



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

DIVISON DE MELO PACÍFICO

**PAPEL DO RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSIENTE VANILÓIDE 4 (TRPV4)
NA MORTE CELULAR E NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA PELAS
TOXINAS A E B DO *Clostridioides difficile* EM CÉLULAS GLIAIS ENTÉRICAS**

FORTALEZA

2024

DIVISON DE MELO PACÍFICO

**PAPEL DO RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO VANILÓIDE 4 (TRPV4)
NA MORTE CELULAR E NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA PELAS
TOXINAS A E B DO *Clostridioides difficile* EM CÉLULAS GLIAIS ENTÉRICAS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Área de concentração: Morfologia

Orientadora: Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- P125p Pacífico, Dvison de Melo.
Papel do receptor de potencial transiente vanilóide 4 (TRPV4) na morte celular e na resposta inflamatória induzida pelas toxinas A e B do Clostridioides difficile em células gliais entéricas / Dvison de Melo Pacífico. – 2024.
186 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2024.
Orientação: Prof. Dr. Gerly Anne de Castro Brito.
1. Clostridioides difficile. 2. Células gliais entéricas. 3. TRPV4. 4. Inflamação. 5. Morte celular. I.
Título.

CDD 610

DIVISON DE MELO PACÍFICO

**PAPEL DO RECEPTOR DE POTENCIAL TRANSITÓRIO VANILÓIDE 4 (TRPV4)
NA MORTE CELULAR E NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA PELAS
TOXINAS A E B DO *Clostridioides difficile* EM CÉLULAS GLIAIS ENTÉRICAS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Área de concentração: Morfologia
Orientadora: Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Gerly Anne de Castro Brito (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^º. Dr. Vivaldo Mora Neto
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Prof^ª. Dra. Caroline Addison Carvalho Xavier de Medeiros
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Prof^º. Dr. Marcellus Henrique Loiola Ponte de Souza
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dra. Patricia Castelucci
Universidade de São Paulo (USP)

EPÍGRAFE

“Paciência e perseverança tem o efeito mágico de fazer as dificuldades desaparecerem e os obstáculos sumirem.”

John Quincy Adams

AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo e primeiramente a **Deus**, pois nos muitos momentos de dificuldades passados ao longo dessa trajetória foi Ele quem me manteve sempre de pé dando forças e mostrando o caminho certo para seguir em frente e, assim, estar finalizando o meu Doutorado.

À minha orientadora, Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito, por ter aceitado orientar-me desde a época do mestrado mesmo não sabendo se eu seria um bom pós-graduando. Agradeço ainda por ter aceitado a ideia de executarmos esse projeto e também por toda paciência, amizade e ensinamentos que recebi durante toda essa jornada, além de ter confiado em minha pessoa. Profa. Gerly, não sei se já cheguei a falar esta frase logo à frente para senhora: Prof^a você é um exemplo de pesquisadora que todo e qualquer pós-graduando almeja trabalhar. Deixo a minha gratidão por todo aprendizado adquirido nessa minha caminhada de pós-graduando.

Ao Prof. Dr. Jand-Venes Rolim Medeiros, por quem tenho uma grande admiração e pela orientação no período de estudos no curso de Biomedicina, pois foi o senhor que mostrou o caminho da pesquisa.

Aos meus pais, Socorro e Veridiano, por terem me proporcionado toda a educação digna que tenho hoje e também por todos os conselhos que recebi de vocês até o presente momento. Agradeço ainda aos meus irmãos Daylson e Deylson pelo apoio.

À minha esposa, Leiliane, por ter estado sempre presente ao meu lado, incentivando e segurando as minhas mãos para que eu nunca viesse a desistir dessa jornada árdua e também pelos conselhos que recebo de você todos os dias. Obrigado por sempre ter apoiado as minhas decisões e também por sempre ter entendido os momentos que fiquei um pouco ausente de você devido à pesquisa e a escrita.

À Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão, pela amizade e exemplo de professora e pesquisadora. Agradeço também aos demais professores do departamento de morfologia (NEMPI) que faço parte e da Pós-graduação que de alguma forma contribuiu com o meu aprendizado.

À Josy, pela ajuda dada no laboratório NEMPI em relação aos experimentos e também por compartilhar seus aprendizados sobre a pesquisa.

Agradeço à Lucianny por todos os experimentos que realizamos juntos ao longo desses quatro anos de doutorado e também pelos momentos de tristeza pelos resultados não saírem como foi planejado.

Ao Maick pelas ajudas que tive no final dessa etapa dos experimentos.

Agradeço também pelos parceiros que fiz ao longo de toda essa jornada de pesquisa na UFC: Lucas Nicolau; Andrea Viana; Letícia; Deiziane; Cecília; André; Rafaela Moreira.

Às alunas IC (iniciação científica): Simone e Ellen, pela ajuda em muitos experimentos.

Aos técnicos do NEMPI, Junior e Ludmila.

À secretária da Pós-graduação, Lucélia, por sempre ter ajudado nos momentos das dúvidas que surgiam.

Aos membros da banca, por atenderem ao nosso convite para participar da minha defesa de doutorado e contribuírem para melhoria dessa pesquisa.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) pela oportunidade de desenvolver a minha pesquisa nessa instituição.

Aos órgãos de fomento, Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa auxílio e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

RESUMO

C. difficile, bactéria Gram-positiva, anaeróbia formadora de esporos, é considerada a principal causa de diarreia associada ao uso de antibióticos em pacientes hospitalizados, causando a infecção por *C. difficile* (CDI). Os principais fatores de virulência do *C. difficile* são as toxinas A e B (TcdA e TcdB), que estão envolvidas na resposta inflamatória e morte celular do epitélio intestinal. As células gliais entéricas (CGEs) exercem um papel central na homeostase funcional do epitélio intestinal e participam da patogênese de doenças inflamatórias intestinais (DII). O receptor de potencial transitório vanilóide 4 (TRPV4) é um canal catiônico não seletivo, permeável ao Ca^{2+} e amplamente expresso na superfície celular do epitélio gastrointestinal, participando também da fisiopatologia das DII. Esse receptor é ativado por vários estímulos, entre eles, as endotoxinas bacterianas. Sabendo que o TRPV4 está envolvido no processo inflamatório do trato gastrintestinal, então o objetivo desta pesquisa foi avaliar a expressão do TRPV4 em CGEs e o seu papel na resposta inflamatória e na morte celular induzidas por TcdA e TcdB do *C. difficile* nessas células, bem como sua expressão no ceco e cólon de camundongos infectados por *C. difficile*. Para avaliar a expressão e o papel do TRPV4, as CGEs foram incubadas com TcdA (50ng/mL) ou TcdB (1ng/mL) por 18h na presença ou ausência do antagonista do receptor TRPV4 (RN-1734, 100 μM). A expressão do TRPV4 em CGEs foi analisada por qPCR, Western blotting e imunofluorescência. Já o seu papel na resposta inflamatória (NF κ B, TNF- α , *IL-6* e *IL-1 β*) e apoptose (ligação de fosfatidilserina à anexina-V, caspase-3 clivada e *bcl-2*) foi avaliado por imunofluorescência (NF κ B e TNF- α), qPCR (*IL-6*, *IL-1 β* e *bcl-2*), ensaio de luminescência (anexina-V) e Western blotting (caspase-3 clivada). A expressão do TRPV4 no ceco e cólon de camundongos infectados por *C. difficile* (VPI10463) foi analisada por imunohistoquímica. TcdA e TcdB aumentam a expressão gênica e proteica do TRPV4 em CGEs. RN-1734, antagonista do TRPV4, diminuiu de forma significativa a translocação nuclear do NF κ B em CGEs expostas as toxinas. Além disso, o antagonista diminuiu a expressão de TNF- α e expressão gênica de *IL-6* em CGEs exposta a TcdA, mas não foi capaz de diminuir a expressão induzida por TcdB. No entanto, o RN-1734 não diminuiu expressão gênica de *IL-1 β* pelas toxinas. RN-1734 diminuiu a apoptose nas CGEs, reduziu a ativação de caspase-3 e regulou positivamente a expressão gênica do fator antiapoptótico *bcl-2* em CGEs induzidas pelas toxinas. Camundongos infectados por *C. difficile* tiveram um aumento significativo da expressão do TRPV4 no ceco e cólon e este aumento do TRPV4 foi detectado nas células do epitélio, na submucosa e nas células do plexo mioentérico em comparação com os não infectados. Com base nos achados da pesquisa, conclui-se que a infecção pelo *C. difficile* e a ação de suas toxinas em CGEs induzem a expressão do TRPV4 e ativação desse receptor pelas toxinas intensifica a resposta inflamatória e induz morte celular e o bloqueio desse canal diminui morte celular por reduzir a ativação de caspase-3 e também por regular positivamente a expressão de *bcl-2* nas CGEs.

Palavras-chave: *C. difficile*; Células gliais entéricas; TRPV4; Inflamação; Morte celular.

ABSTRACT

C. difficile, a Gram-positive, spore-forming anaerobic bacterium, is considered the main cause of diarrhea associated with antibiotic use in hospitalized patients, causing *C. difficile* infection (CDI). The main virulence factors of *C. difficile* are toxins A and B (TcdA and TcdB), which are involved in the inflammatory response and cell death of the intestinal epithelium. Enteric glial cells (EGCs) play a central role in the functional homeostasis of the intestinal epithelium and in inflammatory bowel diseases (IBD) pathogenesis. The receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) is a non-selective, Ca²⁺ permeable cation channel widely expressed on the cell surface of the gastrointestinal epithelium and also plays an important role in the pathophysiology of IBD. This receptor is activated by various stimuli, such as bacterial endotoxins. Knowing that TRPV4 is involved in the inflammatory process of the gastrointestinal tract, the objective of this research was to evaluate the expression of TRPV4 in EGCs and its role in the inflammatory response and cell death induced by TcdA and TcdB of *C. difficile* in these cells, as well as its expression in the cecum and colon of mice infected by *C. difficile*. To evaluate the expression and role of TRPV4, EGCs were incubated with TcdA (50ng/mL) or TcdB (1ng/mL) for 18h in the presence or absence of the TRPV4 receptor antagonist (RN-1734, 100μM). TRPV4 expression in EGCs was analyzed by qPCR, Western blotting and immunofluorescence. Its role in the inflammatory response (NFκB, TNF-α, *IL-6* and *IL-1β*) apoptosis (phosphatidylserine binding to annexin-V, cleaved caspase-3 and *bcl-2*) evaluated by immunofluorescence (NFκB and TNF-α), qPCR (*IL-6*, *IL-1β* and *bcl-2*), luminescence assay (annexin-V) and Western blotting (cleaved caspase-3). TRPV4 expression in the cecum and colon of mice infected with *C. difficile* (VPI10463) was analyzed by immunohistochemistry. TcdA and TcdB increase TRPV4 gene and protein expression in EGCs. RN-1734, a TRPV4 antagonist, significantly decreased NFκB nuclear translocation in EGCs induced by both toxins. Furthermore, the antagonist decreased the protein expression of TNF-α and gene expression of *IL-6* in EGCs exposed to TcdA, but did not decrease the expression induced by TcdB. However, RN-1734 did not decrease *IL-1β* gene expression induced by toxins. RN-1734 decreased apoptosis in EGCs, reduced caspase-3 activation and upregulated antiapoptotic factor *bcl-2* in toxin-induced EGCs. Mice infected with *C. difficile* had a significant increase in TRPV4 expression in the cecum and colon and this increase in TRPV4 was detected in epithelial cells, submucosa and myenteric plexus cells compared to uninfected. Based on these findings, infection caused by *C. difficile* and the action of its toxins on CGEs induce the expression of TRPV4, which in turn intensifies the inflammatory response and induces cell death by stimulating caspase-3 activation and also by downregulating *bcl-2* expression in EGCs.

Keywords: *C. difficile*; Enteric glial cells; TRPV4; Inflammation; Cell death.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Divisão das células gliais entéricas em subtipos e suas características.....	37
Tabela 2 – Primers utilizados no qPCR	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Microbiologia de <i>C. difficile</i> e suas características morfológicas.....	19
Figura 2 – Locus de patogenicidade (PaLoc) das toxinas produzidas por <i>C. difficile</i>	22
Figura 3 – Organização dos quatros domínios funcionais das toxinas de <i>C. difficile</i>	24
Figura 4 – Mecanismo de ação das toxinas de <i>C. difficile</i>	26
Figura 5 – Ciclo GTPase e inibição pelas TcdA e TcdB de <i>C. difficile</i>	28
Figura 6 – Patogênese da infecção causada por <i>C. difficile</i>	30
Figura 7 – Endoscopia da colite pseudomembranosa causada por <i>C. difficile</i>	31
Figura 8 – Organização dos plexos no sistema nervoso entérico (SNE).....	35
Figura 9 – Precusores do SNE e sua embriologia.	36
Figura 10 – Efetores chave da ativação e sinalização das vias intracelulares do canal TRPV4.	41
Figura 11 – Estrutura do canal TRPV4 com os principais domínios funcionais.....	42
Figura 12 – Esquema de indução do modelo de CDI e protocolo experimental.	55
Figura 13 – TcdA e TcdB aumentam a expressão gênica do TRPV4 em CGEs.....	56
Figura 14 – TcdA e TcdB aumentam os níveis protéicos do TRPV4 em CGEs.....	57
Figura 15 – TcdA e TcdB aumentam quali e quantitativamente a imunomarcção do TRPV4 em CGEs.....	58
Figura 16 – Efeito do antagonista do TRVP4 (RN-1734) na viabilidade das CGEs.....	59
Figura 17 – Antagonista do receptor TRPV4 diminui quantitativo a translocação nuclear do NFκBp65 em CGEs induzidas por TcdA e TcdB do <i>C. difficile</i>	60
Figura 18 – Antagonista do TRPV4 diminui a translocação nuclear do NFκBp65 em CGEs induzida por TcdA do <i>C. difficile</i>	61
Figura 19 – Antagonista do TRPV4 diminui a translocação nuclear do NFκBp65 em CGEs induzida por TcdB do <i>C. difficile</i>	62
Figura 20 – Antagonista do TRPV4 diminui quantitativamente a intensidade média de fluorescência do TNF-α em CGEs induzidas por TcdA e TcdB do <i>C. difficile</i>	63
Figura 21 – Antagonista do TRPV4 diminui a imunomarcção para TNF-α em CGEs expostas a TcdA do <i>C. difficile</i>	64
Figura 22 – Antagonista do TRPV4 diminui a imunomarcção para TNF-α em CGEs expostas a TcdB do <i>C. difficile</i>	65
Figura 23 – Antagonista do TRPV4 diminui a expressão gênica de IL-6 em CGEs exposta a TcdA, mas não pela TcdB.	66

Figura 24 – Antagonista do TRPV4 diminui a morte celular induzida por TcdA e TcdB em CGEs.....	68
Figura 25 – Antagonista do TRPV4 reduz a ativação de caspase-3 induzida por TcdA e TcdB em CGEs.....	69
Figura 26 – Antagonista do TRPV4 regula positivamente a expressão gênica de <i>bcl-2</i> em CGEs induzida por TcdA e TcdB.....	70
Figura 27 – Infecção por <i>C. difficile</i> em camundongos aumenta a imunomarcação para o TRPV4 no ceco e no cólon.....	71
Figura 28 – Infecção por <i>C. difficile</i> em camundongos aumenta quantitativamente a imunomarcação para o TRPV4 no ceco e no cólon.....	72
Figura 29 – Possível mecanismo da participação do TRPV4 na ação da TcdA e TcdB nas CGEs.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BI – Tipo por análise de fragmentos gerados por endonucleases de restrição

Bcl-2 – Proteína da família do linfoma de células B antiapoptótico 2

bcl-2 – Gene da família do linfoma de células B antiapoptótico 2

CROP – Combinações repetitivas de estruturas oligopeotídicas

CDI – do inglês “*Clostridium difficile infection*” (Infecção por *C. difficile*)

cdtA – Gene que codifica a subunidade enzimática A da toxina binária produzida por *C. difficile*

cdtB – Gene que codifica a subunidade ligante B da toxina binária produzida por *C. difficile*

CdtLoc – Região gênica que codifica a toxina binária produzida por *C. difficile*

cdtR – Gene que codifica o regulador positivo da expressão das subunidades A e B da toxina binária produzida por *C. difficile*

CPD – Domínio da cisteína protease

CTD – Toxina binária produzida por *C. difficile*

CWP – do inglês “*Clostridial Wall Protein*” (Proteínas de parede clostridial)

Cwp84 – cisteína protease ancorada na parede celular de *C. difficile*

CCP – Caldo de carne picado

CGRP – Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

FliC – Flagelina

FliD – Proteína Cap Flagelar

fliC – Gene que codifica a flagelina

fliD – Gene que codifica a proteína CAP flagelar

FTICR – Ressonância de ciclotrônica de íons com transformada de Fourier

GTD – Domínio N-terminal da glicosiltransferase

GTPases – Família de enzimas hidrolases que se ligam e hidrolizam o GTP

GDNF – fatores neurotróficos derivados de células gliais

Hsp – do inglês “*heat shock protein*” (proteína de choque térmico)

Hsp60 – do inglês “*heat shock proteins 60 family*” (família de proteínas de choque térmico)

ICC – Instituto do Câncer do Ceará

IL-1 β – Interleucina-1 β

iNOS – Óxido nítrico sintase induzida

IP3 – Receptor de trifosfato de inositol

kDa – KiloDalton

NAP – do inglês “*North American Pulsotype*” (Pulsotipo Norte Americano)

NF- κ B – Fator de transcrição nuclear- κ B

PaLoc – do inglês “*Pathogenicity locus*” (Locus de Patogenicidade)

