatores de virulência utilizados por esse patógeno já foram descritos e têm se mostrado importantes para a sua patogênese. Entre os diferentes fatores incluem flagelos, cápsula, plasmídeos e sistemas de adesão (JAJERE, 2019).

Com a eficiência dos mecanismos de patogenicidade dessas bactérias a infecção torna-se mais grave, podendo levar a morte do hospedeiro. Nesse caso, se faz necessário o uso de terapia antibiótica eficaz. No entanto, o surgimento de cepas multirresistentes a medicamentos têm impactado no sucesso terapêutico levando a um aumento na taxa de mortalidade (cerca de 160 mil mortes por ano). Assim, o surgimento de resistência antimicrobiana por *Salmonella* vem se tornando um problema de saúde pública mundial (Chiu *et al.*, 2002). Fármacos antimicrobianos como ampicilina, cloranfenicol e trimetoprima-sulfametoxazol normalmente são utilizados como primeira escolha para o tratamento de infecções causadas por *Salmonella*. Bactérias desse gênero que apresentam resistências a estes agentes são referidos como resistentes a múltiplas drogas (MDR) (ENG *et al.*, 2015).

Salmonella spp. é um gênero bacteriano gram-negativo que pertence à família *Enterobacteriaceae* e o agente etiológico da Salmonelose (doença geralmente transmitida a humanos a partir de alimentos contaminados). Esse gênero de bactérias se divide em duas espécies: *S. enterica* (com mais de 2500 sorotipos) e *S. bongori* (com 22 sorotipos). A espécie *S. entérica* possui seis subespécies e uma delas é a *S. enterica subespécie entérica* que, por sua vez, possui mais de 1500 sorotipos já identificados. Dentre os principais destaca-se *S. enterica* sorotipo Typhimurium, um dos principais agentes causadores da febre não tifoide (GRIMONT e WEILL, 2007 apud FACHINI *et al.*, 2015). Além disso, o sorotipo Typhimurium é capaz de infectar uma variedade de animais e possui linhagens multirresistentes a desinfetantes e antimicrobianos comuns (HOTOON *et al.*, 2011).

Dados publicados pela SalmSurv (uma rede de vigilância de doenças transmitidas por alimentos apoiada pela OMS) mostraram que o sorotipo Typhimurium é o segundo sorotipo do gênero *Salmonella* isolado mais comum em infecções por todo o mundo sendo responsável por cerca de 12% das infecções. Especificamente na América do Norte, *S. Typhimurium* é o sorotipo mais comum relatado em isolados clínicos, responsável por cerca de 29% das

infecções. Assim, é possível observar que casos de infecção bacteriana causada por *S. Typhimurium* são bastante comuns. Essa bactéria atua infectando, além de células intestinais, células do sistema imune como macrófagos, células dendríticas e neutrófilos (SANTOS e BÄUMLER).

Inicialmente, *Salmonella* é reconhecida por células de epitélio que são responsáveis pelas sinalizações iniciais do processo inflamatório, com recrutamento de leucócitos da medula óssea. (KAISER; HARDT, 2011). Células como neutrófilos e *natural killer* (NK) desempenham papel importante durante a resposta imune contra a *S. Typhimurium*, pois previnem a disseminação bacteriana e produzem IFN- γ (interferon gama), respectivamente. O IFN- γ induz a ativação de macrófagos que fagocitam e eliminam as bactérias através da produção de ERO's e ERN's (CONLAN, 1996; KUPZ *et al.*, 2013). A resposta imune adaptativa é ativada mediante ao reconhecimento de antígenos da bactéria levando à ativação de células T, principalmente no intestino (PHAM; MCSORLEY, 2015).

Aballay *et al.*, (2000) estudaram as interações patógeno/hospedeiro utilizando a bactéria *S. Typhimurium* durante infecção em *C. elegans*. Os autores observaram que as bactérias se acumulam na luz intestinal e após determinado período observou-se uma diminuição da sobrevivência do verme. Além disso, foi observado que a morte do verme não é mediada pela ação de toxinas produzidas pela bactéria, o que indica a necessidade de contato direto entre o nematoide e a bactéria.

É necessária uma ampla compreensão da patogênese desse patógeno para o desenvolvimento de novas propostas de intervenção colaborando com a redução no uso de antimicrobianos, com consequente diminuição no desenvolvimento de cepas resistentes. Em pesquisa realizada por Huang e colaboradores (2021) foi investigado o efeito da vitamina D3 em colite causada por *Salmonella*. Os resultados demonstraram que a vitamina D3 foi capaz de reduzir a gravidade de colite causada pela bactéria em camundongos. Concluiu-se que a vitamina foi capaz de reduzir a inflamação e a translocação bacteriana e eliminação de organismos patogênicos.

2.3 Vitamina D

A ação do sistema imunológico contra patógenos depende, dentre outros fatores, do estado nutricional do organismo. Isso se justifica pela necessidade de manutenção das suas barreiras imunológicas e indução do seu desenvolvimento (ABBAS; LICHTMAN, 2005). Um dos nutrientes relevantes para a homeostasia das funções fisiológicas é a vitamina D, que atua

em diversos processos no organismo humano, como a absorção de cálcio e homeostasia óssea, regulação do crescimento, aumento da imunidade, manutenção da função muscular etc. Todavia, na literatura, os estudos dos mecanismos de proteção induzidos por esse nutriente ainda são escassos. Sua deficiência está relacionada com o desenvolvimento de doenças como o Alzheimer, Parkinson e até mesmo o câncer (MARK *et al.*, 2016). Dentre as principais funções da vitamina D, destaca-se a sua ação no sistema imune (Figura 4).

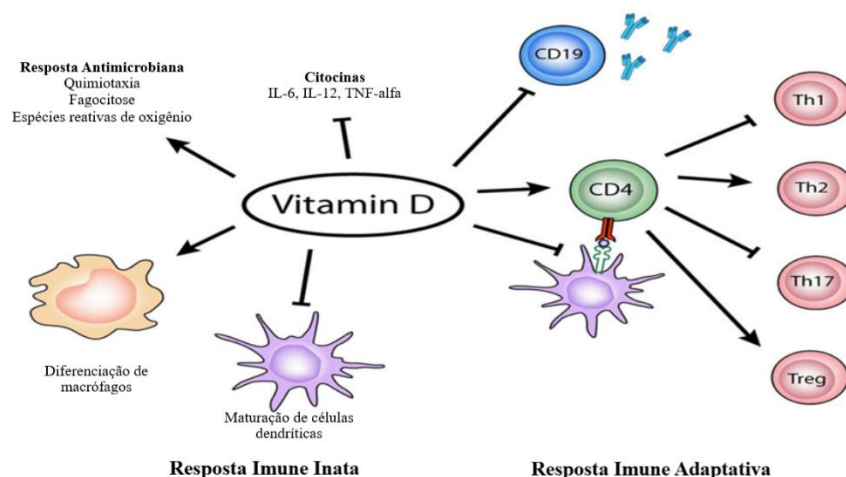


Figura 4 - Efeitos da vitamina D3 na resposta imune. A vitamina é capaz de induzir a produção de citocinas e agentes antimicrobianos; induz a diferenciação de células; inibe a maturação de células dendríticas e promove a ação de linfócito T regulatório. Fonte: adaptado de Iruretagoyena *et al.*, (2015).

Nos últimos anos tornou-se crescente a busca pelo entendimento dos mecanismos de ação da vitamina D, principalmente em relação a sua ação no sistema imunológico. Destaca-se a importância da conversão de 25-hidroxivitamina D (25OHD) em 1,25-diidroxivitamina D (1,25 (OH) (2) D) ativa que é capaz de auxiliar na eliminação de microrganismos em seres humanos (HEWISON, 2011). O alvo molecular de sinalização da vitamina D é o VDR (receptor de vitamina D). As funções dessa vitamina são caracterizadas como genômicas (quando o VDR induz uma sinalização no núcleo das células) e não genômicas (quando o VDR induz uma sinalização rápida, nesse caso, na membrana plasmática e/ou no citoplasma das células) (TROCHOUTSOU *et al.*, 2015).

Enzimas capazes de metabolizar a vitamina D estão presentes em diferentes tipos celulares, inclusive, em células do sistema imune (células T, células B e células apresentadoras de antígeno.). Todas essas células são capazes de sintetizar o metabólito ativo dessa vitamina (PRIETL *et al.*, 2013). Assim, a vitamina D é capaz de atuar na defesa do organismo, inflamação, imunidade e reparo do epitélio. Células do sistema respiratório expressam de forma constitutiva o receptor de vitamina D, o que evidencia o seu potencial terapêutico em infecções

do trato respiratório (ZDRENGHEA *et al.*, 2017). Estudos recentes indicaram que baixos níveis plasmáticos de vitamina D aumentam a suscetibilidade a infecções causadas por vírus e estão relacionados com maior proliferação de doenças como hepatite, influenza, Covid-19 e AIDS (SIDDIQUI *et al.*, 2020)

Além disso, o lúmen do intestino é rico em microrganismos capazes de trazer benefícios à saúde humana. Todavia, também é colonizado por patobiontes e toxinas capazes de ativar o sistema imunológico e gerar processos inflamatórios que ao se tornarem crônicos podem desencadear o desenvolvimento de doenças intestinais. Assim, é essencial que a resposta imune e demais barreiras de proteção sejam eficientes no combate a patógenos. A vitamina D é um fator nutricional essencial capaz de atuar na regulação positiva de vias de sinalização importantes da resposta imune, por exemplo, induzindo a produção de peptídeos antimicrobianos, citocinas e aumentando a tolerância de células T. (CARLBERG, 2019; DIMITROV; WHITE, 2017)

Devido ao uso indiscriminado de agentes antibióticos o desenvolvimento de genes de resistência bacteriana vem se tornando cada vez mais comum, reduzindo as chances de sucesso terapêutico. Desse modo, se faz necessário o desenvolvimento de estratégias alternativas de tratamento de infecções bacterianas. O uso da vitamina D e seus derivados moleculares no tratamento antibacteriano são promissores, inclusive contra bactérias multirresistentes aos antibióticos (GOLPOUR; BERESWILL; HEIMESAAT, 2019). Desse modo, estudo realizado por Grenier e colaboradores (2016) avaliou a ação antimicrobiana da vitamina D durante infecção por *P. gingivalis* em monócitos e obteve como principais resultados a inibição seletiva do crescimento e da expressão do gene do fator de virulência por *P. gingivalis*, além de atenuar o fator nuclear kappa B (NF- κ B) em monócitos. Esses resultados sugerem o uso dessa vitamina como uma estratégia para profilaxia ou tratamento mais econômico.