PCR – do inglês “*Polymerase Chain Reaction*” (Reação em cadeia da polimerase)

PFGE – do inglês “*Pulsed-field Gel Electrophoresis*” (Eletroforese de Campo Pulsado)

PMNL – Leucócitos polimorfonucleares

PANEXINA-1 – Proteínas de membrana

RBD – Domínio de ligação ao receptor

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

SlpA – do inglês “*Surface layer protein A*” (Proteína de superfície A)

S100B – Fração beta da proteína S100 (Proteína de ligação ao cálcio S100)

tcdA – Gene que codifica a enterotoxina A produzida por *C. difficile*

TcdA – Proteína correspondente à enterotoxina A produzida por *C. difficile*

tcdB – Gene que codifica a enterotoxina B produzida por *C. difficile*

TcdB – Proteína correspondente à enterotoxina B produzida por *C. difficile*

tcdC – Gene que codifica o regulador negativo da expressão das enterotoxinas A e B produzidas por *C. difficile*

tcdE – Gene que codifica uma proteína responsável pela liberação extracelular das enterotoxinas A e B produzidas por *C. difficile*

tcdR – Gene que codifica o regulador positivo da expressão das enterotoxinas A e B produzidas por *C. difficile*

TGF- β – Fator de crescimento transformador- β

TNF- α – Fator de necrose tumoral- α

TLR – Receptor Toll-like

TRP – Canais iônicos de potencial receptor transitório

TRPV4 – Receptor de potencial transitório vanilóide 4

Sumário

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 <i>Clostridioides difficile</i> : Uma abordagem histórica.....	17
1.2 Características do <i>C. difficile</i> e seus fatores de virulência	18
1.3 Domínios funcionais (TcdA e TcdB) e mecanismo de ação das toxinas	23
1.3.1 Estrutura da TcdA e TcdB	23
1.3.2 Mecanismo de ação da TcdA e da TcdB e a inativação das Rho GTPases por glicosilação	24
1.3.3 Efeitos citopáticos e citotóxicos dependentes da glicosilação em células epiteliais.....	28
1.4 Patogênese da infecção causada por <i>C. difficile</i>	29
1.5 Estudos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> dos efeitos das TcdA e TcdB de <i>C. difficile</i>	31
1.6 Sistema nervoso entérico e as células glias entéricas (CGEs).....	35
1.6.1 Sistema nervoso entérico.....	35
1.6.2 Células glias entéricas (CGEs)	37
1.7 Receptor de Potencial Transitório Vanilóide 4 (TRPV4) e seu Papel nas Doenças Inflamatórias Intestinais	39
2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	45
3. OBJETIVOS	47
3.1 Objetivo geral	47
3.2 Objetivos específicos	47
4 MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1 Fármacos, reagentes, materiais e soluções utilizados no estudo	48
4.2 Experimentos <i>in vitro</i> (Cultura de CGEs)	48
4.3 Administração de toxinas e fármacos em CGEs	48
4.4 Parâmetros avaliados <i>in vitro</i>	49
4.4.1 Ensaio de viabilidade celular	49
4.4.2 Avaliação da expressão gênica do TRPV4 por qPCR.....	49
4.4.3 Avaliação da expressão protéica do TRPV4 e Caspase-3 clivada em CGEs por Western blotting.....	50
4.4.4 Imunofluorescência para TRPV4, NFκBp65 e TNF-α em CGEs	51
4.4.5 Ensaio de Apoptose	52
4.5 Experimento <i>in vivo</i>	53
4.5.1 Aspectos éticos em pesquisa animal.....	53
4.5.2 Animais.....	53

4.5.3 Preparação da bactéria.....	53
4.5.4 Modelo de Infecção por <i>C. difficile</i> (CDI)	54
4.5.5 Grupos experimentais para o modelo de infecção por <i>C. difficile</i> (CDI).....	54
4.6 Análise estatística	55
5 RESULTADOS	56
5.1 Efeito da TcdA e TcdB na expressão gênica e protéica do TRPV4 em CGEs.....	56
5.2 TcdA e TcdB aumentam a imunomarcação citoplasmática do TRPV4 em CGEs.....	57
5.3 Viabilidade das CGEs expostas ao antagonista do TRPV4.....	58
5.4 Efeito do antagonista do TRPV4 na translocação do NFκBp65 e no TNF-α em CGEs induzidas por TcdA e TcdB.....	59
5.5 Efeito do antagonista do TRPV4 na expressão da citocina IL-6 e IL-1β em CGEs induzidas por TcdA e TcdB.....	66
5.6 Efeito antiapoptótico do antagonista do TRPV4 em CGEs induzidas por TcdA e TcdB ..	67
5.7 Infecção por <i>C. difficile</i> aumenta expressão protéica do TRPV4 no ceco e cólon de camundongos com CDI	70
6 DISCUSSÃO	72
7 CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS	80
APÊNDICE	95
ARTIGOS SUBMETIDOS	96

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Clostridioides difficile*: Uma abordagem histórica

Sabe-se que o trato gastrointestinal apresenta uma microbiota extremamente complexa, constituída de pelo menos várias centenas de espécies bacterianas diferentes, sendo que essas desempenham um importante papel na saúde humana, produzindo nutrientes e atuando como uma barreira natural seletiva contra a colonização intestinal por potenciais micro-organismos patogênicos (GUARNER; MALAGELADA, 2003; LIU *et al.*, 2003; PENDERS *et al.*, 2005; SEHGAL; KHANNA, 2021). No entanto, se por algum motivo ocorre alguma alteração ou desequilíbrio desse microbioma intestinal, condição conhecida como “disbiose”, o indivíduo passa a ficar mais susceptível a infecções por patógenos entéricos (STECHEER; MAIER; HARDT, 2013). Dentre os patógenos entéricos, o *Clostridium difficile* (*C. difficile* – forma que será utilizada ao longo dessa tese), que foi recentemente renomeado como *Clostridioides difficile* (LAWSON *et al.*, 2016), é um bacilo Gram-positivo e anaeróbio esporulado, que vem se destacando como um importante enteropatógeno causador de doenças intestinais associadas principalmente ao uso de antibióticos, podendo levar desde uma leve diarreia a colite pseudomembranosa fulminante e que muitas das vezes o paciente pode vir a óbito (BARTLETT; GERDING, 2008; SANDERS *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2015).

O primeiro relato de colite pseudomembranosa (condição clínica caracterizada pela formação de pseudomembranas que são compostas por células necróticas, fibrina, muco e leucócitos) foi registrado numa paciente cirúrgica na Universidade Johns Hopkins em 1892 (MARTIN; MONAGHAN; WILCOX, 2016). A paciente era uma mulher de 22 anos que foi submetida a um procedimento cirúrgico pelo Dr. William Osler para ressecção de um tumor no piloro gástrico. No entanto, no início do pós-operatório, desenvolveu diarreia grave e morreu no 15º dia pós-operatório. A autópsia revelou uma pseudomembranosa "membrana diftérica" no intestino delgado (NAPOLITANO; EDMISTON, 2017). Porém, vale ressaltar que nesta mesma época, o agente causador dessa doença ainda não tinha sido até então elucidado (LYERLY *et al.*, 1988).

Apenas em 1935, Hall e O’Toole, pesquisando a microbiota intestinal de neonatos saudáveis, descreveram um micro-organismo até então desconhecido, que inicialmente recebeu a denominação de *Bacillus difficilis* e, posteriormente, de *C. difficile*, refletindo justamente a dificuldade para isolar e conservar este micro-organismo em cultura pura. Esses mesmos autores revelaram ainda que o *C. difficile* é toxigênico, já que observaram lesões,

parada respiratória e morte em animais de laboratório quando submetidos à injeção de sobrenadante de cultura ou filtrado do meio que continha esse micro-organismo (HALL; O'TOOLE, 1935; LYERLY *et al.*, 1988).

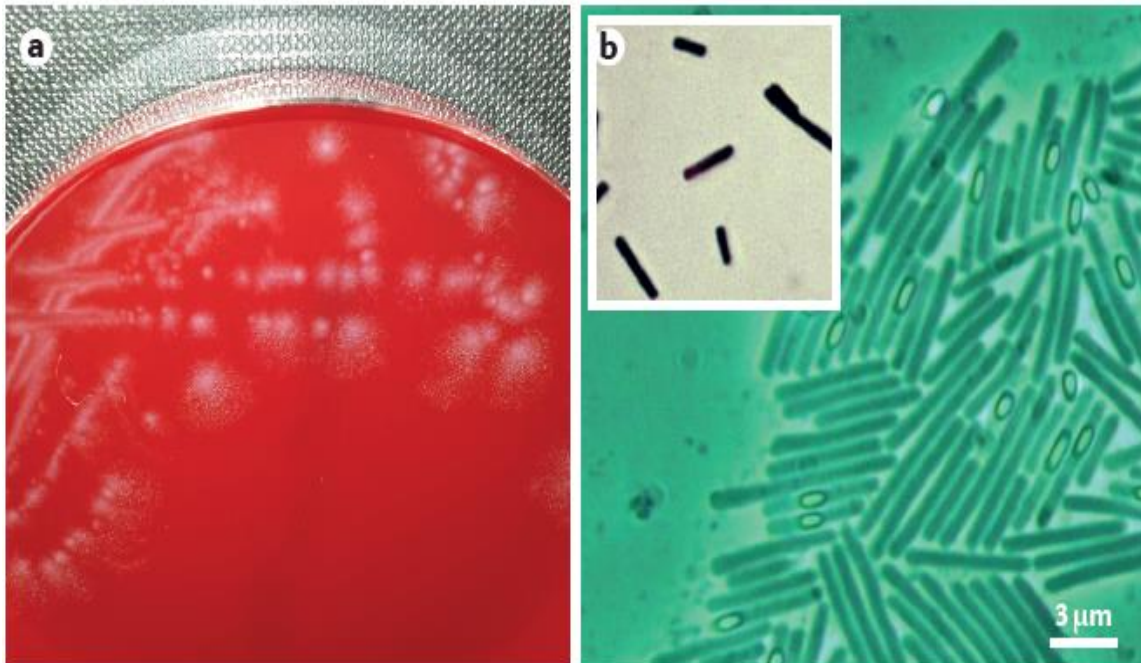
Nos 40 anos que se seguiram a descoberta do *C. difficile*, houve poucos relatos do isolamento do mesmo, haja vista que a presença dessa bactéria era uma condição rara de se observar durante a era pré-antibiótica. Entretanto, por volta de 1975 e início da década de 80, o *C. difficile* começou a ganhar proporções epidêmicas, sendo implicado como o agente responsável pelas complicações comuns ao uso de antibióticos (BARTLETT *et al.*, 1978; GEORGE *et al.*, 1978).

Em 1978, o *C. difficile* foi identificado como a principal causa de colite pseudomembranosa isolado de fezes de pacientes submetidos ao tratamento com o antibiótico clindamicina (BARTLETT *et al.*, 1978; GEORGE *et al.*, 1978). Essas observações foram seguidas por uma série de outros relatos de casos que mostraram uma forte correlação entre a colite pseudomembranosa, uso da antibioticoterapia, colonização por *C. difficile* e produção de toxinas (BARTLETT; TEDESCO, 1980; BURDON *et al.*, 1981; GEORGE *et al.*, 1982; ARONSSON; MÖLLBY; NORD, 1981; DON; DAVIS, 1981). Esses estudos mostram a grande relevância dessa bactéria, já que revelaram que o *C. difficile* é um patógeno emergente capaz de causar doença gastrointestinal grave em indivíduos submetidos à terapia antibiótica (VOTH; BALLARD, 2005).

1.2 Características do *C. difficile* e seus fatores de virulência

O *C. difficile* é um bacilo formador de esporos subterminais, esse por sua vez pertence ao filo Firmicutes e é encontrado ubiquamente tanto no ambiente quanto no trato gastrointestinal de seres humanos e animais (Figura 1) (RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009). Apesar do *C. difficile* ser responsável por diarreias infecciosas, incluindo a diarreia inflamatória, a colite associada a antibióticos e a colite pseudomembranosa, ele pode ser considerado parte integrante da microbiota intestinal normal de adultos saudáveis podendo variar entre 2,4-17,5% e entre 30-70% em bebês saudáveis com até 1 ano de vida (KACHRIMANIDOU; TSINTARAKIS, 2020; PICCIONI *et al.*, 2022).

Figura 1 – Microbiologia de *C. difficile* e suas características morfológicas.



Fonte: Adaptado de Smits *et al.* (2017). Imagem típica de *C. difficile*. **A)** Colônias birrefringentes de *C. difficile* em uma placa de ágar sangue. **B)** Imagem de microscopia de contraste de fase de uma cultura de *C. difficile* com presença de células vegetativas (hastes alongadas, campo verde), esporos subterminais de fase escura (pontos escuros) e esporos elipsoides de fase brilhante.

A identificação do *C. difficile* antes do início da década de 80 era difícil, consequentemente, as doenças que estavam relacionadas ao mesmo não eram diagnosticadas adequadamente. Em 1979, George e colaboradores desenvolveram um meio de cultura seletivo e diferencial chamado ágar CCFA (Agar Cicloserina, Cefoxitina e Frutose), meio cuja finalidade é facilitar o isolamento de *C. difficile* a partir de espécimes fecais. Os antibióticos cicloserina (500 µg/mL) e cefoxitina (16 µg/mL) presentes neste meio, inibem o crescimento da maioria das bactérias, mas não o de *C. difficile*. Nesse meio, em temperatura de 37°C por 48 horas de incubação, *C. difficile* forma colônias amareladas com diâmetro de aproximadamente 4 mm, com estrutura interna cristalina e birrefringente (GEORGE; SUTTER; CITRON, 1979). As colônias de *C. difficile* que crescem em meio CCFA apresentam características morfolologicamente diferentes e trazem propriedades fluorescentes suficientes para uma identificação presuntiva, porém, pelo crescimento não específico dessa bactéria neste meio, é necessária a identificação do isolado em cultura pura (LYERLY *et al.*, 1988).

Atualmente no mercado existem muitos métodos disponíveis para detectar a presença das toxinas A e B produzidas por *C. difficile*, por exemplo, os imunoenensaio enzimáticos, os

ensaio de neutralização de citotoxicidade celular, as cultura toxigênica e a reação em cadeia da polimerase (PCR) (PETERSON *et al.*, 2007; STAMPER *et al.*, 2009; SWINDELLS *et al.*, 2010; NORÉN *et al.*, 2011). No entanto, apesar das culturas de fezes de *C. difficile* serem mais sensíveis do que os imunoensaio enzimáticos (EIAs) para detectar o glutamato desidrogenase (GDH) de *C. difficile* ou toxinas em amostras fecais, as culturas de fezes apresentam certas limitações no que diz respeito à necessidade de incubadoras anaeróbicas, um fluxo de trabalho extenso e também a detecção de culturas toxigênicas e não toxigênicas (LEE *et al.*, 2021). Isso faz com que o diagnóstico da infecção por *C. difficile* (CDI) em princípio dependa dos testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAATs) para detectar genes de toxinas (*tcdA* e/ou *tcdB*) ou imunoensaio enzimáticos (EIAs) para detectar o GDH e as toxina A e B (LEE *et al.*, 2021). Nesse sentido, as culturas de fezes atualmente vêm sendo preconizado para estudos epidemiológicos ou então para detectar patógenos de diarreia associada a antibióticos que não sejam o *C. difficile* (OFOSU, 2016).

No que diz respeito aos fatores de virulência do *C. difficile*, essa bactéria produz várias proteínas que estão diretamente associados ao surgimento da infecção por *C. difficile* (CDI), como os flagelos - a flagelina (*fliC*) e a proteína cap flagelar (*fliD*) –; as adesinas – Cwp66, Cwp84 e a proteína de camada superficial A (SlpA) –; as enzimas hidrolíticas, os esporos e as toxinas (MATSUSHITA; OKABE, 2001; RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009; BABAN *et al.*, 2013; PAREDES-SABJA; SHEN; SORG, 2014). Vale destacar que para muitos patógenos entéricos, o primeiro passo fundamental para a colonização e, conseqüentemente, o estabelecimento da infecção, é a adesão às células da mucosa do hospedeiro. Nesse sentido, várias proteínas de superfície celular são responsáveis por coordenarem a adesão da célula bacteriana à parede do intestino e que já foram identificadas em cepas de *C. difficile* (AWAD *et al.*, 2014; CHILTON *et al.*, 2014).

Como mencionado anteriormente, há vários fatores de virulência que contribuem diretamente para a colonização e permanência de *C. difficile* no trato gastrintestinal, porém, dentre aqueles já mencionados, os principais e mais estudados são as toxinas A e B. Várias cepas patogênicas de *C. difficile* além de produzirem a toxina A (TcdA – proteína de 308 kDa) e a toxina B (TcdB – proteína de 270 kDa), que são responsáveis por causar diarreia e inflamação na mucosa intestinal, algumas cepas hipervirulentas como a NAP1 (pulso tipo 1 norte-americano), BI (análise de endonuclease de restrição), toxino tipo III e ribotipo por PCR 027, denominada NAP1/BI/027, produzem uma terceira toxina chamada transferase de *C. difficile* (CDT ou toxina binária) (DI BELLA *et al.*, 2016; QIU *et al.*, 2016; RUPNIK; JANEZIC, 2016).

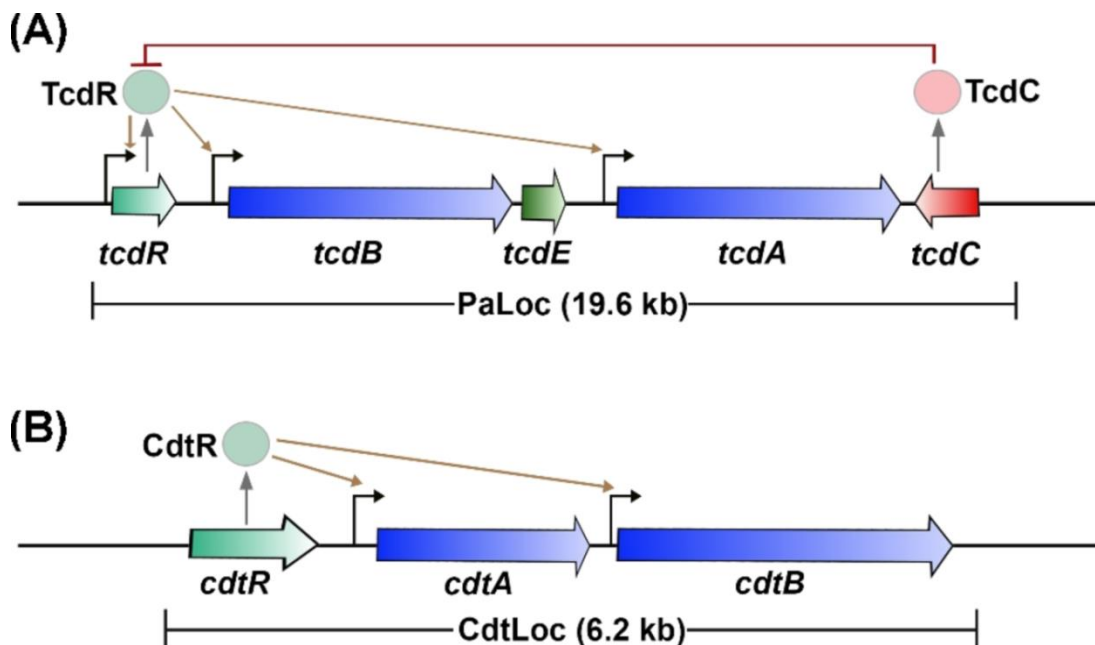
A TcdA e TcdB pertencem à família de grande toxinas clostridiais (LCTs), que são um grupo de proteínas homólogas de alto peso molecular na qual incluem ainda outras toxinas, como, a toxina letal e hemorrágica de *C. sordellii* (TcsL e TcsH, respectivamente), α -toxina de *C. novyi* (Tcn α) e uma citotoxina de *C. perfringens* (TpeL). As LCTs são glicosiltransferases que têm por característica glicosilar proteínas da família Rho GTPases promovendo alterações no citoesqueleto e, conseqüentemente, interrupção da função celular hospedeira (CHANDRASEKARAN; LACY, 2017).

As cepas toxigênicas de *C. difficile*, que codificam os genes da TcdA (*tcdA*) e da TcdB (*tcdB*) estão localizados dentro de uma região cromossômica de 19,6 kb denominada locus de patogenicidade (PaLoc) (Figura 2A) (HAMMOND; JOHNSON, 1995; BRAUN *et al.*, 1996). No entanto, em cepas não toxigênicas o PaLoc é substituído por uma sequência não codificadora de 75-115 nucleotídeos ou uma sequência de 7,2 kb de função desconhecida (BRAUN *et al.*, 1996; DINGLE *et al.*, 2011; MONOT *et al.*, 2015). Por outro lado, cepas não toxigênicas de *C. difficile* podem adquirir a região PaLoc de cepas toxigênicas através de um fenômeno conhecido como transferência horizontal de genes, que irá resultar na conversão de cepas não toxigênicas em cepas produtoras de toxinas (BROUWER *et al.*, 2013). Alterações tais como, polimorfismos de nucleotídeos únicos, inserções ou deleções na região de codificação da toxina dentro do PaLoc, têm sido usadas para classificar ocorrência natural de isolados clínicos de *C. difficile* (RUPNIK *et al.*, 1998). Em 2016, Rupnik e Janezic fazendo uma comparação com uma cepa de referência a VPI10463, definiram 34 toxinotipos de *C. difficile*, mostrando com isso a grande heterogeneidade da região de codificação de toxina entre os isolados clínicos.

Além das toxinas descritas acima, ainda há dentro do locus de patogenicidade (PaLoc) genes para proteínas codificadas por cepas patogênicas (TcdR, TcdC e TcdE) que são envolvidas na regulação da produção e secreção de toxinas (Figura 2A) (BOUILLAUT *et al.*, 2015; MONOT *et al.*, 2015; SMITS *et al.*, 2016). A proteína TcdR é um membro da família da função extracitoplasmática de fatores sigma alternativos e que desempenha um papel crítico na ativação da expressão dos genes *tcdA* e *tcdB* (MONCRIEF; BARROSO; WILKINS, 1997; MANI; DUPUY, 2001). Além disso, o TcdR regula positivamente sua própria expressão (MANI *et al.*, 2002). Já a TcdC funciona como um fator anti-sigma que regula negativamente a expressão de toxinas (MATAMOUROS; ENGLAND; DUPUY, 2007; CARTER *et al.*, 2011). Por fim, a TcdE é uma proteína que compartilha homologia com as proteínas bacterinas do tipo holina e que pode facilitar a liberação da TcdA e TcdB ao meio extracelular (TAN; WEE; SONG, 2001).

A toxina binária (CDT), produzido por algumas cepas de *C. difficile*, é codificada por dois genes, *cdtA* e *cdtB*, que estão localizados em uma região cromossômica de 6,2 kb (distinta do PaLoc) denominada Locus CdtLoc (Figura 2B) (CARTER *et al.*, 2007). As cepas toxigênicas que são negativas para CDT normalmente contêm uma exclusão de 2 kb no CdtLoc (STARE; DELME; RUPNIK, 2007). Além disso, o CdtLoc também contém um terceiro gene, *cdtR*, que codifica um regulador de resposta da família LytTR (CARTER *et al.*, 2007). O CdtR regula positivamente a produção de CDT e, nas cepas epidêmicas do ribotipo 027, também aumenta a produção de TcdA e TcdB (CARTER *et al.*, 2007; LYON *et al.*, 2016).

Figura 2 – Lócus de patogenicidade (PaLoc) das toxinas produzidas por *C. difficile*.



Fonte: Chandrasekaran e Lacy (2017). **A)** Lócus de patogenicidade (PaLoc). Os genes que codificam as toxinas, *tcdA* e *tcdB*, estão indicados por setas azuis. Os genes reguladores são mostrados em verde claro (*tcdR* – positivo) ou vermelho (*tcdC* – negativo). Por sua vez, o gene *tcdE* que codifica a holina é mostrado em verde escuro. A direção das setas reflete sentido da transcrição. A proteína TcdR regula positivamente a sua própria expressão, bem como a expressão dos genes *tcdA* e *tcdB* (indicada por setas castanhas). A proteína TcdC é um fator anti-sigma que regula negativamente a expressão das toxinas interferindo na função da TcdR. Já a proteína TcdE está envolvida na secreção de toxinas. **B)** Representação esquemática do locus da toxina binária (CdtLoc). Os genes que codificam a CDT, *cdtA* e *cdtB*, são mostrados em azul. O gene regulador *cdtR* é mostrado em verde-claro. O CdtR regula positivamente a transcrição de *cdtA* e *cdtB*.

As células de *C. difficile* cultivadas em meios ricos expressam tipicamente a TcdA e a TcdB durante a fase estacionária (DARKOH *et al.*, 2015). Vários estímulos ambientais têm sido relatados com a capacidade de influenciar na expressão das toxinas, incluindo a temperatura (KARLSSON *et al.*, 2003), concentrações subinibitórios de certos antibióticos (CHILTON *et al.*, 2012; ALDAPE *et al.*, 2013), sinalização de quórum (DARKOH *et al.*,

2015), a presença de uma fonte de carbono rapidamente metabolizável (DUPUY; SONENSHEIN, 1998) e certos aminoácidos (KARASAWA *et al.*, 1997). Com relação à fonte de carbono rapidamente metabolizável, tais como, a glicose presente no ambiente local da bactéria, esta inibe a produção de toxinas através da proteína de controle de catabólitos de carbono A (CcpA) (ANTUNES *et al.*, 2012). Por sua vez, os aminoácidos de cadeia ramificada inibem a produção de toxina através do regulador transcricional global CodY (DINEEN *et al.*, 2007).

1.3 Domínios funcionais (TcdA e TcdB) e mecanismo de ação das toxinas

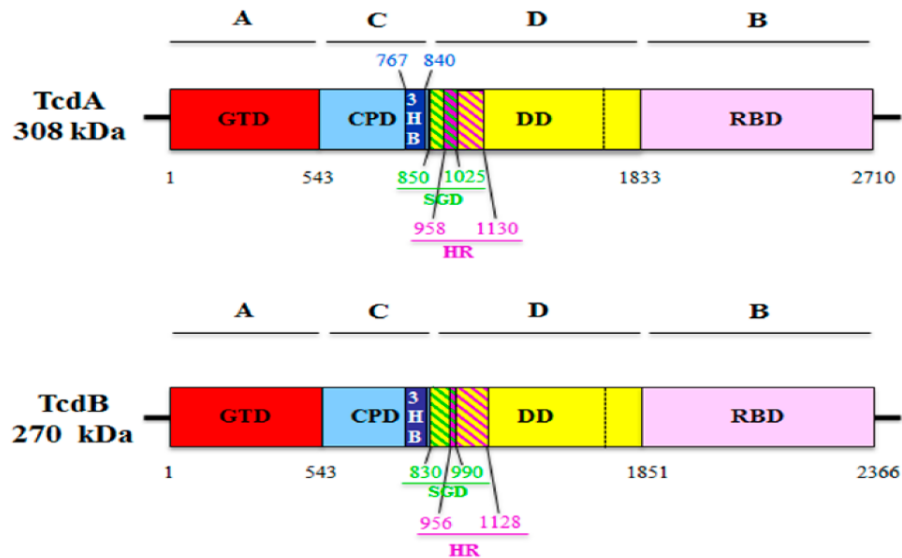
1.3.1 Estrutura da TcdA e TcdB

A TcdA e a TcdB compartilham uma estrutura de domínio comum com 49% de sequência identidade e aproximadamente 68% de similaridade de sequência, sendo que a maior diversidade em sequência é confinada aos seus domínios de ligação C-terminal. A homologia entre as duas toxinas e o modo de entrada similar na célula hospedeira sugerem que essas adotam estruturas 3D semelhantes. Ambas as toxinas possuem um domínio "cabeça" globular e bilobada (correspondente ao domínio de entrega), um domínio de cauda longa (correspondente ao domínio de ligação ao receptor) e um curto domínio da cauda interna (que contém o domínio da glicosiltransferase) (PRUITT *et al.*, 2010; DAVIES *et al.*, 2011; PAPARELLA *et al.*, 2021).

Em 2008, Jank e Aktories propuseram um modelo chamado ABCD para explicar que ambas as toxinas têm atividade enzimáticas similares e que compartilham uma estrutura de domínio multi-modular (Figura 3) (DI BELLA *et al.*, 2016). Esse modelo compreende os seguintes domínios com suas respectivas funções. O domínio A está localizado na extremidade N-terminal e contém o domínio da glicosiltransferase (GTD), sendo esse responsável por glicosilar as pequenas GTPases, as quais estão envolvidas na regulação do citoesqueleto (DI BELLA *et al.*, 2016; DAVIES *et al.* 2011); o domínio B está localizado na extremidade C-terminal e interage com estruturas de carboidratos como o Gal- α (1,3)-Gal β -(1,4)-GlcNAc sobre as células epiteliais em murinos, formando o domínio de ligação ao receptor (RBD), este forma combinações repetitivas de estruturas oligopetídicas (CROPS) e o mesmo quando se liga ao íon cálcio aumenta a potência da toxina (JANK; GIESEMANN; AKTORIES, 2007; DI BELLA *et al.*, 2016); o domínio C corresponde ao domínio cisteína protease (CPD) que faz parte da região hidrofóbica e desempenha um papel na clivagem proteolítica da toxina, pois TcdA e TcdB sofrem um processo auto-catalítico de clivagem, na

presença de InsP6 (EGERER *et al.*, 2007), e o domínio D (DD), região hidrofóbica, está envolvido na formação de poros antes da translocação do domínio A para o citosol (GENISYUERER *et al.*, 2011).

Figura 3 – Organização dos quatros domínios funcionais das toxinas de *C. difficile*.



Fonte: Adaptado de Di Bella *et al.*, (2016). As duas toxinas são compostas pelos seguintes domínios: o domínio A, correspondente ao domínio N-terminal da glicosiltransferase (GTD) (vermelho); o domínio C, correspondente ao domínio da cisteína protease (CPD) (ciano) e o domínio do feixe de três hélices (3HB) (azul) identificado tanto na toxina A (TcdA) quanto na toxina B (TcdB) do *C. difficile*; o domínio D, que corresponde ao domínio hidrofóbico de entrega (DD) (amarelo), qual contém o pequeno domínio globular (SGD) em TcdA (linhas diagonais verdes e amarelas) que corresponde à região de formação de poros mínima (MPFR) em TcdB (verde e linhas diagonais amarelas), e sobrepondo-se apenas parcialmente (linhas diagonais roxas e verdes) para a região hidrofóbica (HR) de TcdA e TcdB (linhas diagonais roxas e amarelas); o domínio B, correspondente ao domínio de ligação ao receptor (RBD) (rosa).

1.3.2 Mecanismo de ação da TcdA e da TcdB e a inativação das Rho GTPases por glicosilação

TcdA e TcdB de *C. difficile* utilizam um mecanismo de ação já bem definido na literatura para modular a fisiologia celular e, conseqüentemente, alterar o ambiente do hospedeiro. Ambas as toxinas, juntamente com os outros membros da grande família de toxinas clostridiais, visam a superfamília Ras de pequenas GTPases (Rho, Rac e Cdc42) que acabam sendo modificadas por glicosilação. Essa modificação irreversível inativa essas pequenas proteínas reguladoras, levando como consequência uma interrupção das vias de sinalização vitais para a célula. No entanto, além da modificação enzimática de alvos específicos das toxinas, existem várias etapas importantes para a entrada da toxina na célula que também são importantes (VOTH; BALLARD, 2005; LOO *et al.*, 2011; PAPARELLA *et al.*, 2021).

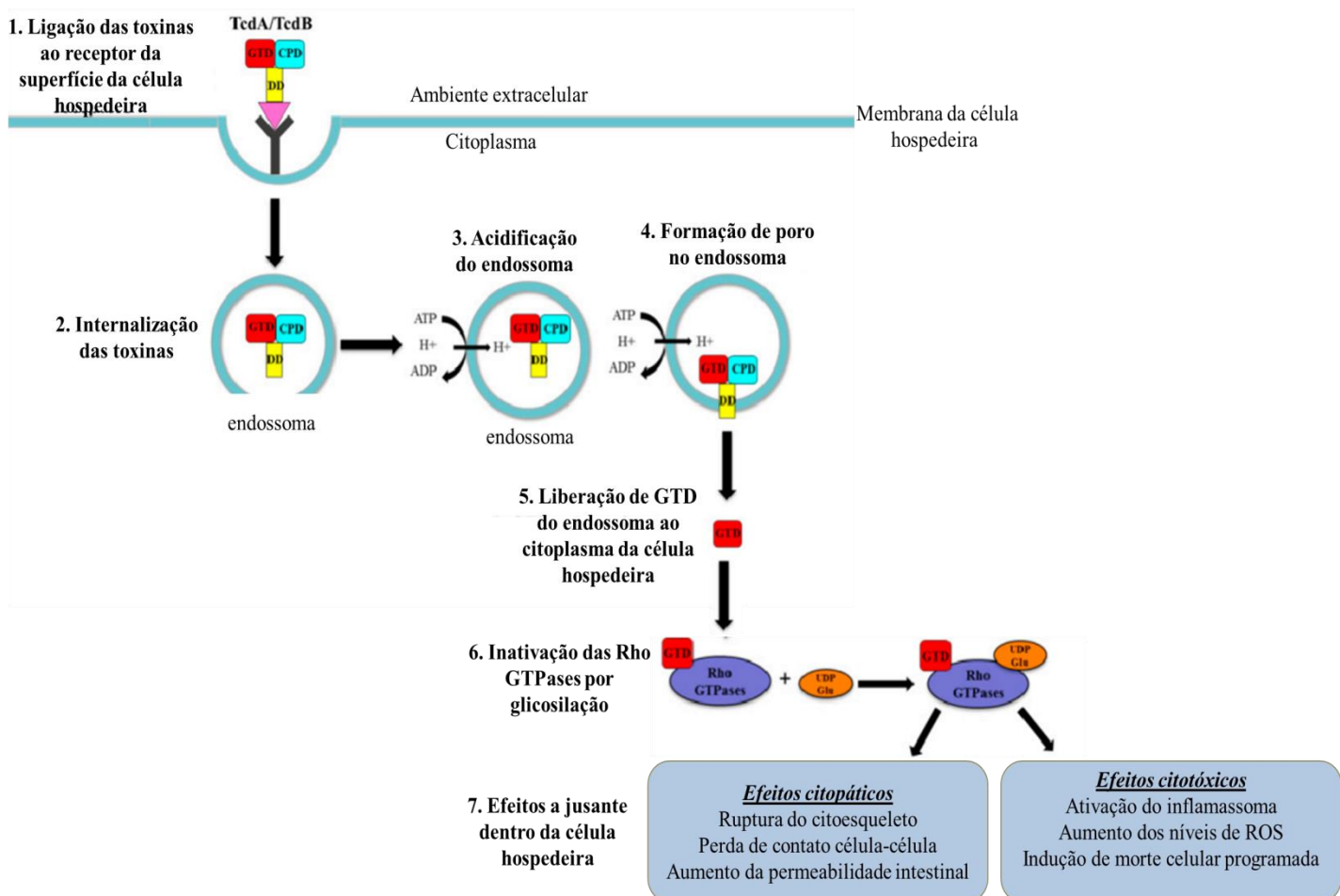
Uma vez a bactéria presente no trato gastrointestinal do hospedeiro, as toxinas são produzidas e liberadas no lúmen intestinal. Segundo Di Bella e colaboradores (2016), a libertação de toxinas no citosol da célula hospedeira pode ser dividida em sete etapas principais, sendo elas: (1) ligação da toxina ao receptor da superfície da célula hospedeira; (2) internalização de toxinas através de uma endocitose a qual é mediada pelo receptor; (3) acidificação do endossoma; (4) formação de poros; (5) liberação de GTD do endossoma para o citoplasma da célula hospedeira; (6) Inativação de Rho GTPases por glicosilação e (7) efeitos a jusante dentro da célula hospedeira, *ou seja*, efeitos citopáticos e citotóxicos induzidos pelas toxinas (Figura 4).