Estudos foram realizados por Messing e colaboradores (2013) para avaliar o uso de *C. elegans* como organismo modelo para estudos dos mecanismos de ação da vitamina D. Para a confirmação dessa possibilidade os pesquisadores analisaram se a vitamina afeta o tempo de vida desse organismo e tentaram relacionar sua ação com o receptor DAF-12. Os dados encontrados no estudo permitiram inferir que a vitamina D3 pode atuar em múltiplos receptores como o DAF-12 sendo capaz de aumentar o tempo de vida do verme.

Não obstante, estudos realizados por MARK e colaboradores (2016) utilizando o *C. elegans* nutrido com a vitamina D permitiram a elucidação de mecanismos pelo qual esse micronutriente interfere para aumentar a longevidade do verme. Dentre os principais resultados

obtidos foi descoberto que a vitamina D3 pode ser metabolizada pelo nematoide e induzir a expressão dos genes SKN-1, IRE-1 e XPB-1 (genes de resposta ao stress) que são necessários para que a vitamina possa atuar prolongando a vida do verme. Além disso, foi observado que a vitamina interferiu causando a redução de insolubilidade generalizada de proteínas (alteração fisiológica da senescência) e evitou toxicidade causada por β -amiloide, o que evidencia um potencial terapêutico no tratamento de doenças neurodegenerativas.

Ademais, outros trabalhos com a vitamina D comprovaram sua eficiência no tratamento de várias doenças de ação sistêmica. Em estudos realizados por HUANG (2016) foi investigado a ação da vitamina D3 na autofagia e na expressão de Interleucina 1-beta (IL-1- β) em células do intestino infectadas por *Salmonella*. Foi obtido como principais resultados que a ação da forma ativa da vitamina D pode atuar melhorando a autofagia e colaborar na eficiência da resposta imune durante a infecção. Além disso, a vitamina pode atuar suprimindo a expressão inflamatória de IL-1- β durante a infecção. Ainda não existem trabalhos que demonstrem a ação da vitamina D3 em um contexto infeccioso em *C. elegans*,

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito protetor da Vitamina D3 em *C. elegans* durante infecção por *S. Typhimurium*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o papel da vitamina D3 na sobrevivência de *C. elegans* durante infecção por *Salmonella Typhimurium*;
- Caracterizar o papel da vitamina D3 no estímulo da expressão gênica em *C. elegans* durante a infecção por *S. Typhimurium*;
- Analisar a influência da vitamina D3 na formação de biofilme pela bactéria *S. Typhimurium*;
- Avaliar a influência da vitamina D3 no crescimento da bactéria *S. Typhimurium*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi realizado na UFOB – Universidade Federal do Oeste da Bahia, Barreiras – Bahia, no Laboratório de Microbiologia e Laboratório de Doenças Infecciosas e Vetores (LAIVE). Todos os ensaios desse estudo foram realizados em triplicata e repetidos para garantir confiabilidade dos dados. Mais informações acerca das metodologias adotadas nesse estudo estão presentes no apêndice A.

4.1 Crescimento e manutenção do *C. elegans*

A seguinte cepa de *C. elegans* foi usada neste estudo: Bristol N2 . A cepa foi cultivada em placas de meio de cultura nematóides (NGM) contendo ágar 50 mM; NaCl 50 mM; peptona 20 mg/mL; colesterol 5 µg/mL; CaCl₂ 1 mM; MgSO₄ 1 mM; tampão fosfato e potássio pH 6,0 25 mM, semeadas com *E. coli* OP50 e mantida à temperatura de 20 °C. A manutenção dos nematoides foi realizada por meio da transferência em diferentes estágios para novas placas de NGM à medida que a camada de *E. coli* cepa OP50 (nutriente para o crescimento do *C. elegans*) se tornava aparentemente escassa.

Os vermes utilizados neste estudo foram sincronizados no estágio L1 utilizando uma solução de hipoclorito alcalino "*Bleaching*". O processo de sincronização é realizado 48 horas após a transferência dos vermes para uma nova placa, no qual, a maioria dos vermes deve estar gravídica. Os vermes foram lavados na placa de *petri* com água autoclavada, transferidos para um tubo Falcon de 15 mL e centrifugados por 3 minutos a 3000 RPM (rotações por minuto), após a centrifugação retirou o sobrenadante e o processo foi repetido três vezes. Após o processo de lavagem foi adicionado ao tubo *Falcon* a solução de "*Bleaching*" e agitado manualmente e rapidamente em torno de 3 a 9 minutos para que os vermes fossem rompidos e os ovos liberados. Em seguida foi adicionado o tampão M9 para finalizar a reação. Depois, o conteúdo foi centrifugado por 3 minutos a 3000 rpm, retirando o sobrenadante e completando com M9 repetindo esse processo três vezes. Por fim, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se M9 até o volume de 12 mL. Este conteúdo foi colocado em uma placa de *petri* estéril e incubado por 12 horas a 20 °C até a eclosão dos vermes para o estágio L1. Após a eclosão dos ovos, os nematoides em L1 foram contados. Para isso, os realocamos para um tubo de 15 mL e utilizamos uma ponteira de 200 µL com ponta cortada para pipetar alíquotas de 20 µL do meio contendo vermes em uma lâmina para contagem manual ao microscópio. Nesta etapa é importante inverter o tubo sutilmente algumas vezes para certificar-se de que a concentração

de animais é homogênea dentro do tubo. A partir da média de animais encontrados, estima-se a quantidade total de vermes. Em seguida, os grupos amostrais foram segregados em quantidades determinadas para cada experimento. Essa metodologia adotada para os nossos estudos foi adaptada de protocolos disponíveis no WormBook e está representada na Figura 5.

Figura 5 representa a metodologia adotada para esse estudo.

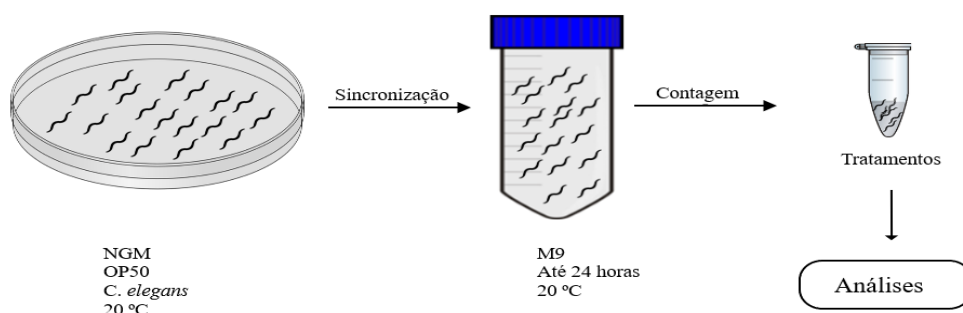


Figura 5 – Método de sincronização da população de *C. elegans*. Os vermes utilizados para os experimentos foram obtidos a partir de placas ricas em ovos e vermes nos diferentes estados de desenvolvimento (L1 a L4). Esses animais foram sincronizados, restando apenas os ovos, que foram incubados durante um período de até 24 horas a 20 °C até que os animais eclodissem em estágio L1. Após, foram contados e separados 1000 animais em L1 que seguiram diretamente para os tratamentos e, posteriormente, à diferentes análises. Fonte: elaborado pelo autor (2022).

4.2 Crescimento e manutenção da *S. Typhimurium*

A cepa de *S. Typhimurium* utilizada nesse estudo foi ATCC® 13311™ e foi cultivada em meio Luria-Bertani (LB) disposta em tubo de ensaio de vidro e incubada a 37° C com 12 horas antecedentes a infecção.

Para fazer o estoque, 250µL de glicerina foram adicionados a um criotubo junto com 750µL do pré-inóculo da bactéria, homogeneizados e então armazenados no ultrafreezer (80°C).

4.3 Crescimento e manutenção da *E. coli*

A cepa de *E. coli* utilizada nesse estudo foi a OP50. Foi cultivada em meio Luria-Bertani (LB) disposta em tubo de ensaio de vidro e incubada a 37° C durante 24 horas e depois mantida

sobre refrigeração em aproximadamente 10 °C. É adicionada como fonte de alimento aos vermes após a transferência de placas.

4.4 Ensaio de sobrevivência

Os estudos de tempo de vida foram realizados em placas de meio de crescimento nematóides (NGM) a 20 °C. A contagem de sobrevivência dos grupos foi realizada através da observação em microscopia óptica de vermes viáveis nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas após a infecção. Os vermes utilizados foram selecionados de placas NGM frescas, onde 20 vermes foram distribuídos para cada placa de análise. O experimento foi realizado em triplicata para incluir réplicas biológicas. Essa metodologia adotada para os nossos estudos foi adaptada de estudos realizados por Mark e colaboradores (2016).