Na primeira e segunda etapa do mecanismo de ação, TcdA e TcdB se ligam ao(s) receptor (es) da superfície celular através do domínio RBD e entram nas células hospedeiras através do processo de endocitose para alcançar os compartimentos endossômicos (FLORIN; THELESTAM, 1983). Ambas as toxinas do *C. difficile* apresentam receptores de ligação diferentes, sendo que, a Sucrase-isomaltase e a glicoproteína 96 (gp96) foram identificadas como um receptor de membrana plasmática para a TcdA e são expressas em membranas apicais de colonócitos humanos, bem como no citoplasma. Esses receptores aumentam a entrada celular de TcdA, participa de eventos de sinalização celular na cascata inflamatória e facilita a citotoxicidade (NG *et al.*, 2010). Já com relação ao receptor para a TcdB, foram identificados outros, como, o proteoglicano de sulfato de condroitina 4 (CSPG4), expresso nos miofibroblastos subepiteliais intestinais, e a molécula de adesão celular a nectina 3 (NECTIN3), no qual este já é expresso na superfície do epitélio do cólon humano, sendo esses necessários para a citotoxicidade mediada por TcdB (YUAN *et al.*, 2015; LAFRANCE *et al.*, 2015). Porém, recentemente foi identificado outro receptor para a TcdB, a proteína frizzled 1, 2 e 7 que também é expresso na superfície do epitélio do cólon humano e que regula a auto-renovação e proliferação de células epiteliais do cólon por meio da via de sinalização Wnt (TAO *et al.*, 2016).

Na terceira etapa após a ligação aos receptores, o complexo receptor-toxina entra na célula por endocitose e esse processo requer um endossoma acidificado para que possa ocorrer a translocação (FLORIN; THELESTAM, 1983). Porém, para que ocorra a internalização das toxinas na célula é fundamental a entrada do GTD e/ou CPD que irá levar a interrupção da função da célula hospedeira. A acidificação do endossoma é essencial para que possa haver alteração na estrutura das toxinas por meio de uma mudança conformacional induzida pelo pH, no qual este processo deve ocorrer muito provavelmente entre a região CROP e o CPD. Já na quarta e quinta etapa, com a acidificação no interior do endossoma

ocorre a exposição de regiões hidrofóbicas com consequente formação de poros na membrana pelo DD que resulta na translocação de GTD e/ou CPD para o citoplasma da célula do hospedeiro (GENISYUERREK *et al.*, 2011). Na sexta e última etapa do mecanismo de ação das toxinas, o inositol-hexaquisfosfato citosólico (InsP6) ativa a protease para clivagem auto-proteolítica e isso faz com que o GTD seja liberado para assim inativar as Rho GTPases. Essa inativação ocasiona a despolimerização da actina, o que resulta em perda da integridade estrutural da célula e, eventualmente, em morte celular por meio de vias dependentes de caspase-3 e caspase-9 (HIPPESTIEL *et al.*, 2002; BRITO *et al.*, 2002a; AKTORIES; SCHWAN; JANK, 2017). Conforme descrito acima e na figura 4, ambas as toxinas exibam o mesmo mecanismo de toxicidade celular, porém, foi demonstrado que a TcdB é mais potente que TcdA em sua capacidade de induzir arredondamento celular e morte celular, ou seja, a TcdA é mais enterotóxica em murinos, enquanto a TcdB é mais citotóxica (ZHANG *et al.*, 2018).

Figura 4 – Mecanismo de ação das toxinas de *C. difficile*.



Fonte: Adaptado de Di Bella *et al.*, (2016). A liberação das toxinas de *C. difficile* (TcdA ou TcdB) no citoplasma da célula hospedeira pode ser dividida em sete etapas principais: (1) ligação da toxina ao receptor da superfície da célula hospedeira; (2) internalização de toxinas por meio de endocitose mediada por receptor; (3) acidificação do endossomo; (4) formação de poros na membrana do endossomo; (5) liberação de GTD do endossomo para o citoplasma da célula hospedeira; (6) Inativação de Rho GTPases por glicosilação; e (7) efeitos citopáticos e citotóxicos induzidos por toxinas. GTD: domínio da glicosiltransferase N-terminal (vermelho); CPD: domínio da cisteína protease (ciano); DD; Domínio de translocação (amarelo).

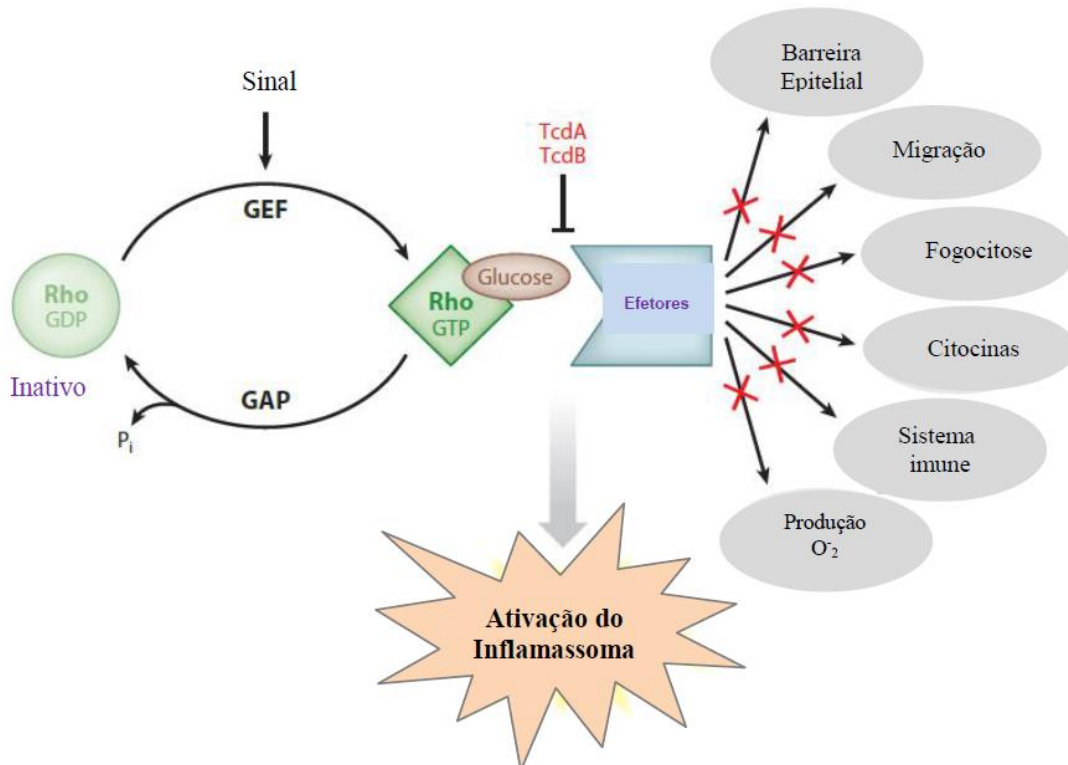
Conforme já descrito, no final do processo autocatalítico, a TcdA e a TcdB são liberadas no citosol da célula hospedeira e dentro da célula as toxinas do *C. difficile* utilizam a glicose-uridina difosfato (UDP-glicose) como co-substrato e a transfere para o resíduo de aminoácido treonina (Thr35/37) em quase todas as subfamílias das Rho GTPases, inativando-as (HIPPENSTIEL *et al.*, 2002; DI BELLA *et al.*, 2016).

As proteínas Rho são pequenas proteínas ligantes de GTP de 21 a 25 kDa que pertencem à superfamília Ras (JAFFE; HALL, 2005). Estas proteínas localizam-se no citosol e estão envolvidas em numerosos processos de sinalização, incluindo a regulação do citoesqueleto de actina, apoptose, transcrição gênica, progressão do ciclo celular e, dentre outros (ETIENNE-MANNEVILLE; HALL, 2002). Além disso, no que diz respeito às interações patógeno-hospedeiro, as Rho GTPases são essenciais para funções de barreira epitelial, contato célula-célula, migração de células imunes, fagocitose e produção de citocinas (JANK; GIESEMANN; AKTORIES, 2007). Vale ressaltar que a ativação e a transdução de sinal das proteínas Rho são reguladas por um ciclo GTPase clássico (Figura 5), no qual este é controlado principalmente por três classes de proteínas reguladoras: (1) inibidores de dissociação de nucleotídeos de guanina (GDIs), que extraem a Rho GTPase inativa das membranas; (2) fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEFs), que catalisam a troca de nucleotídeos e medeiam a ativação; e (3) proteínas ativadoras de GTPase (GAPs), que estimulam a hidrólise de GTP para o GDP. Uma vez ativada as proteínas Rho, estas interagem com numerosos efetores nas células hospedeiras, como quinases e fosfolipases, que são responsáveis pela regulação de várias vias de transdução de sinal (JANK; BELYI; AKTORIES, 2015).

Dentre as proteínas Rho, aquelas glicosiladas pelas toxinas A e B de *C. difficile* são a RhoA, RhoB, RhoC, RhoG, Rac1, Rac2, Rac3, Cdc42 e TC10 (CHEN *et al.*, 2015). A sinalização celular dependente de Rho é bloqueada quando ocorre a glicosilação de proteínas Rho, inibindo sua interação com os efetores e, como resultado, levando o bloqueio de todas as vias de sinalização dependentes de Rho (SEHR *et al.*, 1998). Além disso, quando as proteínas Rho são glicosiladas, estas ligam-se irreversivelmente às membranas celulares e impedem a

translocação de Rho não modificado para as membranas para sinalização (GENTH; AKTORIES; JUST, 1999). Em conjunto, esses processos inibem a interação com os efetores, causando os chamados efeitos citopáticos e citotóxicos como pode ser observado na Figura 5. Notavelmente, diferenças na especificidade do substrato da toxina levam a diferentes efeitos citopáticos e citotóxicos (CHAVES-OLARTE *et al.*, 2003).

Figura 5 – Ciclo GTPase e inibição pelas TcdA e TcdB de *C. difficile*.



Fonte: Adaptado de Aktories; Schwan; Jank (2017). As Rho GTPases são inativas no estado ligado ao GDP e ativas quando ligado ao GTP. Os fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEFs) ativam as proteínas Rho pela troca de GDP/GTP. As proteínas ativadoras das GTPase (GAPs) facilitam a hidrólise do GTP e inibem o estado ativo das proteínas Rho. Proteínas Rho ativas interagem com múltiplos efetores para controlar funções celulares fundamentais. A Glicosilação de RhoA em Thr37 (Rac e Cdc42 em Thr35) bloqueia a interação com efetores; várias vias de sinalização e funções celulares são assim afetadas, no qual são cruciais para a interação patógeno-hospedeiro (por exemplo, funções de barreira epitelial, migração, fagocitose, produção de citocinas, sinalização de células imunes e produção de O_2^-). Por outro lado, a inativação da RhoA pela glicosilação ativa o inflamassoma.

1.3.3 Efeitos citopáticos e citotóxicos dependentes da glicosilação em células epiteliais

As Rho GTPases são os reguladores críticos na montagem e na organização do citoesqueleto de actina. Entre elas, a RhoA é responsável pela montagem de filamentos de actina e miosina contráteis (fibras de estresse), enquanto Rac1 e Cdc42 estão envolvidos na formação de protuberâncias de superfície laminadas e filópodes ricas em actina, respectivamente (KOZMA *et al.*, 1995; NOBES). Além disso, as Rho GTPases desempenham

papeis importantes para o estabelecimento da morfologia e polaridade das células epiteliais (ETIENNE-MANNEVILLE; HALL, 2002). Consequentemente, a inativação de GTPases causada por TcdA e/ou TcdB resulta principalmente em efeitos citopáticos que são caracterizados como perda da estrutura do citoesqueleto, desmontagem de aderências focais e ruptura de junções “tight” e aumento na permeabilidade da barreira celular (MOORE *et al.*, 1990; CHEN *et al.*, 2015). Os efeitos citopáticos causados pelas toxinas desempenham um papel crucial na fisiopatologia clínica da infecção por *C. difficile*; a ruptura induzida pelas toxinas nas junções “tight” pode resultar no comprometimento da barreira epitelial, aumento da permeabilidade intestinal e inflamação. Esses efeitos induzidos por TcdA e TcdB é via Rac1 (HALABI-CABEZON *et al.*, 2008).

Além do efeito citopático, a inativação de Rho GTPases por TcdA e TcdB pode promover a morte de células epiteliais (referida como efeito citotóxico). Vários estudos mostraram em modelos de cultura de tecidos que a morte celular dependente de glicosilação induzida por TcdA e TcdB é evidente após 18-48 h de intoxicação e isso ocorre por um mecanismo apoptótico, com células intoxicadas exibindo características marcantes, como, encolhimento celular, externalização de fosfatidilserina, ativação de caspases e fragmentação de DNA (BRITO *et al.*, 2002; BRITO *et al.*, 2005; QA'DAN *et al.*, 2002; GERHARD *et al.*, 2008). A TcdA e TcdB além de induzir apoptose também são capazes de induzir necrose, esta definida pela depleção de ATP, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), perda de integridade da membrana e ativação da calpaína/catepsina (VOTH; BALLARD, 2005). Os efeitos citotóxicos induzidos pelas toxinas também estão associados à ativação do inflamassoma pela glicosilação da RhoA, que é provavelmente a causa da inflamação e da colite induzida por *C. difficile* (NG *et al.*, 2010).

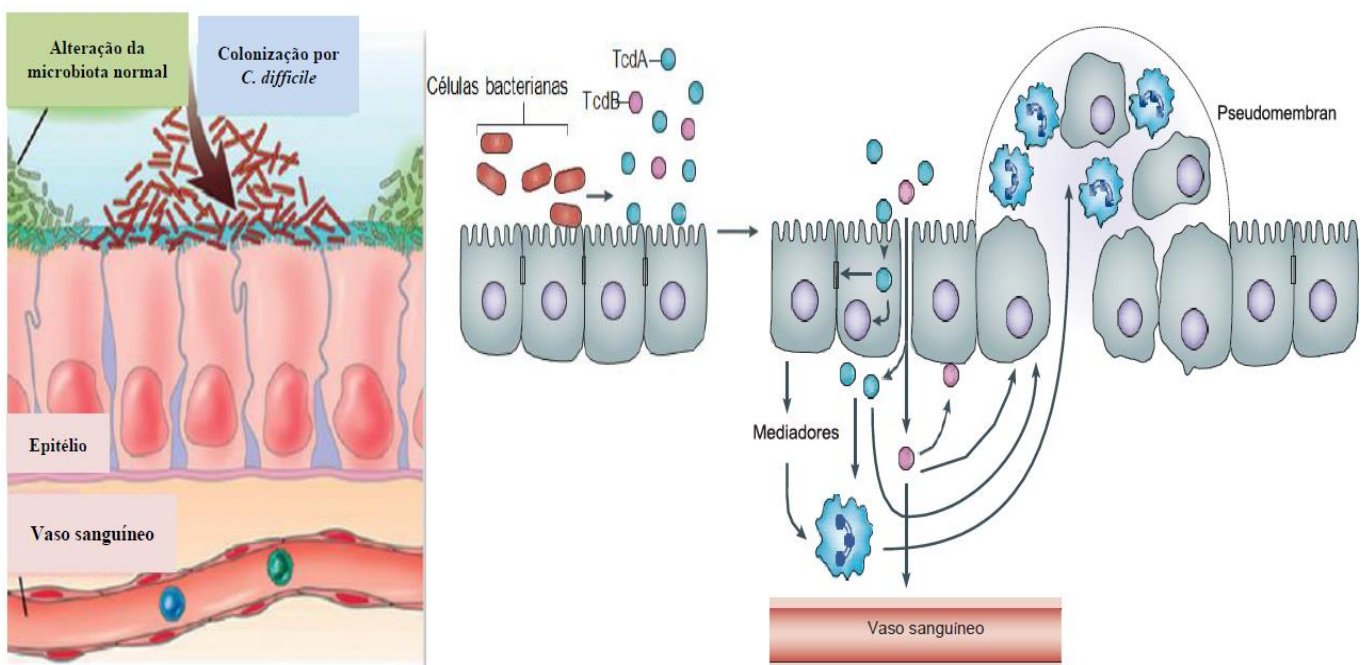
1.4 Patogênese da infecção causada por *C. difficile*

A patogênese da infecção por *C. difficile* (CDI) inicia com a ingestão das formas vegetativas ou esporuladas. Porém, a chave para o sucesso da CDI é sua forma de esporo dormente, que pode sobreviver por longos períodos mesmo em condições adversas (por exemplo, paredes de hospitais, portas, instrumentos cirúrgicos, telefones celulares, etc.) (SCHENCK; BECK; MACDONALD, 2015). É a forma de esporo que é transmitida no ambiente hospitalar, pois as células vegetativas ao chegarem ao estômago são mortas devido à acidez, mas os esporos devido à alta capacidade de sobrevivência, esse sobrevive e germina no intestino delgado por meio da ação dos ácidos biliares. A forma vegetativa

metabolicamente ativa multiplica e pode colonizar o cólon humano para causar doença através da produção de toxinas e enzimas hidrolíticas (MCCOLLUM; RODRIGUEZ, 2012).

Vários fatores são necessários para que o *C. difficile* realmente cause doença (Figura 6), porém, o primeiro e mais importante é a disbiose intestinal, ou seja, a alteração de toda a microbiota intestinal causada geralmente pelo uso de antibióticos, sendo este considerado o principal fator de risco para infecção por *C. difficile* (SMITS *et al.*, 2016; McCOLLUM; RODRIGUEZ, 2012). Com o desequilíbrio da homeostase intestinal, inicia a fase de colonização por *C. difficile*, envolvendo a ligação da bactéria ao epitélio intestinal do hospedeiro e a multiplicação tanto na superfície como no lúmen. Após a colonização, as células vegetativas começam a secretar TcdA e TcdB, que causam vários efeitos, como, por exemplo, rompimento das junções oclusivas, morte das células epiteliais e inflamação. Além disso, a lesão no epitélio colônico faz com que as toxinas estimulem este a libertar citocinas pró-inflamatórias e quimioatratantes de neutrófilos, o que levam a uma resposta inflamatória aguda com recrutamento de neutrófilos, característica da fisiopatologia clínica da CDI (VOTH; BALLARD, 2005; KELLY; KYNE, 2011; SMITS *et al.*, 2016).

Figura 6 – Patogênese da infecção causada por *C. difficile*.

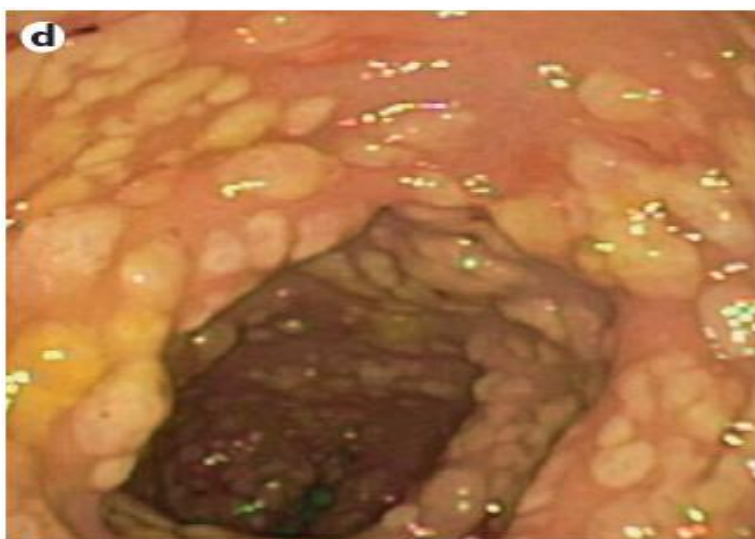


Fonte: Adaptado a partir de Mccollum; Rodriguez (2012) e Rupnik; Wilcox; Gerding (2009). O *C. difficile* coloniza o intestino (cólon) e após a alteração da microbiota intestinal normal, o *C. difficile* começa a secretar as toxinas. A TcdA e TcdB ligam-se ao lado apical da célula e, após a internalização, causam alterações no citoesqueleto de actina que resulta na ruptura das junções oclusivas e no afrouxamento da barreira epitelial, levando à morte celular e produção de mediadores inflamatórios que atraem neutrófilos. O rompimento das junções oclusivas permite que tanto a TcdA quanto a TcdB atravessem o epitélio e, conseqüentemente, induz liberação de vários mediadores imunomoduladores tanto de células epiteliais, como de fagócitos e mastócitos,

resultando em inflamação e acúmulo de neutrófilos. Esses achados contribuem para a formação das pseudomembranas.

Sabe-se que a ruptura da barreira epitelial, com intensa resposta inflamatória e infiltrado neutrofílico no lúmen e danos nos tecidos associados podem contribuir para a formação das pseudomembranas (SMITS *et al.*, 2016). Em 2002b, Brito e colaboradores demonstraram que a TcdA atua em neutrófilos humanos induzindo mudança tanto na forma quanto na função, bem como também no rearranjo do citoesqueleto de actina e na aderência a substrato de matriz extracelular, com aumento de expressão de Mac-1 de leucócitos polimorfonucleares (PMNL), eventos esses que poderiam estar relacionados com a formação de pseudomembranas, como é observada em casos graves de colite pseudomembranosa (Figura 7).

Figura 7 – Endoscopia da colite pseudomembranosa causada por *C. difficile*.



Fonte: Adaptado de Smits *et al.* (2016). Imagem mostrando as pseudomembranas resultantes da infecção por *C. difficile* formadas por placas amareladas e confluentes.

1.5 Estudos *in vivo* e *in vitro* dos efeitos das TcdA e TcdB de *C. difficile*

Várias pesquisas têm evidenciado os efeitos das toxinas A e B do *C. difficile* tanto em modelo animal quanto em cultura de células. Em 1997, Rocha e colaboradores, estudando a migração de neutrófilos causada pela TcdA do *C. difficile* nas cavidades peritoneais e bolsas de ar subcutâneas de ratos, foi observado que a TcdA atua como um potente indutor da migração neutrofílica, esta é em parte dependente de citocinas derivadas de macrófagos, como, TNF- α e IL-1 β e leucotrienos (LTB4). Esses mediadores ajudam a explicar a intensa

colite inflamatória observada em modelo animal experimental dessa doença induzida pela TcdA de *C. difficile*. Em 2001, o mesmo grupo de pesquisa, demonstrou que a TcdB, ao estimular macrófagos em experimentos *in vitro*, utilizando câmaras de Üssing, ao contrário da TcdA, não foi capaz de induzir secreção intestinal, nem alteração no transporte eletrogênico em íleo de coelho. Esses dados mostraram ainda que o sobrenadante de macrófagos estimulados com TcdB não estimulou o transporte iônico, porém, ambas as toxinas estimulam a gênese do TNF- α , mas somente a TcdA foi capaz de induzir a síntese de IL-1 β (ROCHA *et al.*, 2001).

Conforme Lyerly e colaboradores (1988), a lesão intestinal ocasionada pela TcdA de *C. difficile* está associada ao influxo de polimorfonucleares (neutrófilos) para dentro da mucosa colônica, um achado clínico observado na colite pseudomembranosa. Com base nisso, uma pesquisa realizada por nosso grupo e publicada por Brito *et al.* (2002b), avaliou o efeito da TcdA de *C. difficile* sobre a morfologia e a função dos neutrófilos *in vitro*. Nesta pesquisa, foi mostrado que a TcdA induziu mudanças na forma de PMNL aderente de uma forma esférica ou piramidal compacta para uma forma fina e semelhante a corda. Estas alterações foram acompanhadas pelo rearranjo do citoesqueleto de F-actina em agregados. Os PMNL incubados com TcdA mostraram maior aderência a componentes de matriz extracelular e expressaram menos L-selectina e mais Mac-1, em comparação ao grupo não tratados, sendo estes efeitos ocasionados pela capacidade com que a TcdA tem de glicosilar as Rho GTPases em neutrófilos humanos.

No mesmo ano, o nosso grupo também mostrou os mecanismos de como TcdA induz a apoptose em células epiteliais intestinais do cólon humano (T-84), verificando que o processo de apoptose era dependente do tempo de incubação e da dose de TcdA utilizada, e que o processo de apoptose era completamente inibido pelo bloqueio da atividade enzimática da toxina na Rho GTPases com uridina-5-difosfato-2,3-dialdeído e parcialmente inibida quando se utilizava inibidores de caspases 1, 3, 6, 8 e 9. Portanto, a TcdA induz apoptose pelo mecanismo dependente da inativação de Rho, e da ativação das caspases efetoras (3 e 6) e das caspases iniciadoras (8 e 9), além da ativação do Bid e de provocar lesão mitocondrial com a liberação de citocromo c (BRITO *et al.*, 2002a).

Em 2014, Lima e colaboradores verificaram que a TcdA de *C. difficile* inibe de forma dose-dependente a via de sinalização Wnt/ β -catenina em cultura de células epiteliais intestinais de rato (IEC-6) e em células de adenocarcinoma de cólon humano (RKO), através do ensaio repórter de luciferase para fator de célula T (TCF). Nesse estudo, foi demonstrado que a pré-incubação de células RKO com TcdA por 12h atenuou a ativação da via de Wnt

mediada pela Wnt3a, sugerindo que a inativação das Rho GTPases tem um papel significativo nessa inibição. Logo, esses dados sugerem que a inibição dessa via pela TcdA é importante para os efeitos antiproliferativos da TcdA. Dando continuidade ao estudo da via de sinalização Wnt/ β -catenina e o nosso grupo de pesquisa sabendo que a TcdA do *C. difficile* inibe a principal força motriz por trás da proliferação das células epiteliais intestinais (via Wnt), Martins e colaboradores em 2020 mostraram utilizando tanto modelo *in vivo* quanto *in vitro* que os efeitos da TcdA sobre a via Wnt/ β -catenina se deve a provável inativação de Rac1 que é um dos mecanismos envolvidos nessa via.

Em 2016, Tao e colaboradores realizaram uma pesquisa mostrando que as proteínas frizzled (FZD) são receptores epiteliais do cólon para a TcdB de *C. difficile*, onde esta inibiu a via Wnt/ β -catenina por ligar-se ao receptor Frizzled-7 (FZD-7) no epitélio colônico. A TcdB liga-se ao sítio conservado de ligação a Wnt, conhecido como domínio rico em cisteína (CRD), com uma maior afinidade para FZD1,2 e 7. Além de se ligar a esse receptor, impedindo a ligação de ativadores da via, como Wnt-3a, essa toxina mostrou utilizá-lo como meio para ser internalizada dentro dessas células. Esses achados estabeleceu os FZDs como receptores fisiologicamente relevantes para o TcdB no epitélio colônico. Sabendo-se que a TcdB de *C. difficile* tem como alvo os epitélios do cólon humano por ligar justamente as proteínas frizzled dos receptores Wnt, Chen *et al.* (2018) mostrou as bases estruturais para que ocorra o reconhecimento de proteínas frizzled por essa toxina utilizando uma estrutura cristalina de um fragmento de TcdB. Conforme demonstrado, um ácido graxo endógeno é responsável por ligar as FZD atuando como um co-receptor para ligação de TcdB e essa ligação entre o ácido graxo e TcdB pode está envolvido na patogênese da CDI.

Sabe-se que TGF- β 1 que é sintetizado pelas células gliais entéricas (CGEs) inibe a proliferação de células epiteliais enquanto estimula a migração de células epiteliais de maneira dependente da dose, tendo assim um efeito anti-proliferativo (YU; LI, 2014). Nesse sentido, o nosso grupo de pesquisa estudando o envolvimento desta via (sinalização TGF- β 1/SMAD), foi mostrado que TcdA tanto *in vitro* IEC-6 (linhagem de células epiteliais intestinais de ratos) quanto *in vivo* (modelo de enterite ileal) ativa essa via. Neste estudo, a TcdA aumentou a expressão de TGF- β 1 e seu receptor (T β RII), *in vitro* e *in vivo*. Além disso, a TcdA induziu a translocação nuclear dos fatores de transcrição SMAD2/3, um marco da ativação da via do TGF- β 1, tanto em células IEC-6 quanto na enterite. Foi demonstrado ainda que a adição de TGF- β 1 recombinante (rTGF- β) evitou a apoptose/necrose induzida por TcdA e restaurou a proliferação e a atividade de reparo em células IEC-6 na presença de TcdA. Logo, esses dados sugerem que via do TGF- β 1 pode desempenhar um importante papel

protetor contra os danos intestinais causada pela TcdA de *C. difficile* (TINOCO-VERAS *et al.*, 2017).

Quando se fala em glia entérica é importante mencionar que ela tem um papel muito significativo no transcriptoma da célula epitelial, já que induz uma mudança fenotípica da célula epitelial em direção ao aumento tanto da adesão quanto também na diferenciação celular, ou seja, a glia entérica atua na preservação da barreira epitelial contra o ataque de bactérias intestinais, como é o caso do *C. difficile* (YU; LI, 2014; FETTUCCIARIA *et al.*, 2017). Nesse sentido, ultimamente nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo e publicando vários trabalhos no estudo da arte do sistema nervoso entérico (SNE) e as perturbações fisiopatológicas desse ambiente ocasionadas pela TcdA e TcdB do *C. difficile*. Em 2021, Costa e colaboradores em um estudo pioneiro mostraram que a S100 β , proteína secretada pelas CGEs do SNE, é aumentada durante a CDI tanto em biópsias colônicas de pacientes quanto em camundongos. Nesse estudo foi evidenciado que a S100 β (proteína de ligação ao cálcio S100) é um importante regulador do processo inflamatório durante a CDI, sendo assim um mediador chave na lesão intestinal bem como também regulando uma variedade de mediadores pró-inflamatórios, tais como, IL-6, IL-1 β , IL-8, e outros.

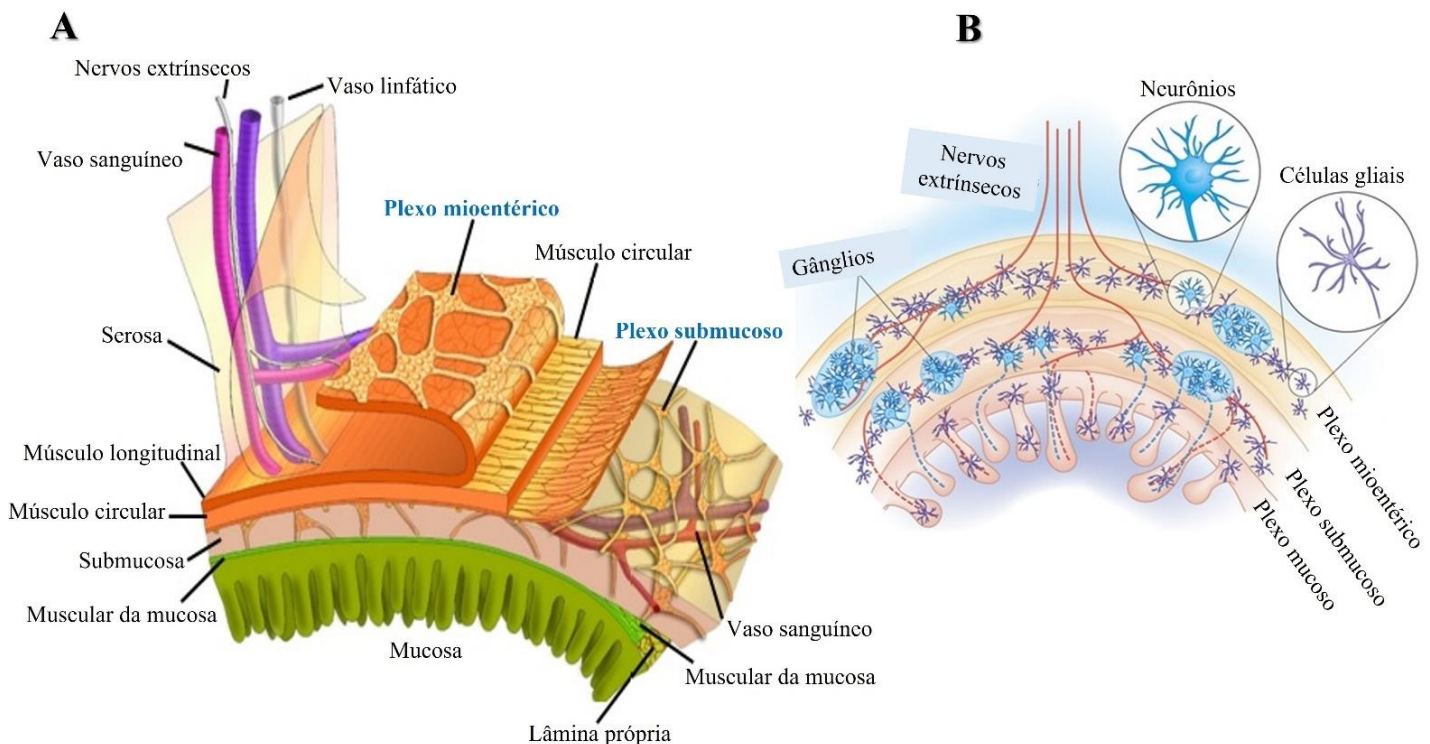
Sabendo que existe uma certa lacuna da real população dos neurônios entéricos que são afetados pela TcdA do *C. difficile*, o nosso grupo de pesquisa em outro estudo mostrou a caracterização dessa população específica de neurônios mioentéricos que são realmente afetados pela TcdA. Além disso, nesse estudo foi demonstrado que a TcdA do *C. difficile* induz uma regulação positiva do receptor P2X7, promovendo perda de neurônios entéricos, síntese de S100 β , inflamação tecidual e morte celular em camundongos (SANTOS *et al.*, 2022). Uma continuação desse estudo foi realizado por Loureiro e colaboradores (2022), onde os autores investigaram o papel da sinalização de Panexina-1 (canal que permite passagem de moléculas mensageiras para ativar o P2X7) durante a inflamação da glia entérica ocasionada pelas toxinas do *C. difficile*. Nesse trabalho, foi mostrado que a Panexina-1 está aumentada no curso da CDI e que desempenha um papel importante nos efeitos das toxinas do *C. difficile* nas CGEs. Ademais, a Panexina-1 participa ainda da morte celular ao promover a ativização da caspase-3/7 via P2X7.