4.5 Extração de RNA e reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-qPCR)

O RNA total foi isolado de aproximadamente 1000 vermes adultos em estágio L1 utilizando TRI *Reagent* (Life Technologies) 24 horas após a infecção e os tratamentos com a vitamina D3. Inicialmente foram separados 1000 vermes em 300 µl de M9 em um microtubo. Em seguida, foram adicionados 500 µl de Trizol e misturado. A mistura foi incubada durante 5 minutos e, posteriormente, foi adicionado 0.1 mL de clorofórmio. Foi incubado novamente durante 3 minutos e depois centrifugado por 15 minutos girando em 12.000 g à 4 °C. O sobrenadante formado foi transferido cuidadosamente. Então, adicionou-se 250 µl de isopropanol e incubou-se durante 10 minutos. Posteriormente, centrifugou-se por 10 minutos girando em 12.000 g à 4 °C e em seguida o sobrenadante foi descartado utilizando uma pipeta. Após isso, o *pellet* foi ressuspensionado em 0.5 mL de etanol 75% e agitado com vórtex brevemente. O conteúdo foi centrifugado por 5 minutos girando em 7500 g à 4 °C, descartado o sobrenadante e incubado para secar entre 5 e 10 minutos. Por fim, adicionou-se 15 µl de RNase-free.

As amostras de RNA total foram tratadas com DNase utilizando-se Kit comercial DNase I –Rnase free (Jena Bioscience), seguindo as recomendações do fabricante. Após esse procedimento, o cDNA foi sintetizado utilizando o kit comercial High-Capacity cDNA Reverse (Applied Biosystems). Em microtubo de 200 µL foram adicionados 1.0 µL de tampão RT (10x); 0.4 µL de dNTPs (100 µM); 1.0 µL de primer aleatório (10x); 0.5 µL de Transcriptase Reversa MultiScribe™; 0.5 µL de RNAase; 1.6 µL de água livre de nucleases e 0,8 µg de RNA amostra

para completar volume final de 10 μ L. Após isso, incubado em termociclador durante 10 minutos a 25° C, 120 minutos a 37° C e 5 minutos a 85° C.

Os experimentos de PCR quantitativo (qPCR) foram realizados com 2x qPCRBIO SyGreen Mix Lo-ROX (PCR Biosystems) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante com o instrumento e software do sistema QuantStudio 5 Flex Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific) para analisar a quantidade de RNAm dos genes alvo *skn-1*, *sek-1*, *pmk-1* e *spp-1*. Os dados de qPCR foram analisados com o método $\Delta\Delta C_t$ (delta, delta C_t) utilizando o primer *act-1* (actina) como uma referência endógena para normalização. As sequências de primer utilizadas para qPCR são todas 5' – 3', conforme listado no Quadro 1.

Quadro 1 – Sequências de primers utilizados para qPCR

Gene	Sentido	Sequência (5'-3')
ACT-1	F	TCCATTGTCGGAAGACCACG
	R	GTACGTCCGGAAGCGTAGAG
SKN-1	F	GAGACGAGACGATAAACGA
	R	CAGATGAATATGGACGACACTC
SEK -1	F	CACTGTTTGGCGACGATGAG
	R	ATTCCGTCCACGTTGCTGAT
PMK-1	F	CCAAAAATGACTCGCCGTGA
	R	CTTTTGCAGTTGGACGACGA
SPP-1	F	TGGACTATGCTGTTGCCGTT
	R	ACGCCTTGTCTGGAGAATCC

Em tubos de 200 μ L foi preparado o master mix com 5.0 μ L de 1X qPCRBIO SyGreen Mix; 400 nM de primer iniciador 5' (forward); 0.4 nM de primer iniciador 3' (reverse); 1 μ L de cDNA (concentração variável) e 3.2 μ L de água para PCR, totalizando 10 μ L por reação. Esses valores foram adaptados de acordo com a quantidade de amostras analisadas nos determinados grupos experimentais. As reações de PCR utilizaram as seguintes condições de amplificação: 1 ciclo em 95 °C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos à 95 °C por 5 segundos e 60 °C por 30 segundos, seguido 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto e 95 °C por 1 segundo. Essa metodologia adotada para os nossos estudos foi adaptada de protocolos disponibilizados por Zamanian Lab Docs e PCR Biosystems e está representada na Figura 5.

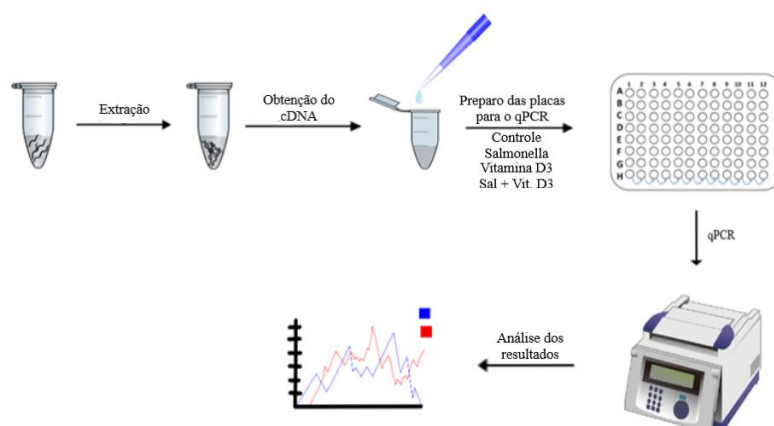


Figura 6 - Metodologia para análise de qPCR. O RNA do nematoide foi extraído e posteriormente o cDNA foi sintetizado e armazenado em microplaca de 96 poços. Os ensaios foram realizados e, posteriormente, analisados utilizando software QuantStudio 5. Fonte: elaborado pelo autor (2022).

4.6 Ensaio da formação de biofilme

A formação de biofilme por *S. Typhimurium* cepa ATCC® 13311™ foi avaliada em placas de microtitulação de poliestireno pelo método de Cristal Violeta. A *S. Typhimurium* foi inoculada com 12 horas de antecedência e vitamina D3 diluída em Dimetilsulfóxido (DMSO). O ensaio foi realizado utilizando espectrofotômetro Varioskan LUX Multimode Reader (Termo Fischer Cientific). Inicialmente, a amostra foi preparada adicionando em meio de cultura líquido a bactéria e a vitamina D3 (em diferentes concentrações) juntamente a glicose e água. A amostra foi incubada durante 24 horas a 37 °C. Posteriormente, os meios de cultura foram retirados dos poços e lavados três vezes com meio TSB. Em seguida, foi realizada coloração utilizando o corante cristal de violeta. Após isso, o corante foi desprezado e as placas foram lavadas utilizando solução salina. As placas foram secas a 35 °C e, posteriormente, foi adicionado etanol absoluto em cada poço para solubilização da coloração das bactérias aderidas e a placa incubada. A Figura 7 representa a metodologia adotada para esse estudo.

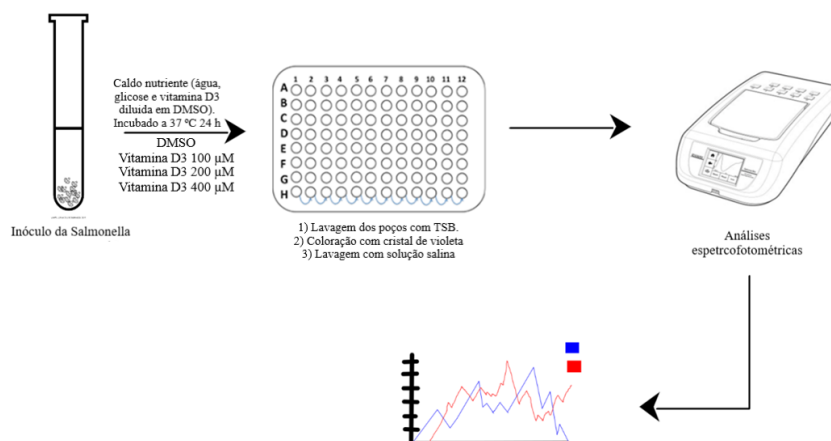


Figura 7 - Avaliação da formação de biofilme. A bactéria foi pré-inoculada 24 horas em temperatura 37 °C, em caldo nutriente. Foi realizado o tratamento com a vitamina D3 em diferentes concentrações utilizando placas de 96 poços e incubado por 24 horas a 37 °C. As placas foram lavadas e o material fixado para análise. O material foi analisado utilizando espectrofotometria Ultravioleta. Fonte: elaborado pelo autor (2022).

4.7 Ensaio de crescimento bacteriano

O ensaio foi realizado utilizando a *S. Typhimurium* cepa ATCC® 13311™ inoculada com 12 horas de antecedência e a vitamina D3 diluída em Dimetilsulfóxido (DMSO). O ensaio foi realizado utilizando espectrofotômetro Varioskan LUX Multimode Reader (Termo Fischer Cientific). Inicialmente, a amostra foi preparada contendo a bactéria e a vitamina D3 (em diferentes concentrações, que foram incubadas em uma placa de 96 poços. Em seguida, foram analisadas as absorbâncias utilizando o espectrofotômetro em diferentes tempos (24 e 48 horas). A Figura 8 representa a metodologia adotada para esse estudo.