1.6 Sistema nervoso entérico e as células glias entéricas (CGEs)

1.6.1 Sistema nervoso entérico

O trato gastrointestinal é o único órgão interno que evoluiu com um sistema nervoso próprio e independente e que é innervado por uma complexa rede de gânglios que se interligam, denominado de sistema nervoso entérico (SNE). Este por sua vez contém cerca de 200 a 600 milhões de neurônios e 1 bilhão de células glias agrupadas, formando dois plexos principais, isto é, o mioentérico e o submucoso (figura 8) (ANNAHAZI; SCHEMANN, 2020). O plexo mioentérico é responsável por controlar a atividade muscular e esse por sua vez está localizado na parede muscular do intestino. Já o plexo submucoso está localizado na submucosa do intestino e controla as funções epiteliais. Além disso, as células glias entéricas (CGEs) estão presentes em ambos os plexos que irão modular tanto o fluxo sanguíneo quanto a atividade do sistema imune entérico (PAWOLSKI; SCHMIDT, 2021).

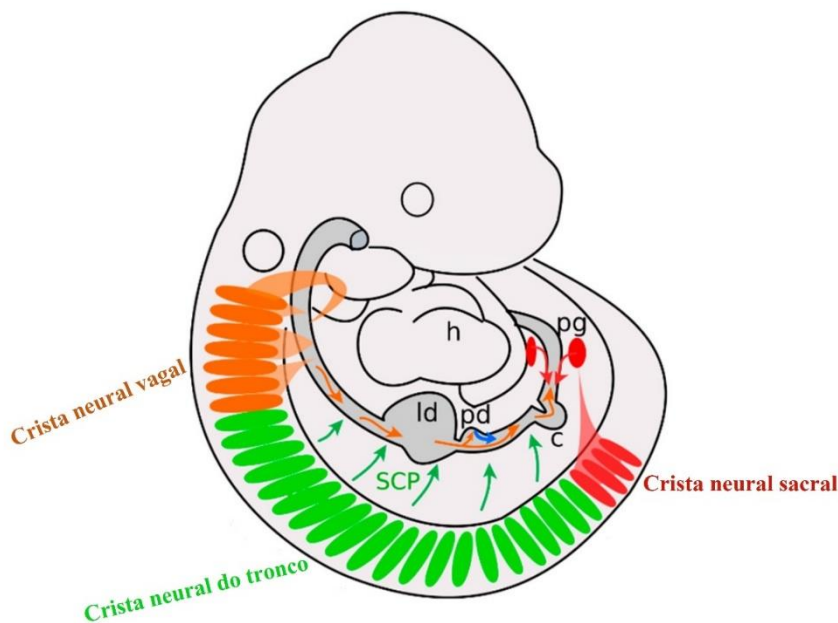
Figura 8 – Organização dos plexos no sistema nervoso entérico (SNE).



Fonte: Adaptado de Annahazi; Schemann (2020) e Rescigno (2008). **A)** Representa uma visão geral da distribuição dos plexos no SNE e dos demais elementos anatômicos do intestino. Nesse painel pode ser observado o plexo mioentérico que está localizado entre as camadas muscular longitudinal e circular. Já no plexo submucoso observa-se que está situado entre a mucosa e a camada muscular circular. **B)** Representa uma visão mais detalhada da rede de neurônios e células glias contidas nos plexos. Nesse painel pode se observar que tanto o plexo mioentérico quanto o submucoso são constituídos por neurônios e células glias entéricas (CGEs) organizados em gânglios. Porém, já o plexo mucoso é formado apenas por CGEs e terminações nervosas de determinados neurônios.

Quando se fala na origem primária do SNE cabe destacar que esse é derivado das células da crista neural vagal e sacral que migram para o trato gastrointestinal (TGI) do intestino anterior em direção ao intestino posterior caudal (LIU; YANG, 2022). Nesse sentido, células da crista neural (NCCs) com destino ao SNE derivam principalmente do nível vagal (região adjacente ao somito 1-7) da crista neural e em uma porção menor do nível sacral, como observado na figura 9 (PAWOLSKI; SCHMIDT, 2021).

Figura 9 – Precursores do SNE e sua embriologia.



Fonte: Adaptado de Pawolski; Schmidt (2021). Na embriologia do SNE está sendo demonstrado os precursores neurais que são derivados da crista neural vagal, adjacente aos somitos 1 a 7 (laranja). Esses por sua vez migram ao longo do intestino em uma direção oral para anal. Um segundo grupo origina-se das células da crista neural sacral (em camundongos atrás do somito 24), forma os gânglios pélvicos (pg) e migra na direção anal para oral (vermelho). Outros precursores neurais entéricos são descendentes de precursores de células de Schwann (SCP, verde) ou progenitores pancreáticos (azul). h coração; ld divertículo hepático, pd divertículo pancreático, c ceco.


Como já mencionado anteriormente, o SNE por inervar a parede intestinal torna-se uma peça crucial no controle das mais variadas funções importantes e que são exercidas pelo TGI. Nesse aspecto, as funções que o TGI exerce sob o comando do SNE incluem a regulação da motilidade intestinal local, secreção de líquidos, absorção de nutrientes, interação com o sistema imunológico e com a microbiota intestinal (BOESMANS *et al.*, 2022). Vale ressaltar ainda que o circuito entérico (neurônios e CGEs) desempenha um papel central na homeostase intestinal, e isso se torna mais evidente quando há falhas em sua fiação (estrutura), como pode ser visto em determinados distúrbios do neurodesenvolvimento ou até mesmo neurodegenerativos (FUNG; BERGHE, 2020).




1.6.2 Células gliais entéricas (CGEs)

As células gliais entéricas (CGEs) são um tipo de célula glial não-neuronal que se encontram presentes no sistema nervoso entérico (SNE) e que estão distribuídas ao longo do TGI (SEGUELLA; GULBRANSEN, 2021). Além disso, as CGEs superam os neurônios no SNE em aproximadamente 4 vezes em camundongos e 6 vezes em humanos, o que sugere um papel de suma importância na fisiologia intestinal (ROSENBERG; RAO, 2021). Essas células por representarem parte integrante do SNE, elas possuem várias funções importantes para o bom funcionamento do TGI em condições fisiológicas (manutenção da integridade da barreira epitelial intestinal, homeostase imunológica intestinal, comunicação entre neurônios, regulação do apetite e a absorção de nutrientes), bem como participa ainda dos processos fisiopatológicos intestinais (doença de Crohn, colite ulcerativa, síndrome do intestino irritável, obesidade e infecção por *C. difficile*) (LÓPEZ-GÓMEZ *et al.*, 2021; LIU; YANG, 2022).

A morfologia das CGEs é semelhante aos astrócitos que estão presentes no SNC e essa característica permitiu com que os pesquisadores pioneiros Hanani e Reichenbach (1994) pudessem distinguí-las e classificá-las em quatro subgrupos com base em sua morfologia, como pode ser observado na tabela 1 abaixo. Ademais, a heterogeneidade e as múltiplas funções que a glia entérica pode exercer sobre o TGI fizeram com que o Guyer e colaboradores (2023) conseguissem confirmar agora um novo potencial neurogênico para as CGEs e algumas dessas por sua vez podem apresentar ainda uma configuração de cromatina aberta, o que surge que essas células estão não só preparadas como prontas para se diferenciarem em neurônios.

Tabela 1 – Divisão das células gliais entéricas em subtipos e suas características.

Tipos de CGEs	Características	Morfologia	Localização
CGEs protoplasmáticas do Tipo I	São células em forma de estrela com muitos processos curtos irregulares e ramificados, o que lembra aos astrócitos do SNC		Intraganglionar (gânglios entéricos)

<p>CGEs fibrosos do Tipo II</p>	<p>São células com aspecto alongado presentes dentro de feixes de fibras interganglionares, o que leva a esse tipo de célula ter semelhança aos astrócitos fibrosos do SNC</p>		<p>Localizados dentro ou nos limites do plexo submucoso e mioentérico</p>
<p>CGEs da mucosa do Tipo III</p>	<p>Apresentam processos de ramificação longos e finos</p>		<p>Localizados dentro ou nos limites do plexo submucoso e mioentérico</p>
<p>CGEs intramusculares do Tipo IV</p>	<p>Glia associada a fibras nervosas nas camadas musculares circulares e longitudinais com uma morfologia bipolar</p>		<p>Extraganglionar: acompanha as fibras nervosas e circunda os músculos lisos</p>

Fonte: Adaptado de López-Gómez *et al.*, (2021) e Liu; Yang (2022).

As CGEs apesar de serem células não imunes, elas são capazes de produzir uma variedade de citocinas, quimiocinas e outros marcadores gliais entéricos em resposta a estímulos patológicos, o que faz com que essas células passem a apresentar um fenótipo pró-inflamatório reativo (LÓPEZ-GÓMEZ *et al.*, 2021). Logo, quando essas células passam a serem reativas no intestino, por exemplo, elas aumentam a expressão desses mediadores gliais que exercem um papel importante na inflamação intestinal e na arte do SNE, ou seja, estímulos pró-inflamatórios tais como, lipopolissacarídeo, lesão ou infecção, provocam uma

ativação patológica da glia entérica, conhecida como gliose reativa, isso faz com que as CGEs produzam fatores que contribuem para a inflamação (OCHOA-CORTES *et al.*, 2016). Dentre esses fatores que podem levar a uma resposta imune exacerbada e danos ao intestino estão os marcadores gliais, como o GFAP (proteína glial fibrilar ácida) e S100B (Proteína S100 de ligação ao cálcio-B), as citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6), quimiocinas (CCL2 e MCP-1), fatores neurotróficos derivados de células gliais (GDNF) e outras moléculas de sinalização imunomoduladoras, incluindo o óxido nítrico (NO) (POCHARD *et al.*, 2018).

Então, quando essas células são ativadas exibem uma função notável que é sua capacidade proliferativa aumentada e também o aumento tanto de mediadores inflamatórios quanto de receptores como, por exemplo, os receptores NGF (receptor do fator de crescimento nervoso), TrkA (receptor de tropomiosina quinase A), ET-B (receptor B de endotelina-1), TLR (receptor Toll-like) e o BR1 (receptor de bradicinina 1) (VON BOYEN *et al.*, 2006; MURAKAMI *et al.*, 2008; VON BOYEN *et al.*, 2010; ESPOSITO *et al.*, 2014). Já com relação ao receptor de potencial transitório vanilóide 4 (TRPV4), até o presente momento não há trabalhos na literatura que evidencie que as CGEs expressem tal receptor, mesmo esse receptor estando envolvido com doença inflamatória intestinal (CHEN *et al.*, 2020), o que mostra a importância dessa pesquisa.

1.7 Receptor de Potencial Transitório Vanilóide 4 (TRPV4) e seu Papel nas Doenças Inflamatórias Intestinais

Vários receptores distribuídos ao longo do TGI têm chamado atenção de muitos pesquisadores por serem considerados possíveis alvos potenciais para o desenvolvimento de novas abordagens de tratamento para doenças inflamatórias intestinais (DII), incluindo colite ulcerativa (UC) e doença de Crohn (DC), que são doenças inflamatórias crônicas que acomete o TGI, cujas causas incluem, por exemplo, os fatores genéticos, imunidade intestinal anormal e uma disbiose da microbiota intestinal (CHEN *et al.*, 2020).

Dentre os receptores no TGI que desempenham um papel importante na fisiopatologia da DII estão os canais iônicos de potencial receptor transitório (TRP) que foram identificados e são considerados potencialmente eficazes e sensíveis a endotoxinas bacterianas (KHALIL *et al.*, 2018). Esses canais TRP estão amplamente distribuídos no TGI e exercem diversos efeitos, contribuindo para a nocicepção somática e visceral e também para a manutenção da função fisiológica do trato GI. Nesse sentido, de acordo com a homologia das sequências de

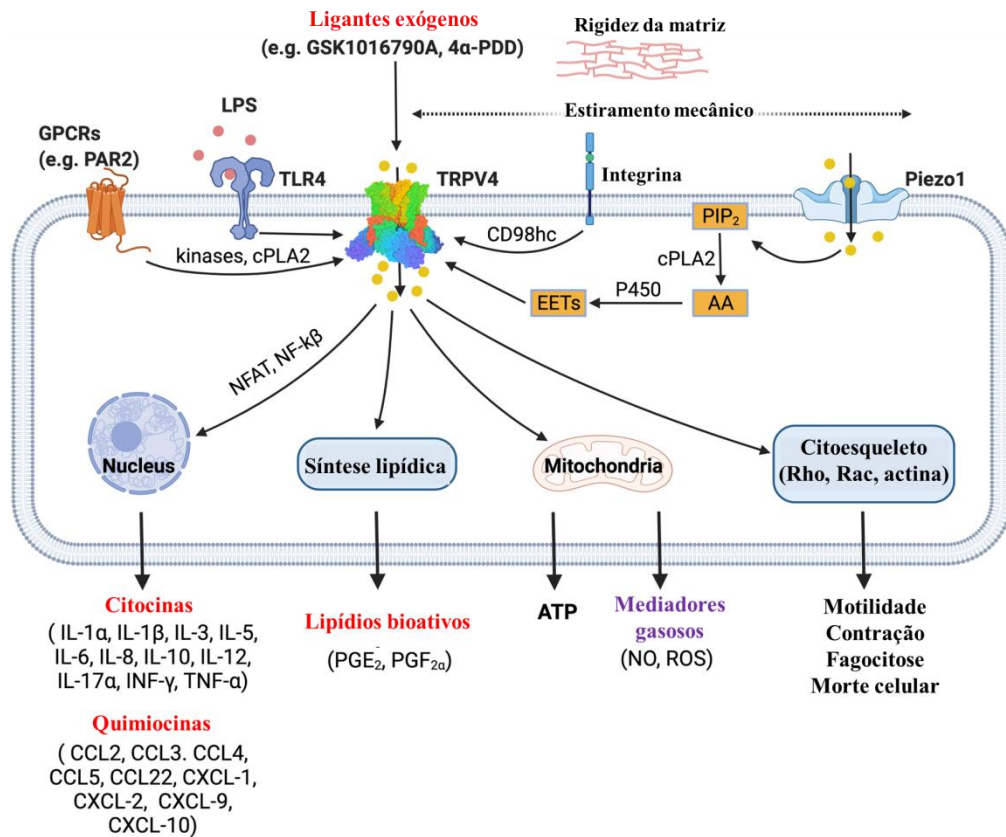
seus aminoácidos, os canais TRP podem ser divididos em sete subfamílias diferentes, sendo eles: TRP “vanilóide” (TRPV1–6), TRP “canônico” (TRPC1–7), TRP “anquirina” (TRPA1), TRP “melastatina” (TRPM1–8), TRP “policistina” (TRPP), TRP “mucopolinas” (TRPML1–3) e TRPN (NO-potencial mecano, NOMPC) (ZHANG *et al.*, 2023).

A superfamília dos TRPs consiste num imenso grupo de canais de cátions não seletivos que servem como sensores celulares para um amplo espectro de estímulos tanto físicos quanto ambientais (ZHANG *et al.*, 2018). Os TRPs exibem múltiplas características únicas que não apenas os distinguem de outras superfamílias de canais iônicos, mas também conferem diversas funções fisiológicas. Os TRPs por serem conhecidos salvaguardas celulares e detectarem vários estresses celulares e estímulos ambientais e traduzir essas informações em respostas no nível do organismo, eles estão localizados na membrana plasmática ou nas membranas das organelas intracelulares (ZHANG *et al.*, 2018; YE *et al.*, 2021; LI *et al.*, 2022).

A ativação dos canais TRP, como por exemplo, o TRPV4 (receptor de potencial transitório vanilóide 4), pode mediar a liberação de neuropeptídeos, como é o caso da substância P (SP), que conseqüentemente irá desencadear uma resposta inflamatória intestinal (DU *et al.*, 2022). Vale destacar que a ação da TcdB do *C. difficile* estimula a secreção da SP e também do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) dos neurônios e citocinas pró-inflamatórias dos pericitos e que o bloqueio da sinalização da SP ou CGRP reduz tanto o dano tecidual quanto a carga dessa bactéria em camundongos infectados por uma cepa padrão de *C. difficile* ou cepas hipervirulentas que expressam, por exemplo, a variante da TcdB (MANION *et al.*, 2023).

Além das funções fisiológicas no sistema nervoso do TGI, os canais TRP também são expressos em células imunes, regulam atividade fagocítica e secreção de citocinas (ZIELINSKA *et al.*, 2015). Um dos membros dessa superfamília mais bem caracterizado e estudado é o TRPV4, canal catiônico polimodal não seletivo, principalmente, permeável ao Ca^{2+} , Mg^{2+} ou Na^{+} , caracterizado por uma razão de permeabilidade ao Ca^{2+} alta (NGUYEN *et al.*, 2021; TURECKOVA *et al.*, 2023). Como pode ser observado na figura 10, os canais TRPV4 podem ser ativados por uma variedade de estímulos físicos e químicos, incluindo calor, inchaço celular, estímulos mecânicos, ligantes endógenos tais como, o ácido araquidônico e seus metabólitos derivados do citocromo P450, endocanabibóides, bem como sintéticos derivados dos ésteres de 4- α -forbol (EVERAERTS *et al.*, 2010; NGUYEN *et al.*, 2021).

Figura 10 – Efetores chave da ativação e sinalização das vias intracelulares do canal TRPV4.