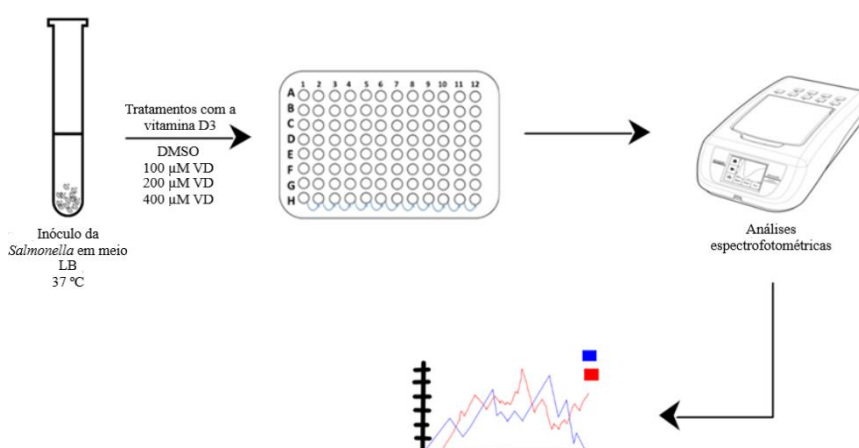


Figura 8 - Metodologia para análise de crescimento bacteriano. A bactéria foi pré-inoculada 24 horas e o inóculo final foi realizado 12 horas antes das análises, em temperatura 37 °C, em caldo LB. Foi realizado o

tratamento com a vitamina D3 em diferentes concentrações utilizando placas de 96 poços. O material foi analisado utilizando espectrofotometria Ultravioleta. Fonte: elaborado pelo autor (2022).

4.8 Análises estatísticas

Os resultados dos testes foram demonstrados através de gráficos. Os cálculos das análises de expressão gênica foram realizados utilizando o software Excel e plotados no software GraphPad Prism 9. Os demais cálculos foram realizados e plotados no software GraphPad Prism 9.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste One Way ANOVA e pós teste de Tukey's, no qual o valor P considerado significativo foi $< 0,0001$.

4.9 Determinação dos grupos experimentais

Para os nossos experimentos diferentes grupos experimentais foram determinados. Para as análises de sobrevivência foram avaliados os seguintes grupos:

- Controle (*C. elegans* + *E. coli* OP50), *Salmonella* (*C. elegans* infectado com *S. Typhimurium*);
- 100 μM VD (*C. elegans* infectado com *S. Typhimurium* tratado com a vitamina D3 em 100 μM VD);
- 200 μM VD (*C. elegans* infectado com *S. Typhimurium* tratado com a vitamina D3 em 200 μM VD);
- 400 μM VD (*C. elegans* infectado com *S. Typhimurium* tratado com a vitamina D3 em 400 μM VD).

Para as análises de expressão gênica foram avaliados os seguintes grupos:

- Controle (*C. elegans* + *E. coli* OP50);
- *Salmonella* (*C. elegans* infectado com *S. Typhimurium*);
- Vitamina D3 (*C. elegans* tratados com a vitamina D3 na concentração 400 μM);
- Sal + Vit D3 400 μM (*C. elegans* infectado com *S. Typhimurium* tratado com a vitamina D3 em 400 μM).

Para as análises da formação de biofilme pela *S. Typhimurium* foram avaliados os seguintes grupos:

- *Salmonella* diluída em DMSO;

- Sal + Vit D3 100 μ M (*S. Typhimurium* tratada com a vitamina D3 em 100 μ M);
- Sal + Vit D3 200 μ M (*S. Typhimurium* tratada com a vitamina D3 em 200 μ M);
- Sal + Vit D3 400 μ M (*S. Typhimurium* tratada com a vitamina D3 em 400 μ M).

Para as análises de crescimento bacteriano da *S. Typhimurium* foram avaliados os seguintes grupos:

- DMSO (contendo somente o diluente DMSO);
- Sal + Vit D3 100 μ M (*S. Typhimurium* tratada com a vitamina D3 em 100 μ M);
- Sal + Vit D3 200 μ M (*S. Typhimurium* tratada com a vitamina D3 em 200 μ M).
- Sal + Vit D3 400 μ M (*S. Typhimurium* tratada com a vitamina D3 em 400 μ M).

5 RESULTADOS

5.1 Análise de sobrevivência

Foi avaliada a capacidade da vitamina D3 em prolongar a longevidade de *C. elegans* durante a infecção por *S. Typhimurium*. Os vermes foram infectados com a bactéria e tratados com a vitamina D3 e ao longo de 72 horas foram retirados 25 µL de alíquota de cada grupo experimental e contados, com auxílio de microscopia óptica, os vermes vivos e mortos em diferentes tempos (início da infecção, 24 horas, 48 horas e 72 horas após a infecção). Os resultados obtidos em nossas análises estão presentes nas Figuras 9 e 10.

Inicialmente, em todos os grupos analisados a sobrevivência da população foi de 100%. Após o período de 24 horas é perceptível a ação deletéria da *Salmonella* e a ação protetora da vitamina D3 nos nematódeos. Após o período de 48 horas a ação protetora da vitamina se torna ainda mais evidente e de forma dose-dependente, uma vez que na presença das maiores concentrações da vitamina a longevidade do nematoide foi maior.

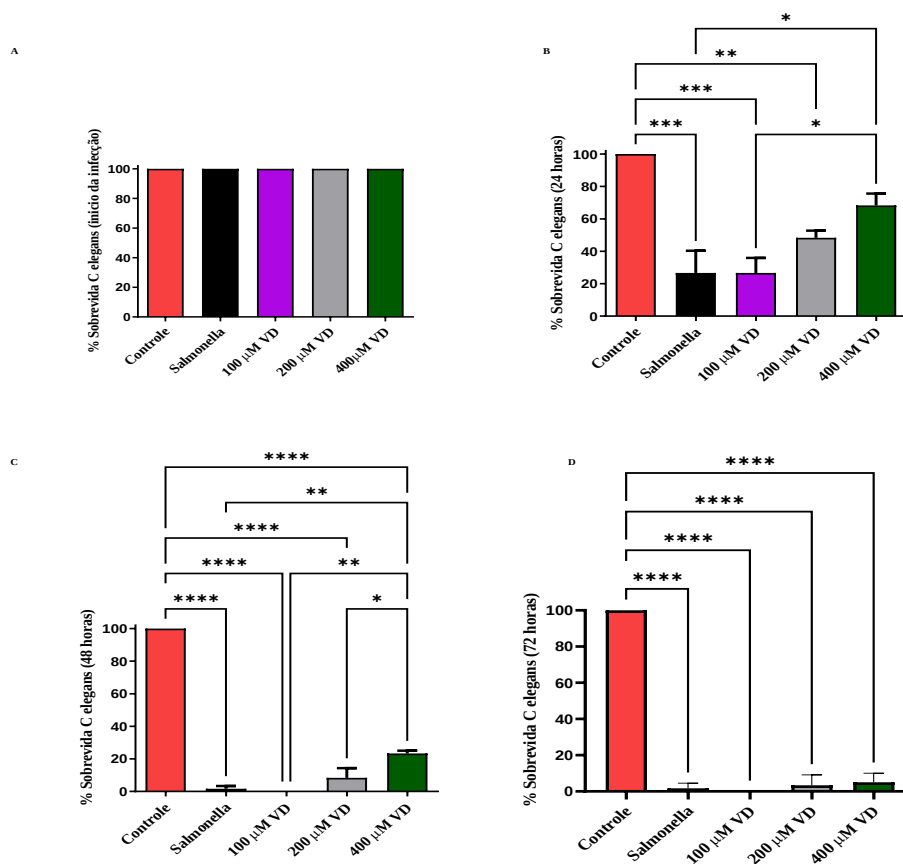


Figura 9 – Análise de sobrevivência de *C. elegans* tratado com vitamina D3 durante infecção por *S. Typhimurium*. 100 vermes foram infectados por *Salmonella* na presença ou ausência de Vitamina D3. (A) início

da infecção. (B) 12 horas após a infecção. (C) 48 horas após a infecção. e (D) 72 horas após a infecção. Foram contados os vermes vivos e mortos e a taxa de sobrevivência foi avaliada. Barras representam as médias $\pm$ DP de experimentos realizados em triplicata. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas em * ($P < 0,005$), ** ($P < 0,005$) *** ($P < 0,005$) e **** ($P < 0,0001$). A análise estatística foi realizada pelo teste One Way ANOVA ($P < 0,0001$), com pós teste Tukey's.

Por fim, os resultados dos ensaios de sobrevida nos permitiram analisar a área sob a curva (AUC) dos diferentes grupos experimentais, conforme apresentado na Figura 10.

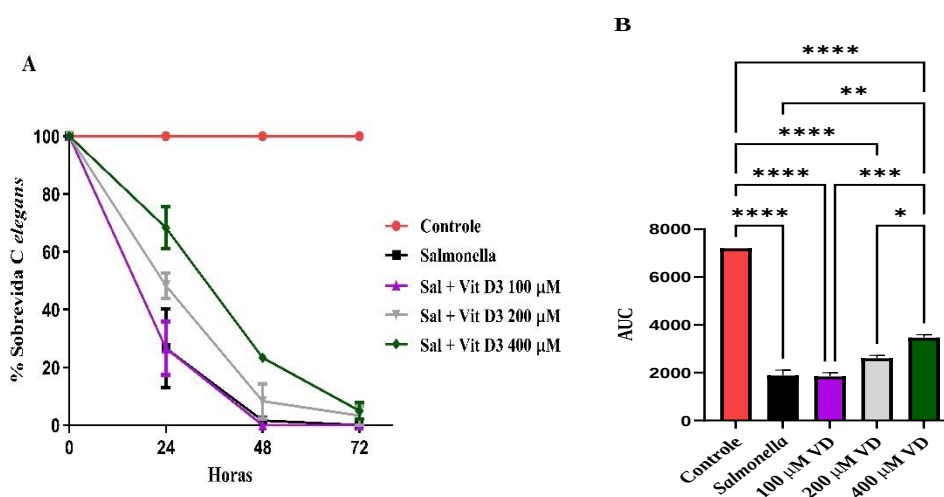


Figura 10 - Análise da área sob a curva (AUC) da sobrevida de *C. elegans* durante infecção por *S. Typhimurium*. 100 vermes foram infectados por *Salmonella* na presença ou ausência de Vitamina D3. (A) Análise de sobrevida e (B) Área sob a curva (UAC) da taxa de sobrevida do *C. elegans*. Barras representam as médias $\pm$ DP de experimentos realizados em triplicata. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas em * ($P < 0,005$), ** ($P < 0,005$) *** ($P < 0,005$) e **** ($P < 0,0001$). A análise estatística foi realizada pelo teste One Way ANOVA ($P < 0,0001$), com pós teste Tukey's.