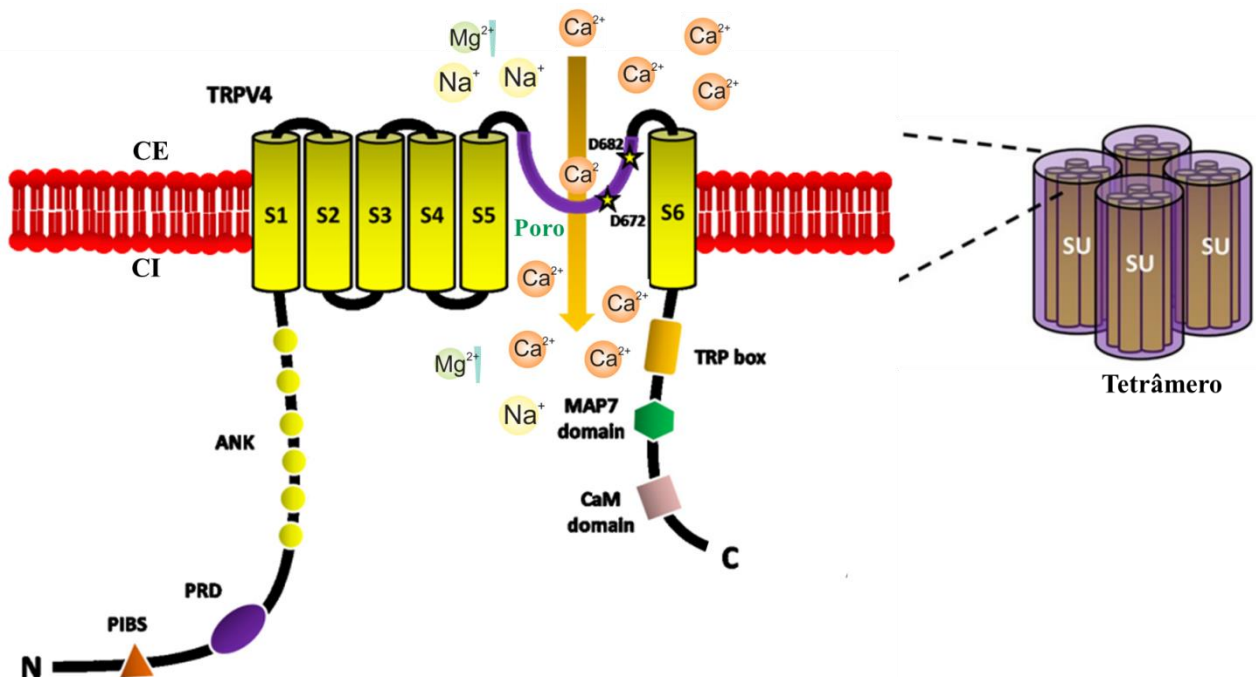
Fonte: Adaptado de Nguyen *et al.* (2021) e Yu *et al.* (2019). O canal iônico TRPV4 pode ser ativado direta ou indiretamente por uma variedade de estímulos, incluindo força mecânica, mediadores endógenos e ferramentas farmacológicas. A sinalização do TRPV4 pode levar a uma série de efeitos posteriores na função celular. Dentre esses efeitos intracelulares pode ser citado o mecanismo envolvido na resposta inflamatória do TRPV4 onde o influxo de cálcio via TRPV4 leva a ativação dos fatores nucleares (NFAT e NF-κB) que por sua vez regula a transcrição de citocinas e quimiocinas. Além disso, o receptor quando hiperativo induz uma despolimerização excessiva do citoesqueleto de actina o que pode agravar a apoptose celular. GPCR (receptores acoplados a proteína G); TLR4 (receptor toll-like 4); LPS (lipopolissacarídeo); PIP₂ (bifosfato de fosfatidilinositol); AA (ácido araquidônico); cPLA₂ (fosfolipase A₂ citosólica); P450 (epoxigenase do citocromo P450); EETs (ácidos epoxieicosatrienóicos); NFAT (fator nuclear de células T ativadas) e NF-κB (fator nuclear kappa B). Piezo1 (canal iônico mecanicamente sensível e que uma vez ativado leva um aumento do influxo de Ca²⁺). Esse canal regula várias funções, como migração, proliferação e apoptose sob pressão mecânica).

De acordo com o Atlas de Proteína Humana, o TRPV4 é expresso nas membranas celulares de vários tecidos humanos, estes tecidos incluem: o cérebro (principalmente o córtex e hipocampo), esôfago, estômago, intestino delgado (duodeno), cólon, rim, pulmão, coração, fígado, pâncreas e outros (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000111199-TRPV4/tissue> ; acessado em 17 de janeiro de 2024). Além disso, sua expressão já foi descrita no plexo mioentérico do cólon humano e também em células do sistema imunológico, incluindo os macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (FICHNA *et al.*, 2015a; YIN *et al.*, 2016; LUO *et al.*, 2018).

No sistema do TGI de roedores, o TRPV4 é amplamente expresso no estômago, intestino delgado e cólon, sendo que foi encontrada maior expressão de RNAm desse receptor em neurônios sensoriais do cólon do que em todo gânglio da raiz dorsal (DRG) (BRIERLEY *et al.*, 2008; CENAC *et al.*, 2008). Um estudo realizado por Blackshaw e colaboradores (2010) mostraram que na periferia, o TRPV4 está colocalizado com o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) nas camadas mais externas das fibras do cólon. Vale destacar ainda que o TRPV4 é funcionalmente expresso por diferentes subconjuntos de células gliais do sistema nervoso, nomeadamente em neurônios, astrócitos, micróglia e em células da linhagem oligodendroglial (KIM *et al.*, 2015; NISHIMOTO *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2022).

A estrutura do canal TRPV4 é tetramérica, isto é, cada subunidade consiste em seis domínios transmembranar (S1-S6), com o poro formado pela interação entre as subunidades S5 e S6. Esse receptor contém em sua estrutura molecular 871 aminoácidos com a porção amino (N) e carboxila (C) terminais, ambos localizados intracelularmente, como pode ser observado na figura 11 abaixo (TURECKOVA *et al.*, 2023).

Figura 11 – Estrutura do canal TRPV4 com os principais domínios funcionais.



Fonte: Adaptado de Tureckova *et al.* (2023) e White *et al.* (2016). A proteína TRPV4 consiste em seis domínios transmembranar (S1-S6) com uma alça de poro entre S5 e S6. Dois aminoácidos essenciais (aspartato - D672 e D682), para a regulação da permeabilidade do TRPV4 e que são destacados na região dos poros. Ambos os terminais N e C estão situados no citosol. O terminal N inclui uma série de repetições de anquirina (ANK), um domínio rico em prolina (PRD) e um sítio de ligação a fosoinositídeo (PIBS). O terminal C contém um domínio da proteína 7 associada aos microtúbulos (MAP7) e um domínio de ligação Ca^{2+} /calmodulina (CaM). Outras

abreviaturas: CE, lado extracelular; CI, lado intracelular; SU, quatro subunidades do TRPV4 comontadas em um tetrâmero.

A grande parte da estrutura da proteína do TRPV4 (aproximadamente 70%) é exposta intra ou extracelularmente e contém numerosos locais de ligação para que haja interação com moduladores e proteínas (EVERAERTS *et al.*, 2010). O terminal N do canal TRPV4 representa a maior parte da porção citosólica e inclui o domínio de repetição de anquirina (ANK) que distingue dos demais canais. Vale frisar que o domínio ANK é um local de suma importância para esse receptor, pois é onde ocorrem as interações proteína-proteína e é provavelmente o responsável pela autoassociação dos terminais N na estrutura tetramérica. O chamado domínio rico em prolina (PRD) está localizado próximo ao ANK, o que o torna importante para a mecanossensibilidade dos canais TRPV4. Além disso, locais de fosforilação para as proteínas quinases C (PKC), local de fosforilação dependente de cAMP ou local de fosforilação de tirosina dependente da família Src, foram localizados no terminal N. Já com relação ao terminal C do TRPV4, esse contém locais de ligação para interação com algumas proteínas, tais como, a proteína 7 associada aos microtúbulos (MAP7), receptor de trifosfato de inositol (IP3) e calmodulina (CaM) (TAKAHASHI *et al.*, 2014; LUFT, 2015; TURECKOVA *et al.*, 2023).

A função do canal TRPV4 é regulada através do domínio de repetição de anquirina (ANK) por pequenas moléculas e proteínas endógenas, incluindo a CaM e RhoA (MCCRAY *et al.*, 2021). Como mencionado em tópicos anteriores, a RhoA é um membro da superfamília Ras de GTPases, que está envolvida em processos de divisão, diferenciação, proliferação, apoptose, sobrevivência celular e regulação da dinâmica do citoesqueleto (TETLOW; TAMANOI, 2013). Além disso, uma recente triagem proteômica identificou uma pequena GTPase RhoA como sendo um inibidor do TRPV4, que por sua vez pode ser ativado pelo TRPV4 através da atividade do canal iônico e também do influxo de cálcio (MCCRAY *et al.*, 2021; BAGNELL *et al.*, 2022). Nesse sentido, uma pesquisa recente publicada por Nadezhdin e colaboradores (2023), demonstraram a estrutura do TRPV4 humano em um complexo com GTPase RhoA que mostra justamente a interação de RhoA com a superfície voltada para a membrana dos domínios ANK. Nesse trabalho, os autores identificaram os locais de ligação do 4 α -PDD (agonista TRPV4) e do inibidor HC-067047 do TRPV4 na base do feixe S1-S4. Foi mostrado ainda que a ligação do agonista leva à abertura dos poros, enquanto a inibição do canal envolve uma transição π para α na hélice formadora de poros S6. Em outra pesquisa envolvendo o mesmo complexo estrutural (TRPV4-Rho GTPase) foi sugerido que RhoA serve como uma subunidade auxiliar para o receptor TRPV4, isso faz com que haja uma regulação

da homeostase do cálcio mediada pelo TRPV4. Logo, a interrupção das interações TRPV4-RhoA pode desencadear surgimento de doenças relacionada a esse canal polimodal (KWON *et al.*, 2023).

Sabe-se que a calmodulina (CaM) regula o canal TRPV4 ao potencializar sua abertura e que a interação TRPV4-RhoA medeia as ações inibidoras recíprocas das duas proteínas, ou seja, a ligação de RhoA inibe o TRPV4 e a ligação do TRPV4 inibe o RhoA (NADEZHGIN *et al.*, 2023). Em um outro trabalho realizado por McCray e colaboradores (2021) mostraram que a RhoA no estado inibido se liga ao TRPV4 e a dissociação da RhoA do TRPV4 parece ser insuficiente para ativar a RhoA. Por outro lado, o aumento do volume celular eleva o influxo de Ca^{2+} mediado pelo mesmo receptor. Além disso, o aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} promove uma ativação sustentada de RhoA que por sua vez potencializa a abertura do TRPV4 à mudança no estado de ativação de RhoA (VARADARAJAN *et al.*, 2022). Um outro estudo mostrou que que influxo de Ca^{2+} mediado por TRPV4 em células T foi capaz de induzir a proliferação de células T e a secreção de TNF- α , IFN- γ e IL-2 *in vitro* (MAJHI *et al.*, 2015). Logo, esse dado destaca o papel pró-inflamatório crítico do TRPV4 nas células do sistema imunológico.

De acordo com D'Aldebert e colaboradores (2011), o TRPV4 exerce um papel pró-inflamatório no intestino, isto é, foi encontrada uma alta expressão de RNAm de TRPV4 em biópsias de cólon de pacientes com DII e tecidos de cólon de camundongos. Além disso, o 4 α PDD (agonista do TRPV4) ativou o fator nuclear kappa B (NF- κ B) e o fator de transcrição 1 (AP-1). Entretanto, ele não influenciou o fator nuclear das vias das células T ativadas e não participou da liberação de IL-8. Ademais, a ação pró-inflamatória na ativação do TRPV4 pode ser sensibilizada pela estimulação da proteína do receptor 2 ativado por protease (PAR2) (D'ALDEBERT *et al.*, 2011). Fichna e colaboradores (2012b) ao utilizarem um antagonista seletivo do TRPV4, RN-1734, administrado sistemicamente (ip) na dose de 1mg/kg e localmente (intracolônica) na dose de 10 mg/kg, mostraram uma melhora significativamente no índice de atividade da doença, na atividade da MPO (enzima mieloperoxidase) e na ulceração, sugerindo que o bloqueio do TRPV4 pode ser benéfico na atenuação da colite induzida por TNBS. Nesse contexto, o TRPV4 pode ser um alvo atraente para o tratamento de pacientes com infecção por *C. difficile*, já que é uma das complicações mais comuns em pacientes com DII.

2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Sabe-se que a microbiota gastrointestinal intacta proporciona resistência à colonização e desenvolvimento da infecção por *C. difficile* (CDI), uma das mais importantes causas de diarreia infecciosa associada ao uso de antibióticos, condição tão comum e responsável por afetar entre 5-39% dos pacientes tratados com antibioticoterapia (MULLISH; WILLIAMS, 2018; SEHGAL *et al.*, 2021). Atualmente, a CDI vem sendo considerada uma importante causa de mortalidade e morbidade aguda e crônica, tornando-se uma grande preocupação nos centros de serviços de saúde no mundo todo, além de ocasionar grandes impactos nos custos de saúde (OLSEN *et al.*, 2019). Entre as possíveis causas do aumento da morbimortalidade deve-se ao surgimento de cepas consideradas mais virulentas, como, por exemplo, a NAP1/BI/027. Essa cepa produz quantidades maiores de toxinas do que as cepas de referência e são altamente transmissíveis, devido à sua maior capacidade de esporulação (MERRIGAN *et al.*, 2010).

O aumento da incidência e gravidade da CDI tem gerado um impacto econômico profundo no sistema de saúde como nos pacientes, secundário a recorrências, hospitalizações, tempo de internamento prolongado e custo do tratamento (GUPTA; ANANTHAKRISHNAN, 2021). Nesse mesmo trabalho, em 2021 nos EUA foram avaliados os custos médios atribuíveis à infecção por *C. difficile* que teve uma variação de US\$ 8.911 a US\$ 30.049 mil dólares por pacientes hospitalizados, o que gerou um grande ônus econômico para os sistemas de saúde. Murthy e colaboradores (2012) ao realizarem um estudo de coorte retrospectivo de base populacional, eles determinaram o efeito da CDI nos resultados de saúde de pacientes com colite ulcerativa (CU) e descobriram que 9% dos pacientes com CU internados no hospital tinham CDI concomitante e tiveram um aumento na mortalidade tanto no curto e longo prazo. Além disso, 66% dos pacientes positivos para *C. difficile* apresentam DII grave, 33% apresentam DII moderada e nenhum apresenta DII leve, sendo que esses pacientes que têm CDI apresentam piores nos resultados clínicos no longo prazo devido as hospitalizações relacionadas à CU, distúrbios imunológicos do intestino e disbiose intestinal (KHANNA; PARDI, 2016; LI *et al.*, 2018; SEHGAL *et al.*, 2021).

Aqui vale destacar que a colite resultante da DII está associada a um ambiente microbiano intestinal perturbado que predispõe à CDI, ou seja, pacientes que apresentam colite infecciosa por *C. difficile* exibem aumento tanto da expressão proteica quanto da imunomarcção de GDNF (fator neurotrófico derivado de células gliais) e GFAP (proteína

glial fibrilar ácida), ambos expressos pela glia entérica do intestino e também na mucosa colônica inflamada (VON BOYEN *et al.*, 2011).

Com base nestes dados, o nosso grupo de pesquisa vem ultimamente desenvolvendo e publicando vários artigos científicos que englobam o estudo do sistema nervoso entérico (SNE) e as perturbações fisiopatológicas do microambiente entérico ocasionadas pela TcdA e TcdB do *C. difficile*. Como já é evidenciado na literatura, as células gliais entéricas (CGEs) representam um componente de suma importância para o sistema nervoso entérico, pois essas células além de representarem uma das linhas de defesa contra patógenos entéricos também participam de vários distúrbios imunológicos importantes do intestino, incluindo doença inflamatória intestinal (DII) (FILIPPIS *et al.*, 2011; LIU; YANG, 2022). Logo, as CGEs têm papéis cruciais na patogênese de doenças associadas à desregulação da barreira do epitélio intestinal como é o caso das DII, já que elas irão mediar ativamente a inflamação aguda e crônica no intestino, o que representa uma ligação muito importante entre o sistema nervoso e o sistema imunitário do intestino (LÓPEZ-GÓMEZ *et al.*, 2022).

Tendo em vista a importância das CGEs para a atividade neuronal, assim como para a homeostase funcional do epitélio intestinal, então o cerne dessa pesquisa foi investigar se as CGEs expressam o TRPV4 em sua estrutura e se a ativação desse receptor pela TcdA e TcdB do *C. difficile* levaria a uma resposta inflamatória e morte celular dessas células, já que os canais TRP estão envolvidos com homeostase da mucosa do intestino em especial o TRPV4 (ALAIMO; RUBERT, 2019). Dessa forma, essa pesquisa foi de grande relevância para o mundo científico, já que pela primeira vez mostrou-se que as CGEs expressam tal receptor e que sua ativação pelas toxinas permite com que o receptor TRPV4 participe da morte celular *in vitro* e contribua de forma significativa para a resposta inflamatória das CGEs.