5.2 Expressão gênica

Para avaliar a expressão de genes envolvidos na resposta imune inata durante a infecção pela *S. Typhimurium* foi realizada análise utilizando RT-qPCR. O material genético da população de vermes analisada foi extraído 24 horas após a infecção pela *S. Typhimurium* e o tratamento com a vitamina D3. Os resultados obtidos estão representados na Figura 11.

Os dados demonstraram maior expressão do gene SKN-1 e SPP-1 nos dois grupos experimentais em que houve o tratamento com a vitamina D3 quando comparado com os grupos sem a presença dessa vitamina. O gene SEK-1 teve a expressão aumentada somente em um dos grupos experimentais (tratado com a vitamina D3) quando comparado com os demais grupos experimentais. Por fim, o gene PMK-1 teve maior expressão somente em um dos grupos

experimentais (tratado com a vitamina D3 e infectado pela *S. Typhimurium*) quando comparado com os demais grupos experimentais.

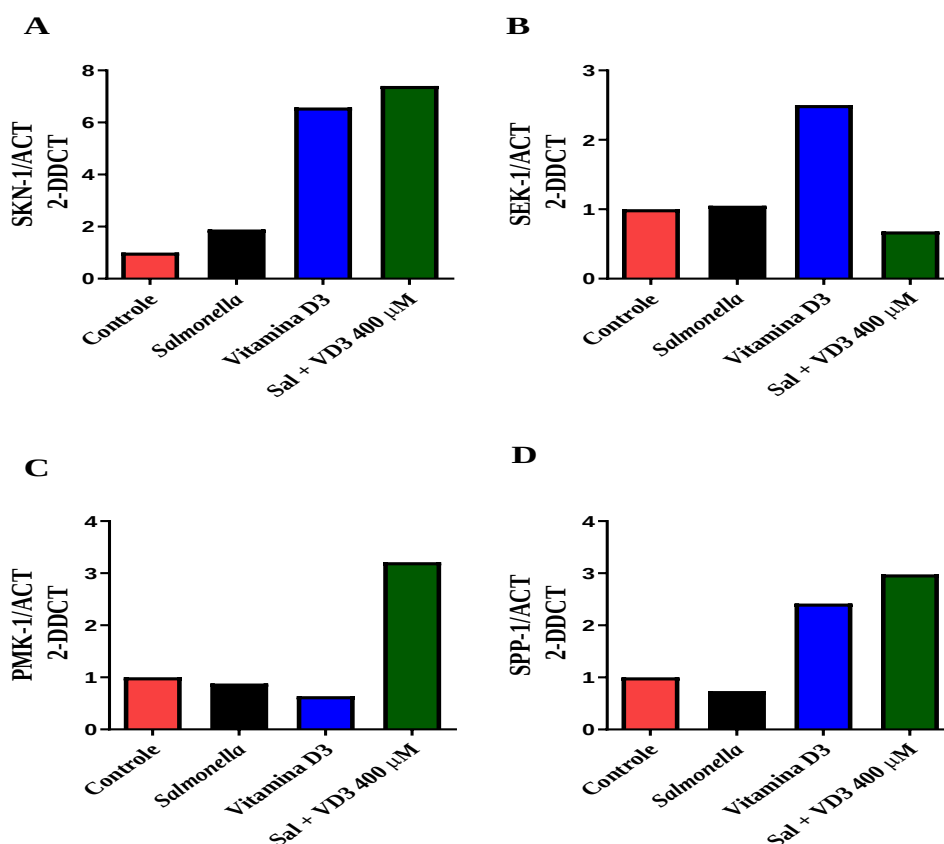


Figura 11 - Expressão de genes da resposta imune inata em *C. elegans*. Foram utilizados 800 vermes em cada grupo experimental. As análises foram realizadas com vermes no estágio L1. A quantidade de vitamina D3 utilizada foi de 400 µM (4,8 µL). O gene ACT-1 foi utilizado como controle positivo em todas as reações. Em (A), (B), (C) e (D) análise da expressão dos genes SKN-1, SEK-1, PMK-1 e SPP-1, respectivamente, utilizando RT-qPCR. Barras representam as médias ± DP de experimentos realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada para todos os grupos utilizando o teste One Way ANOVA ($P < 0,0001$).

5.3 Produção de biofilme

Para observar a influência da vitamina D3 na produção de biofilme pela bactéria *S. Typhimurium* foi realizada análise quantitativa da formação de biofilme utilizando espectrofotometria em condições ambientais favoráveis para a formação de biofilme. Desse modo, foi realizada uma análise comparativa da formação de biofilme em diferentes grupos experimentais contendo ou não a presença da vitamina. Nossos dados indicam claramente que a vitamina influencia positivamente no crescimento da bactéria com uma tendência a dose-dependência, uma vez que na presença da vitamina em sua maior concentração a produção de biofilme foi maior, o que foi diferente no grupo experimental em que não havia a presença da

vitamina (Figura 12). Foram testadas diferentes concentrações de vitamina D3, baseado na possibilidade de relação dose-dependente.

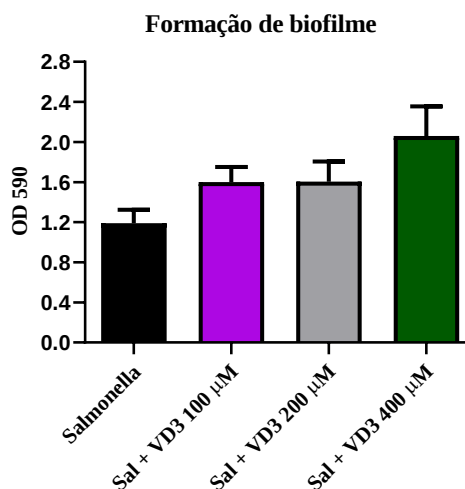


Figura 12 - Formação de biofilme por *S. Typhimurium* na presença de vitamina D3. O grupo *Salmonella* foi utilizado como controle (contendo somente bactéria) e os demais grupos tratados com a vitamina nas concentrações 100, 200 e 400 µM (1.2, 2.4 e 4.8 µL, respectivamente). Barras representam as médias ± DP de experimentos realizados em triplicata utilizando espectrofotometria. A análise estatística foi realizada pelo teste One Way ANOVA ($P < 0,0001$). Foi realizado pós teste de Tukey's e não demonstrou significância entre os grupos.

5.4 Crescimento Bacteriano

Para observar a influência da vitamina D3 no crescimento da *S. Typhimurium* foi realizada análise quantitativa utilizando espectrofotometria em condições ambientais favoráveis para o crescimento bacteriano. Desse modo, foi realizada uma análise comparativa do crescimento desse microrganismo em diferentes grupos experimentais contendo ou não a presença da vitamina nos períodos de 24 e 48 horas.

Analisando os resultados representados na Figura 13, é possível perceber que a vitamina D3 exerce influência positiva discreta no crescimento de *S. Typhimurium*. Na análise de 24 horas é mais perceptível, visto que nos grupos experimentais com a presença da vitamina a bactéria se proliferou mais, o que foi relativamente menor no grupo experimental sem a presença da vitamina. Por outro lado, na análise de 48 horas após o tratamento os resultados se mostraram muito semelhantes em todos os grupos experimentais. Foram testadas diferentes concentrações de vitamina D3, baseado na possibilidade de relação dose-dependente, o que não foi observado.

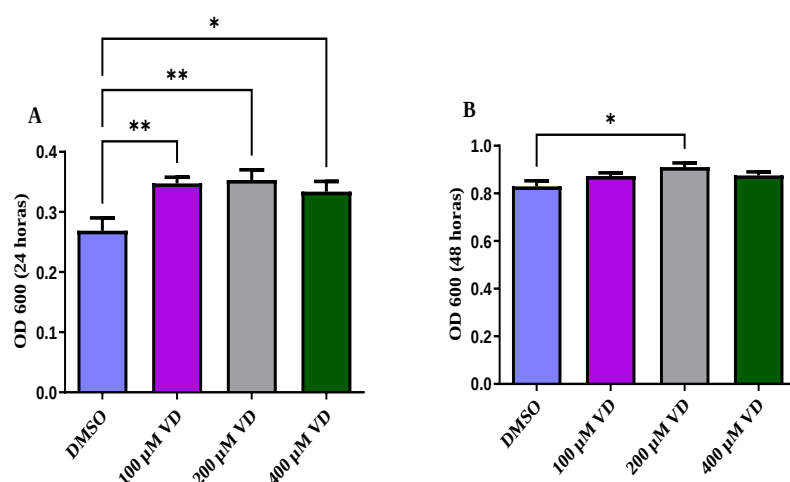


Figura 13 - Crescimento de *S. Typhimurium* na presença de vitamina D3. O grupo experimental DMSO foi utilizado como controle (contendo somente bactéria e DMSO) e os demais grupos tratados com a vitamina nas concentrações 100, 200 e 400 µM (1.2, 2.4 e 4.8 µL, respectivamente). Em (A) os resultados das análises realizadas no período de 24 horas após o tratamento com a vitamina. Em (B) os resultados das análises realizadas no período de 48 horas após o tratamento com a vitamina. Barras representam as médias $\pm$ DP de experimentos realizados em triplicata. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas em * ($P < 0,005$), ** ($P < 0,005$) *** ($P < 0,005$) e **** ($P < 0,0001$).. A análise estatística foi realizada pelo teste One Way ANOVA ($P < 0,05$), com pós teste Tukey's.

6 DISCUSSÃO

Devido aos problemas de saúde pública relacionados às altas taxas de infecção por *S. Typhimurium* e a resistência antimicrobiana desenvolvida por esse microrganismo, nesse estudo, buscamos analisar formas de ação da vitamina D3 na proteção do organismo *modelo C. elegans* durante a infecção, bem como a sua ação direta sobre a proliferação da *S. Typhimurium*.

Dados obtidos em nossos estudos mostraram um aumento na expressão de genes que estão envolvidos com vias de sinalização da resposta imune inata em *C. elegans* na presença da vitamina D3. Tanto os fatores de virulência de patógenos, quanto o *stress* causado ao organismo são capazes de induzir a expressão desses genes. Além disso, fatores ambientais também são capazes de modular a expressão gênica (EWBANK, 2006). Ademais, nutrientes como a vitamina D3 influenciam positivamente a eficácia do sistema imunológico no combate a agentes patogênicos (AGHAYEVA *et al.*, 2021). A regulação da expressão gênica mediada pela vitamina D ocorre por meio da ação do calcitriol hormonal (1,25-dihidroxivitamina D, 1,25D) produzido por células da imunidade inata. O calcitriol regula a expressão dos genes através da sua interação com o receptor da vitamina D (WHITE, 2022).

A expressão do gene SKN-1 pode ser induzida pela ação da vitamina D3, promovendo aumento na longevidade do *C. elegans* (MARK *et al.*, 2016). Não só isso, os genes SKN-1, SPP-1, SEK-1 e PMK-1 estão envolvidos na resposta imune inata do *C. elegans*, promovendo defesa contra microrganismos e aumento na longevidade (EWBANK, 2006). Dessa forma, a partir dos resultados obtidos nesse estudo, é possível relacionar a presença da vitamina D3 com o aumento da expressão dos genes SPP-1, SEK-1, PMK-1 e SKN-1 em *C. elegans* favorecendo a sobrevivência durante a infecção pela *S. Typhimurium*.

Dentre os diferentes sorotipos de *Salmonella spp.* muitos apresentam a capacidade de sobreviver e se proliferar em condições adversas ao longo do seu ciclo de vida. Um dos principais meios pelo qual isso acontece é a capacidade desse microrganismo sentir e perceber o ambiente em que se encontra e assim ativar mecanismos de virulência que colaboram com a sua sobrevivência (Haraga *et al.*, 2008). O biofilme é um mecanismo de resistência desenvolvido pelas bactérias que está associado com a sua sobrevivência em ambientes adversos e favorece a invasão de outros locais (BARBOSA, 2015). Como observado em nossos resultados a vitamina D3 atua como um agente indutor desse mecanismo de sobrevivência da bactéria *S. Typhimurium*.

Estudos realizados por Desai *et al.*, (2019) utilizando o *C. elegans* como organismo modelo para a compreensão do estilo de vida da *S. Typhimurium* mostraram que essa bactéria

atua formando biofilme no intestino do verme favorecendo infecção persistente. Por outro lado, na ausência de biofilme a bactéria leva a morte do *C. elegans* através da inibição das vias inatas do sistema imune (Figura 14). Isso se deve a regulação negativa de genes de virulência da bactéria durante o desenvolvimento do biofilme. Conclui-se, assim, que esse mecanismo bacteriano é utilizado como estratégia de sobrevivência em infecções de longa duração, pois preserva o tempo de vida do hospedeiro e permite que a bactéria continue se proliferando.

Em contrapartida, o biofilme é um fator que geralmente permite o reconhecimento de bactérias e ativação do sistema imune inato do *C. elegans*. Nesse contexto, a produção de biofilme ou ativação dos mecanismos de virulência são resultados de um processo infeccioso que está relacionado a vários fatores, tais como o estado de crescimento da bactéria, condições ambientais durante a infecção, hospedeiro infectado e a resposta imune desencadeada (HARRELL *et al.*, 2021). Diante a essas informações é possível relacionar a formação de biofilme pela *S. Typhimurium* como um mecanismo de sobrevivência no qual essa bactéria se isenta dos seus mecanismos de virulência para continuar se proliferando em ambiente adverso.

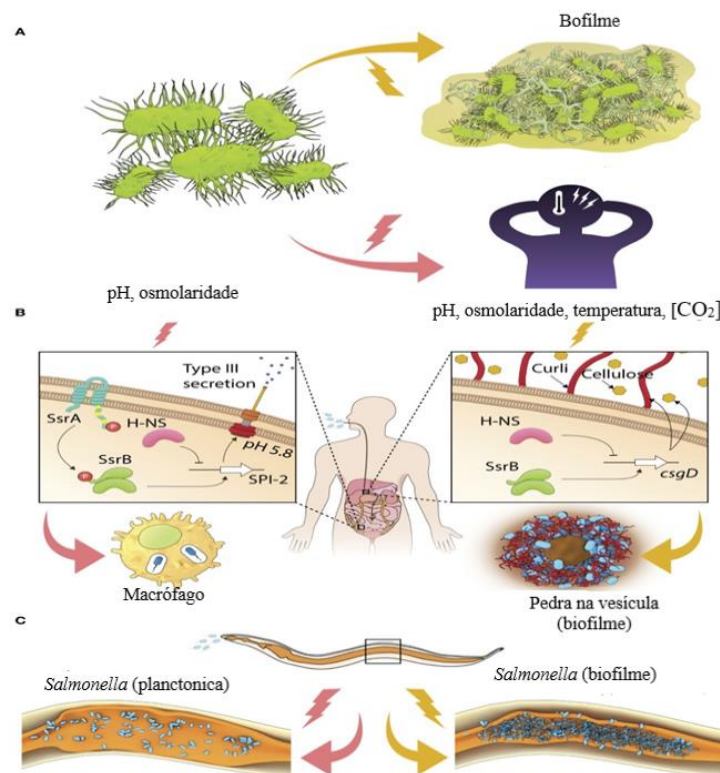


Figura 14 - Regulação ambiental do estilo de vida da *S. Typhimurium*. (A) Um esquema geral que descreve mudanças no estilo de vida da *Salmonella* para favorecer a virulência ou a formação de biofilme. (B) Representação de mecanismos intracelulares envolvidos com o estilo de vida em *Salmonella* e

(C) *Salmonella* forma agregados multicelulares durante infecções persistentes em *C. elegans*. Fonte: adaptado de Desai *et al.*, (2019).

Nesse contexto, os nossos resultados se assemelham ao que está presente na literatura e nos permitem inferir que a vitamina D3 desempenha um papel importante durante a infecção de *C. elegans* por *S. Typhimurium*, seja induzindo a ativação da resposta imune inata e/ou a formação de biofilme promovendo aumento da longevidade do nematoide. Não obstante, outros estudos mostram que a vitamina D3 desempenha um papel essencial durante processos infecciosos. Em um trabalho de revisão realizado por ABDRABBO *et al.*, (2021) foi documentado que a vitamina D3 atua na modulação da resposta imune inata e adaptativa e exerce um papel essencial na redução de riscos de infecções virais, tais como COVID-19.

Além disso, Huang (2021) obteve como resultados de um estudo que a vitamina D3 foi capaz de reduzir colite causada por *S. Typhimurium* em camundongos através da redução de inflamação e da translocação bacteriana. Ainda, em outro estudo publicado pelo mesmo autor, no mesmo ano, foi obtido como resultado que a combinação entre a vitamina D3 e o probiótico *Bifidobacterium longum* promovem efeitos sinérgicos na redução da gravidade de colite causada por *Salmonella* através da supressão de respostas inflamatórias e bloqueando a translocação de bactérias através do aumento de peptídeos antimicrobianos.

Percebe-se, portanto, que a vitamina D3 é capaz de atuar aumentando a eficácia de mecanismos antimicrobianos em *C. elegans* durante infecção por *S. Typhimurium*. Diante disso, ainda que os resultados desse estudo tenham sido obtidos em modelo animal, o uso de vitamina D3 pode ser melhor estudado e constituir uma alternativa futura para tratamento de infecções em humanos, seja como medida profilática ou paliativa de forma individual e/ou combinada reduzindo, assim, o consumo exacerbado de antibióticos que produz efeitos negativos a longo prazo, tais como a resistência bacteriana.

7 CONCLUSÃO

- A vitamina D3 aumenta a expectativa de vida de *C. elegans* durante infecção por *S. Typhimurium*, de forma dose dependente;
- A vitamina D3 induziu a expressão dos genes SKN-1, SEK-1, SPP-1 e PMK-1, constitutivos da resposta imune inata do *C. elegans* durante infecção por *S. Typhimurium* exercendo, portanto, uma ação protetora;
- A vitamina D3 induz a formação de biofilme pela *S. Typhimurium* de forma dose-dependente;
- A vitamina D3 não influencia negativamente o crescimento da *S. Typhimurium*.
Pelo contrário, na presença dessa vitamina a bactéria continuou se proliferando.

Com o presente estudo, obtivemos novas informações acerca dos efeitos imunomoduladores da vitamina D3 (um nutriente essencial da dieta humana) durante o processo infeccioso causado por *S. Typhimurium*, reforçando, assim, a possibilidade do seu uso como alternativa terapêutica em casos de infecção por essa bactéria. Para trabalhos futuros nesta linha de pesquisa, é relevante a verificação da ação dessa vitamina durante infecção por outras espécies bacterianas de interesse clínico.

REFERÊNCIAS

- ABALLAY, A.; YORGEY, P.; AUSUBEL, F. M. Salmonella typhimurium proliferates and establishes a persistent infection in the intestine of *Caenorhabditis elegans*. **Current biology : CB**, v. 10, n. 23, p. 1539–1542, 30 nov. 2000.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular** Elsevier Editora Ltda, 2005.
- ABDRABBO, M. et al. Vitamin D and COVID-19: A review on the role of vitamin D in preventing and reducing the severity of COVID-19 infection. **Protein Science : A Publication of the Protein Society**, v. 30, n. 11, p. 2206, 1 nov. 2021.
- ABOOBAKER, A.; BLAXTE, M. Medical Significance of Phylum Arthropoda. **Annals of medicine**, v. 32, n. 1, p. 23–30, 2000.
- AGHAYEVA, U. et al. DAF-16/FoxO and DAF-12/VDR control cellular plasticity both cell-autonomously and via interorgan signaling. **PLoS Biology**, v. 19, n. 4, p. e3001204, 1 abr. 2021.
- ALBERTS, et al. **Molecular biology of the cell** 4.ed. New York: Garland Science, 2002. 1463p.
- ALTUN, ZF; HALL, DH. **Introduction to C. elegans anatomy**. WormAtlas. 2009. Disponível em: <https://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/mainframe.htm>. Acesso em: 10 maio 2021
- BARBOSA, Á. P. C. Biofilmes e resistência antibiótica nas infecções do trato respiratório superior. **Projeto de Pós Graduação da Universidade Fernando Pessoa, obtenção de título de mestre em ciências farmacêuticas**, p. 76, 2015.
- BLACKWELL, T. K. et al. SKN-1/Nrf, stress responses, and aging in *Caenorhabditis elegans*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 88, n. Part B, p. 290–301, 2015.
- BLAXTER, M. Nematodes: The worm and its relatives. **PLoS Biology**, v. 9, n. 4, p. e1001050, abr. 2011.
- CARLBERG, C. Vitamin D Signaling in the Context of Innate Immunity: Focus on Human Monocytes. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. September, 2019.
- CHAROENNGAM, N.; HOLICK, M. F. **Immunologic effects of vitamin d on human health and disease** **Nutrients** Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 jul. 2020.

Disponível em: </pmc/articles/PMC7400911/>. Acesso em: 6 out. 2021

CONLAN, J. W. Neutrophils prevent extracellular colonization of the liver microvasculature by *Salmonella typhimurium*. **Infection and immunity**, v. 64, n. 3, p. 1043–1047, 1996.

CORSI, A. K. **A biochemist's guide to *Caenorhabditis elegans*** **Analytical Biochemistry** NIH Public Access, , 1 dez. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16942745>>. Acesso em: 21 jun. 2019

CUTTER, A. D. **Molecular evolution inferences from the *C. elegans* genome**. **WormBook : the online review of *C. elegans* biology**, 2010.

DESAI, S. K. et al. *Salmonella* biofilms program innate immunity for persistence in *Caenorhabditis elegans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 25, p. 12462–12467, 18 jun. 2019.

DIMITROV, V.; WHITE, J. H. **Vitamin D signaling in intestinal innate immunity and homeostasis** **Molecular and Cellular Endocrinology** Elsevier Ireland Ltd, , 15 set. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28412519/>>. Acesso em: 2 fev. 2021.

ENG, S. K. et al. *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. **Frontiers in Life Science**, v. 8, n. 3, p. 284–293, 3 jul. 2015.

ENGELMANN, I.; PUJOL, N. Innate immunity in *Celegans*. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 708, p. 105–121, 2010.

EWBANK, J. J. **Signaling in the immune response**. **WormBook : the online review of *C. elegans* biology** WormBook, , 2006. Disponível em: <<http://www.wormbook.org.>>. Acesso em: 6 jun. 2022.

FACHINI, L. **Estudo de mecanismos de patogenicidade utilizados pela *salmonella enterica* sorotipo Typhimurium e *salmonella enterica* sorotipo Typhi no intestino de modelos animais de infecção**. 2015. 120 f. Tese (Doutorado em Patologia) -Faculdade de Medicina – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUBDA4YEPF/1/tese_luciana_fachini_da_costa.pdf>. Acesso em: 10 de jan. 2022.

GAYET, R. et al. Vaccination against *Salmonella* Infection: the Mucosal Way. **Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR**, v. 81, n. 3, set. 2017.

GOLPOUR, A.; BERESWILL, S.; HEIMESAAT, M. M. Antimicrobial and immune-modulatory effects of vitamin D provide promising antibiotics-independent approaches to tackle bacterial infections – lessons learnt from a literature survey. **European Journal of Microbiology and Immunology**, v. 9, n. 3, p. 80–87, 2019.

GRENIER, D. *et al.* Vitamin D inhibits the growth of and virulence factor gene expression by *Porphyromonas gingivalis* and blocks activation of the nuclear factor kappa B transcription factor in monocytes. **Journal of Periodontal Research**, v. 51, n. 3, p. 359–365, 2016.

HAHN, G. F.; OLIVEIRA, J. R. DE; BOCK, P. M. O papel do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) no diabetes mellitus. **Clin. biomed. res**, p. 203–213, 2017.

HARAGA, A.; OHLSON, M. B.; MILLER, S. I. **Salmonellae interplay with host cells** **Nature Reviews Microbiology**. Nature Rev Microbiol., jan. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18026123/>>. Acesso em: 2 maio. 2022

HARRELL, J. E. *et al.* **Salmonella Biofilm Formation, Chronic Infection, and Immunity Within the Intestine and Hepatobiliary Tract** **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. Frontiers Media SA,, 2 fev. 2021. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC7885405/](https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.678854)>. Acesso em: 2 maio. 2022

HEWISON, M. Vitamin D and innate and adaptive immunity. **Vitamins and Hormones**, v. 86, p. 23–62, 2011.

HOOTON, S.; ATTERBURY, R.J.; CONNERTON, I.F. Application of a bacteriophage cocktail to reduce *Salmonella* Typhimurium U288 contamination on pig skin. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 151, p.157-163, 2011.

HOYT, J. M. *et al.* The SEK-1 p38 MAP kinase pathway modulates Gq signaling in *Caenorhabditis elegans*. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 7, n. 9, p. 2979–2989, 1 set. 2017.

HUANG, F. C. Vitamin D differentially regulates *Salmonella* -induced intestine epithelial autophagy and interleukin-1 β expression. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 47, p. 10353–10363, 21 dez. 2016.

HUANG, F. C.; HUANG, S. C. Active vitamin D3 attenuates the severity of *Salmonella* colitis in mice by orchestrating innate immunity. **Immunity, inflammation and disease**, v. 9, n. 2, p. 481–491, 1 jun. 2021.

HUANG, F. C.; HUANG, S. C. The cooperation of bifidobacterium longum and active vitamin D3 on innate immunity in salmonella colitis mice via vitamin D receptor. **Microorganisms**, v. 9, n. 9, 1 set. 2021.

HUMMELL, N. A.; REVTOVICH, A. V.; KIRIENKO, N. V. Novel immune modulators enhance Caenorhabditis elegans resistance to multiple pathogens. **bioRxiv**, n. December 2020, p. 1–22, 2020.

JAJERE, S. M. **A review of Salmonella enterica with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and adaptation and antimicrobial resistance including multidrug resistance** *Veterinary World*, 2019. Disponível em: </pmc/articles/PMC6515828/>. Acesso em: 9 jan. 2022

KAISER, P.; HARDT, W. D. **Salmonella Typhimurium diarrhea: Switching the mucosal epithelium from homeostasis to defense** *Current Opinion in Immunology* *Curr Opin Immunol*, ago. 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21726991/>. Acesso em: 22 jan. 2022

KUPZ, A. et al. Contribution of Thy1+ NK cells to protective IFN- γ production during Salmonella typhimurium infections. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 6, p. 2252–2257, 5 fev. 2013.

MANDAL, R. K.; JIANG, T.; KWON, Y. M. Genetic Determinants in Salmonella enterica Serotype Typhimurium Required for Overcoming In Vitro Stressors in the Mimicking Host Environment. **Microbiology spectrum**, v. 9, n. 3, 22 dez. 2021.

F, S.; VENTURA, N. C. **elegans as a model organism for human mitochondrial associated disorders** *Mitochondrion*, 1 set. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26906059/>. Acesso em: 20 jul. 2020

MARK, K. A. et al. Vitamin D Promotes Protein Homeostasis and Longevity via the Stress Response Pathway Genes skn-1, ire-1, and xbp-1. **Cell Reports**, v. 17, n. 5, p. 1227–1237, 25 out. 2016.

MESSING, J.; HEUBERGER, R.; SCHISA, J. Effect of Vitamin D₃ on Lifespan in Caenorhabditis elegans. **Current Aging Science**, v. 6, n. 3, p. 220–224, 31 dez. 2013.

PHAM, O. H.; MCSORLEY, S. J. Protective host immune responses to Salmonella infection. **Future microbiology**, v. 10, n. 1, p. 101, 1 jan. 2015.

- POUPET, C. *et al.* *Caenorhabditis elegans*, a Host to Investigate the Probiotic Properties of Beneficial Microorganisms. **Frontiers in Nutrition**, v. 7, n. August, p. 1–22, 2020.
- PRIETL, B. *et al.* Vitamin D and immune function. **Nutrients**, v. 5, n. 7, p. 2502–2521, 2013.
- RIDDLE, D. L. The genetics of development and behavior in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of nematology**, v. 10, n. 1, p. 1–16, 1978.
- SANTOS, R.L. e BÄUMLER, A.J. Cell tropism of *Salmonella enterica*. **International Journal of Medical Microbiology**. v.294, p.225-233, 2004.
- SIDDIQUI, M. *et al.* Immune modulatory effects of vitamin d on viral infections. **Nutrients**, v. 12, n. 9, p. 1–16, 2020.
- SMOLENTSEVA, O. *et al.* Mechanism of biofilm-mediated stress resistance and lifespan extension in *C. elegans*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–16, 2017.
- SUN, J.; ABALLAY, A.; SINGH, V. Cellular Responses to Infections in *Caenorhabditis elegans*. In: **Encyclopedia of Cell Biology**. [s.l.] Elsevier Inc., 2016. v. 2p. 845–852.
- SUN, X.; CHEN, W. D.; WANG, Y. D. DAF-16/FOXO transcription factor in aging and longevity. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. AUG, p. 1–8, 2017.
- TROCHOUTSOU, A. *et al.* Vitamin-D in the Immune System: Genomic and Non-Genomic Actions. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 11, p. 953–963, 10 jul. 2015.
- TULLET, J. M. A. *et al.* The SKN-1/Nrf2 transcription factor can protect against oxidative stress and increase lifespan in *C. elegans* by distinct mechanisms. **Aging Cell**, v. 16, n. 5, p. 1191–1194, 2017.
- VAN DER HOEVEN, R. *et al.* Ce-Duox1/BLI-3 generated reactive oxygen species⁵ trigger protective SKN-1 activity via p38 MAPK signaling during infection in *C. elegans*. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 12, 2011.
- WAN, J. *et al.* Defective apoptotic cell clearance activates innate immune response to protect *Caenorhabditis elegans* against pathogenic bacteria. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 75–83, 2021.
- WANG, Z.; SHERWOOD, D. R. Dissection of Genetic Pathways in *C. elegans*. In: **Methods in Cell Biology**. [s.l.] NIH Public Access, 2011. v. 106p. 113–157.
- WHITE, J. H. **Emerging Roles of Vitamin D-Induced Antimicrobial Peptides in A ntiviral**

Innate Immunity Nutrients. Nutrients, 1 jan. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35057465/>>. Acesso em: 16 fev. 2022

WormBase: recurso de informação de nematóides – SEK-1. Disponível em: <https://wormbase.org/species/c_elegans/gene/WBGene00004758#0-9f-10>. Acesso em: 11 jan. 2020.

Y, K.; E, M. Caenorhabditis elegans immune conditioning with the probiotic bacterium Lactobacillus acidophilus strain NCFM enhances gram-positive immune responses. **Infection and immunity**, v. 80, n. 7, p. 2500–2508, jul. 2012.

YOUNGMAN, M. J.; ROGERS, Z. N.; KIM, D. H. A decline in p38 MAPK signaling underlies immunosenescence in caenorhabditis elegans. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 5, maio 2011.

ZDRENGHEA, M. T. *et al.* Vitamin D modulation of innate immune responses to respiratory viral infections. **Reviews in Medical Virology**, v. 27, n. 1, p. 1–12, 2017.

ZEČIĆ, A.; DHONDT, I.; BRAECKMAN, B. P. **The nutritional requirements of Caenorhabditis elegans** *Genes and Nutrition* BioMed Central Ltd., , 6 maio 2019.

APENDICE A – Protocolos de execução

1) Protocolo de sincronização

Materiais

- 1 Tubo Falcon de 15 para colocar os vermes lavados
- 1 Tubo Falcon de 15 para fazer o contrapeso na centrífuga
- 1 Tubo Falcon de 15 para fazer a solução de água sanitária com NaOH
- 1 Placa (no caso da grande, aí vai depender do experimento) para colocar os ovos depois de sincronizados
- 1 Placa para ver no microscópio se romperam (pode ser a tampa da placa que lavou) (item 5)
- Pipeta de plástico
- 1 Béquer para o descarte (item 5.1)
- 1 pipeta automática
- 3 ponteiros da pipeta automática

OBS: Tudo isso contando com que as soluções (item 4) a serem utilizadas já estejam prontas.

Procedimentos

1. Retirar o excesso de ágar se houver, na placa antes de prosseguir com os outros passos
2. Colocar água na placa até sobrepor todo o meio → “Lavar a placa”
3. Nesses passos os vermes vão literalmente boiar na água
4. Após esperar um pouco, deve-se agitar um pouco a placa e pipetar o líquido sem colocar a pipeta no ágar. O conteúdo pipetado deve ser colocado no tubo Falcon de 15 (não há uma quantidade de placar certa por tubo):
5. Após coletar e encher o tubo deve-se centrifugar
6. Colocar 2min na centrífuga (3 000 rpm) depois pipetar até retirar todo o líquido até a altura de 1,5mL

Obs. É importante destacar que na centrífuga os volumes devem estar em quantidades proporcionais em cada par oposto.

7. Pipetar 250 μ L de NaOH 10 M (solução está na caixa da geladeira) e 1mL de água sanitária também na caixa. O restante deve ser completado com água até 5mL (deve

tomar cuidado com a pipeta automática). Tudo isso em um tubo Falcon separado do que estão os vermes lavados.

8. Colocar a solução 4 na que contém os vermes que foi preparada no item 3 e agitar bem até no máximo 3min (deve-se pipetar e olhar no micro dentro desse tempo para ver se os vermes romperam a cada 30 segundos).
9. Quando romper, deve-se colocar M9 até completar e levar para a centrífuga por 3min e repetir esse último processo (de retirar o sobrenadante, completar M9 e levar à centrifuga) por 3 vezes
10. Tirar o sobrenadante e completar com M9 até 10mL ou 14mL (dependendo do tamanho da placa) e transferir para uma placa. Se ficar um resto no fundo deve-se voltar um pouco e tentar tirar. OBS: cada placa de 100mm cabe 30mL
11. Levar ao microscopio para ver se realmente ficou só com os ovos
12. Guardar em estufa a 20 graus
13. Por fim aguardar 12h até que os ovos vão eclodir para o estágio L1.

2) Protocolo de transferência de placas

Materiais

- Balança
- Fluxo
- Placas grandes e pequenas (250mL – 12 pequenas e 3 grandes)
- Erlen
- Soluções
- 10 ponteiros para pipeta eletrônica
- Pipeta eletrônica
- NaCl 3g
- Bactoagar 17g
- Bactopeptona 2,5g
- H₂O

Procedimentos

1. Ligar a balança
2. Ligar o fluxo e ligar a exaustão

3. Lavar as placas e deixar na água sanitária. Antes de colocar no fluxo, deve-se borrifar álcool e limpar a parte de entro. Em seguida, colocar no fluxo as placas e os outros materiais, que serão citados posteriormente, e borrifar álcool e passar papel toalha dentro das placas
4. OBS: Todas as vezes que for fazer as placas deve-se autoclavar as pipetas.
5. **A bactéria e o colesterol não vão no fluxo, apenas coloca-los dentro quando for preparar**
6. Dentro do fluxo, por 1 hora, fica:.
7. Adicionar o NaCl, Bactopeptona, Bactoagar e água e autoclavar.
8. Em seguida adicionar MgSO_4 ; CaCl_2 e tampão fosfato
 - a. Dispensar o meio em placas de petri após o ágar solidificar, pipetar *E.coli* OP50 em cada placa e espalhar uniformemente. Colocar as placas com a tampa para baixo em estufa a 37 graus de um dia para o outro.

3) Protocolo de meio LB (líquido)

Materiais

- Extrato de levedura (1.25 g)
- NaCl (2.5 g)
- Triptona (2.5 g)
- Água destilada (250 mL)

Procedimentos

- 1) Pesar todos os reagentes em uma balança precisa e adicionar a água;
- 2) Autoclavar

4) Protocolo de tampão M9 (líquido)

Materiais

- KH_2PO_4 (1.5 g)
- Na_2HPO_4 (3.0 g)
- NaCl (2.5 g)
- Água destilada (500 mL)
- MgSO_4 (0.5 mL 1M)

Procedimentos

- 1) Pesar todos os reagentes (exceto o MgSO_4) em uma balança precisa e adicionar a água;

- 2) Autoclavar e deixar esfriar
- 3) Quando estiver frio adicionar o MgSO_4

5) Protocolo de extração de RNA

- MATERIAIS
- M9
- Trizol
- Clorofórmio
- Isopropanol
- Etanol 75%

PROCEDIMENTOS

1. Separar 1000 vermes em 300 μl de M9 em um tubo Eppendorf.
2. Adicionar 500 μl de Trizol e misturar.
3. Incubar 5 minutos.
4. Adicionar 0,1 mL clorofórmio.
5. Incubar 3 por 3 minutos.
6. Centrifugar por 15 minutos girando em 12.000g à 4°C.
7. Transferir cuidadosamente o sobrenadante.
8. Adicionar 250 μl de isopropanol.
9. Incubar por 10 minutos
10. Centrifugar por 10 minutos girando em 12.000g à 4°C.
11. Descartar com pipetador (formar pellet)
12. Ressuspender o pellet em 0,5 mL de etanol 75%.
13. Vortexar brevemente (pode usar uma “manha” que o Rapha ensinou).
14. Centrifugar por 5 minutos girando em 7500g a 4°C.
15. Descartar o sobrenadante e deixar secar entre 5 e 10 minutos.
16. Adicionar 15 μl de RNase-free

6) Protocolo RT-qPCR

MATERIAIS

- 2x qPCRBIO SyGreen Mix
- Forward primer (10 μM)

- Reverse primer (10 μ M)
- Template DNA
- Água para PCR

PROCEDIMENTOS

1. Antes de começar, agite rapidamente o 2x qPCRBIO SyGreen Mix.
2. Prepare um master mix com base no seguinte:
3. Os valores devem ser ajustados de acordo com a quantidade de amostras
4. Distribuir na placa de escolha para qPCR e colocar para leitura no termociclador QuantStudio após ter realizado o “desenho” em software específico.