Logo, a presente pesquisa colabora com os estudos *in vivo* sobre o aumento da expressão do TRPV4 no tecido intestinal inflamado de pacientes com DII humana (colite ulcerativa e doença de Crohn) em comparação com o tecido intestinal saudável, e que sua ativação desencadeia uma cascata com liberação de vários mediadores inflamatórios, tornando o receptor TRPV4 um novo alvo terapêutico promissor para a prevenção dos danos nas CGEs advindos das toxinas do *C. difficile* (D'ALDEBERT *et al.*, 2011; FICHNA *et al.*, 2012b).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Investigar o papel do canal TRPV4 na resposta inflamatória e na morte celular induzidas por TcdA e TcdB do *C. difficile* em CGEs, bem como avaliar a expressão protéica desse canal no ceco e no cólon de camundongos com CDI.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão gênica do receptor TRPV4 em CGEs ativadas por TcdA e TcdB do *C. difficile*;
- Verificar por imunofluorescência e Western blotting a expressão protéica do TRPV4 em CGEs expostas a TcdA e TcdB;
- Estudar o efeito do bloqueio do TRPV4 pelo seu antagonista RN-1734 sobre a ativação do NFκB em CGEs expostas a TcdA e TcdB
- Avaliar o bloqueio do TRPV4 pelo RN-1734 sobre os níveis de expressão gênica e protéica das citocinas inflamatórias (*IL-1β*, *IL-6* e *TNF-α*) em CGEs induzidas por TcdA e TcdB;
- Verificar o efeito bloqueio do TRPV4 tanto sobre a expressão gênica do fator antiapoptótico *bcl-2* quanto na ativação de caspase-3 e nos níveis de apoptose em CGEs expostas a TcdA e TcdB;
- Analisar a expressão do TRPV4 no ceco e no cólon de animais infectados pelo *C. difficile*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Fármacos, reagentes, materiais e soluções utilizados no estudo

Os fármacos, os reagentes, os materiais e as soluções que foram utilizados ao longo desta pesquisa encontram-se detalhados no apêndice.

4.2 Experimentos *in vitro* (Cultura de CGEs)

A linhagem imortalizada de CGEs utilizadas neste estudo são provenientes da região do jejuno de *Rattus norvegicus* ATCC (PK060399egfr CRL-2690, Virgínia-Estados Unidos) e essas por sua vez demonstraram exibir morfologia e propriedades funcionais semelhantes às células gliais entéricas primárias (RUHL; TROTTER; STREMMEL, 2001). Além disso, as CGEs foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco) e suplementada com 10% de soro fetal bovino, 1% de antibióticos (100 mg/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina, Gibco) e 1 mM de piruvato de sódio (Gibco) a 37°C em uma incubadora umidificada sob 5 % CO₂ para não mais de 25 passagens. Para todos os experimentos, as CGEs foram liberadas dos frascos de cultura usando 0,05% de tripsina-EDTA por 5 min.

4.3 Administração de toxinas e fármacos em CGEs

Neste estudo foram utilizadas as TcdA e TcdB purificadas da TechLab (Virgínia-Estados Unidos) e essas por sua vez foram produzidas pela cepa do *C. difficile* VPI10463. Além disso, para estudar o papel do receptor TRPV4 nas alterações induzidas pelas toxinas, as células gliais entéricas (CGEs) foram incubadas com TcdA (50 ng/mL) ou TcdB (1 ng/mL) por 18h de incubação (COSTA *et al.*, 2021). Vale ressaltar ainda que para verificar a participação de componentes provenientes da via intracelular relacionada com a ativação ou inibição do TRPV4, as CGEs foram pré-tratadas com o antagonista do receptor TRPV4 (RN-1734) na concentração de 100µM uma hora antes da incubação com a TcdA e TcdB, como será visto ao longo das demais metodologias descritas abaixo.

4.4 Parâmetros avaliados *in vitro*

4.4.1 Ensaio de viabilidade celular

Para definir as concentrações do RN-1734 capazes de não afetar a viabilidade das CGEs em 18h de incubação, realizou-se o ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio (MTT). As CGEs (5×10^3 células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços e após 24h foram incubadas com o RN-1734 nas doses de 1, 5, 10, 30, 50, 100 e 300 μM por 18h de incubação. Em seguida, as células foram incubadas com MTT (0,5 mg/mL reconstituído em DMEM suplementado) por 2h a 37°C em incubadora úmida sob condição de 5% de CO_2 . Após remoção da solução de MTT, 150 μl de dimetilsulfóxido foram adicionados a cada poço para ressuspender os cristais de formazan. As placas foram agitadas durante 2 min em temperatura ambiente e a absorbância da reação foi mensurada a 570 nm utilizando um leitor de ELISA. Vale destacar que um grupo controle de morte representado pelas CGEs incubadas com dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado ao experimento.

4.4.2 Avaliação da expressão gênica do TRPV4 por qPCR

Toda a linha de raciocínio dessa pesquisa partiu do primeiro experimento voltado para avaliação da expressão gênica do receptor TRPV4 em CGEs por qPCR, devido à necessidade de identificar se essas células expressavam ou não esse tipo de receptor para, assim, prosseguir com a pesquisa. Nesse sentido, além de investigar a expressão gênica do TRPV4, foi avaliado também em outros momentos diferentes a expressão de outros genes envolvidos com a ativação ou inibição do TRPV4, tais como: *IL-6*, *IL1- β* , *bcl-2*.

A linhagem de CGEs (6×10^5 células/poço) foi distribuída em placas de 6 poços e incubadas com TcdA ou TcdB por 18h para analisar primeiramente a expressão do TRPV4, como mencionado acima. Após o fim da incubação de 18h, o RNA total foi extraído usando o kit RNeasy Plus Mini (Qiagen, Hilden, Alemanha) por meio do QIAcube (Qiagen). Em seguida, o 1 μL de RNA de cada amostra foi utilizada para quantificar o RNA das amostras usando o Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, EUA).

Para a síntese do cDNA, 600 ng de RNA foi transcrito reversamente usando o kit de síntese de cDNA iScript (BioRad) após remoção da contaminação do DNA genômico por meio do tratamento das amostras com DNase I (Invitrogen). A amplificação do TRPV4 e GAPDH por qPCR, a partir de amostras de CGEs processadas, foi realizada por meio do

sistema CFX Connect (BioRad) com as seguintes condições 95 °C por 30s seguido por 40 ciclos a 95 °C por 5s e 60 °C por 30s.

Em outro experimento à parte, repetindo todas as etapas do procedimento descrito acima, foi utilizado o modulador farmacológico do TRPV4 (RN-1734) com o mesmo período de incubação das toxinas com o intuito de verificar os componentes liberados pelas CGEs ocasionadas pelas toxinas ou que são provenientes do eixo do TRPV4. No entanto, nessa parte desse experimento, o diferencial foi que as células foram pré-tratadas com o antagonista RN-1734 1h antes de incubar a TcdA ou TcdB. Com relação à amplificação dos demais genes citados no início dessa sessão se deu da mesma forma como já mencionado antes. Todas as reações foram realizadas com supermix iTaq universal Syber (BioRad). A expressão relativa de cada gene de interesse foi mensurada pelo método $\Delta\Delta Ct$. Os conjuntos de primers utilizados estão listados na tabela 2 abaixo.

Tabela 2 - Primers utilizados no qPCR.

<i>TRPV4</i>	
Forward	TCAAGTGCTCCCGCCTCTTC
Reverse	ACCTCCCGTCCGGATGATGTG
<i>IL-6</i>	
Forward	GCCAGAGTCATTCAGAGCAATA
Reverse	GTTGGATGGTCTTGGTCCTTAG
<i>IL1-β</i>	
Forward	AGCTTCAGGAAGGCAGTGTC
Reverse	CTCCACGGGCAAGACATAGG
<i>bcl-2</i>	
Forward	CAGCATGCGACCTCTGTTTG
Reverse	CAGGTATGCACCCAGAGTGA
<i>GAPDH</i>	
Forward	AGACAGCCGCATCTTCTTGT
Reverse	CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT

4.4.3 Avaliação da expressão protéica do TRPV4 e Caspase-3 clivada em CGEs por Western blotting

Para avaliar a expressão protéica do receptor TRPV4, a linhagem de CGEs (6×10^5 células/poço) foi distribuída em placas de 6 poços e incubadas com TcdA ou TcdB por 18h. Após a incubação, o sobrenadante foi removido e as células foram lisadas usando tampão de

lise da Thermo Fisher Scientific (RIPA – contém EDTA e inibidor de protease livre de fosfatase), centrifugadas (17 min, 4°C, 13000 rpm) e logo em seguida, o sobrenadante foi coletado. As concentrações de proteína foram determinadas através do ensaio de ácido bicinconínico de acordo com o protocolo do fabricante (Thermo Fisher Scientific).

Uma concentração de 40µg de proteína foi previamente preparada com tampão de amostra (Laemmil e β-mercaptoetanol) e essa por sua vez foi desnaturada a 95°C por 5 min, separadas em gel BIS-Tris 10% e transferidas para membranas de PVDF por 2 h. Após o bloqueio com solução de bloqueio a 5% (BioRad) à temperatura ambiente por 1 h, as membranas foram incubadas overnight com os anticorpos primários (anti-α-tubulina, Sigma, T8203, 1:500 e anti-TRPV4 1:2000, abcam39260) a 4°C sob agitação. No dia seguinte, as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários (anti-mouse 1:500 e anti-rabbit 1:500) por 2 h. Logo em seguida, as membranas foram lavadas em solução salina tamponada com Tris contendo 0,05% de Tween 20 (TSB-T) e depois incubadas com Enhanced Chemiluminescence – ECL (Biorad 1705060). O sinal de quimioluminescência foi detectado usando um sistema ChemiDoc (BioRad). A quantificação densitométrica das bandas foi realizada no software ImageLab (BioRad).

Em outro momento experimental diferente, repetindo todas as etapas do procedimento descrito acima, foi avaliado a expressão protéica de caspase-3 clivada (marcador de apoptose) em CGEs expostas a TcdA e TcdB na presença ou ausência do antagonista do TRPV4, ou seja, as células foram pré-tratadas com o RN-1734 1h (dose de 100 µM) antes de incubar as toxinas. Com relação aos anticorpos utilizados nessa segunda parte foram: anticorpos primários (β-actina 1:200, Santa Cruz sc-7210; anti-Caspase-3 ativada 1:400, millipore AB3623) e o anticorpo secundário (anti-rabbit 1:400).

4.4.4 Imunofluorescência para TRPV4, NFκBp65 e TNF-α em CGEs

A imunofluorescência foi realizada para avaliar a imunomarcação, ou seja, a presença do receptor TRPV4 em CGEs tratadas com TcdA ou TcdB e também o fator de transcrição NFκBp65 e a citocina TNF-α provenientes da via intracelular e que estão relacionadas com a ativação ou inibição do TRPV4. Nesse primeiro momento, as CGEs na presença das toxinas foram utilizadas para avaliar a imunomarcação para o TRPV4. Nesse sentido, as CGEs (4×10^4 células/poço) foram plaqueadas em placas de poliestireno com lamínulas e cultivadas em placas de 24 poços na presença das toxinas por um período de 18h de incubação. Após a incubação com as toxinas do *C. difficile*, as células foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% diluído em PBS por 30 min em temperatura ambiente e permeabilizadas

com 0,5% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) e 3% de albumina sérica bovina (BSA, Sigma) em PBS durante 10 min a 4°C. Em seguida, realizou-se o bloqueio com BSA a 5% em PBS durante 30 min em temperatura ambiente e depois as CGEs foram incubadas com anticorpo primário anti-TRPV4 (1:1000, abcam39260), overnight a 4°C. No dia seguinte, realizou-se três lavagens com PBS na presença de 0,01% de Tween20 (tampão de lavagem) e depois as CGEs foram incubadas por 2h em temperatura ambiente com anticorpo secundário conjugado com fluoróforo (Alexa Fluor 488, 1:400, Invitrogen). Após esse período, as amostras foram lavadas e as lâminas montadas com o reagente antifade ProLong Gold contendo DAPI (Thermo Scientific, P36931).

Já em outro período diferente, para avaliar o efeito do antagonista do TRPV4 (RN-1734) sobre a citocina TNF- α e também na translocação do fator de transcrição NF κ Bp65 para o núcleo em CGEs induzidas por TcdA e TcdB, as células foram incubadas com o RN-1734 uma hora antes da incubação com a TcdA e TcdB. Nessa parte desse experimento, foram utilizados os seguintes anticorpos: anticorpo primário anti-NF κ Bp65 (1:500, abcam 16502) e anti-TNF- α (1:500, abcam 6671) e o anticorpo secundário (Alexa Fluor 488, 1:400, Invitrogen). As demais etapas do procedimento prosseguiram da mesma forma como já descrito acima.

As amostras foram visualizadas tanto por microscopia de fluorescência confocal (LM710-Confocal-Zeiss) quanto por microscopia de fluorescência convencional (Zeiss). Para os grupos experimentais das proteínas TRPV4 e TNF- α foram adquiridas em média 10 imagens (quatro amostras por grupo) e a quantificação da intensidade média de fluorescência positiva foram mensuradas utilizando o software Zeiss. Já com relação à proteína NF κ Bp65 foram contadas 100 células e a porcentagem de células (%) com imunomarcagem nuclear positiva para NF κ Bp65 foram mensuradas.

4.4.5 Ensaio de Apoptose

Para avaliar apoptose em CGEs incubadas com TcdA ou TcdB, realizou-se um ensaio de apoptose em tempo real em células vivas conforme descrito pelo fabricante (ensaio em tempo real Glo-anexina V apoptose, Promega). Primeiramente, CGEs (10^4 células/poço) foram plaqueadas em placas brancas e opacas de 96 poços (Falcon). Após 24h, as células foram incubadas com TcdA (50 ng/mL) ou TcdB (1 ng/mL) isoladamente ou precedida por RN-1734 (100 μ M) em um período de incubação de 18h. Em seguida, adicionaram-se 200 μ L de reagente de detecção 2x (2 μ L do substrato de anexina NanoBit, 2 μ L CaCl₂, 2 μ L anexina V-SmBit e 2 μ L anexina V-LgBit em 1000 μ L de DMEM suplementado pré-aquecido a 37°C)

a cada poço, sendo incubadas a 37°C numa incubadora humidificada sob 5% CO₂ condição. A luminescência foi mensurada por meio de um luminômetro (*NanoLuc technology*, PROMEGA). Para a obtenção da unidade de luminescência relativa (ULR), o sinal de luminescência de todas as amostras foi subtraída pela luminescência intrínseca do reagente de detecção (poço apenas com DMEM suplementado sem células) e posteriormente realizada a razão com a média do controle.

4.5 Experimento *in vivo*

4.5.1 Aspectos éticos em pesquisa animal

Os experimentos realizados em camundongos C57BL/6 foram aprovados pela Comissão Institucional de Ética e Cuidados em Pesquisa Animal da *University of Virginia* (Uva, EUA) sob o protocolo 4096.

4.5.2 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6, machos, com idade de 8 semanas. Os camundongos C57BL/6 foram provenientes do laboratório Jackson. Os camundongos foram mantidos em gaiolas de polipropileno forradas com maravalha, trocada duas vezes por semana. Os animais permaneceram nas mesmas condições ambientais durante os experimentos (temperatura: 22°C ± 2°C, com exaustão de ar e ciclo de 12h claro/12h escuro) e com livre acesso a água e ração padrão.

4.5.3 Preparação da bactéria

A cepa de *C. difficile* VPI10463 (ATCC 43255) foi obtida da empresa ATCC (Coleção de Tipos de Culturas Americano). A VPI10463, que foi isolada a partir de uma ferida abdominal, é uma cepa do toxinótipo 0, ribotipo 087 e positiva para *tcdA* e *tcdB* e negativa para *cdtB*.

Para a preparação do inóculo, inicialmente, 100µL do estoque de *C. difficile* VPI10463 (em fase de esporo em caldo de carne picada, CCP) foi adicionado em CCP (10 mL). Para atingir um crescimento de fase log, a amostra foi incubada por 16h a 37°C. Em seguida, 1 mL desse cultivo foi transferido para um microtubo de 1,5 mL e centrifugado (10000 rpm por 2 min). Esse procedimento foi repetido cinco vezes para garantir ausência de toxinas no inóculo final. Para obter 10⁵ UFC (Unidades formadoras de colônia) de *C. difficile* VPI10463/100µL,

realizou-se uma diluição de 1:100 (bactéria em suspensão: CCP). A leitura de densidade óptica de 1,0 foi considerada ser equivalente a 10^8 unidades formadoras de colônias (UFC/ml).

Nos grupos infectados, 10^5 unidades formadoras de colônia (UFC) de *C. difficile* VPI10463 foram inoculadas por gavagem para cada animal e para os animais não infectados foi injetado CCP.

4.5.4 Modelo de Infecção por *C. difficile* (CDI)

O modelo de CDI murino é amplamente utilizado na pesquisa por proporcionar achados semelhantes ao encontrado na clínica médica como é o caso de diarreia grave e perda de peso apresentada por humanos. Nesse sentido, o modelo foi realizado conforme descrito anteriormente (MOORE *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2008). Inicialmente, os camundongos C57BL/6 (n = 6 para cada grupo) foram pré-tratados por três dias (1º, 2º e 3º dia do protocolo experimental) com gentamicina (0,035 mg/mL), colistina (850 U/mL), metronidazol (0,215 mg/mL) e vancomicina (0,045 mg/mL) que foram adicionados a água de beber dos animais. Após 48h do pré- tratamento (6º dia do protocolo experimental), os camundongos receberam clindamicina (32 mg/kg) por via subcutânea. Após 24h da administração de clindamicina, os camundongos receberam 10^5 UFC da forma vegetativa de *C. difficile* VPI10463 em CCP por gavagem (7º dia do protocolo experimental). Ao grupo controle foi administrado apenas CCP. O peso e o desenvolvimento dos sintomas da doença de cada animal foram monitorizados diariamente. Animais que ficaram moribundos ou perderam > 20% do peso corporal foram eutanasiados.

Os animais foram eutanasiados no 10º dia do protocolo experimental como pode ser observado na figura 11, que corresponde justamente o pico de infecção, para obtenção dos segmentos do ceco e cólon para a realização da imunohistoquímica.

4.5.5 Grupos experimentais para o modelo de infecção por *C. difficile* (CDI)

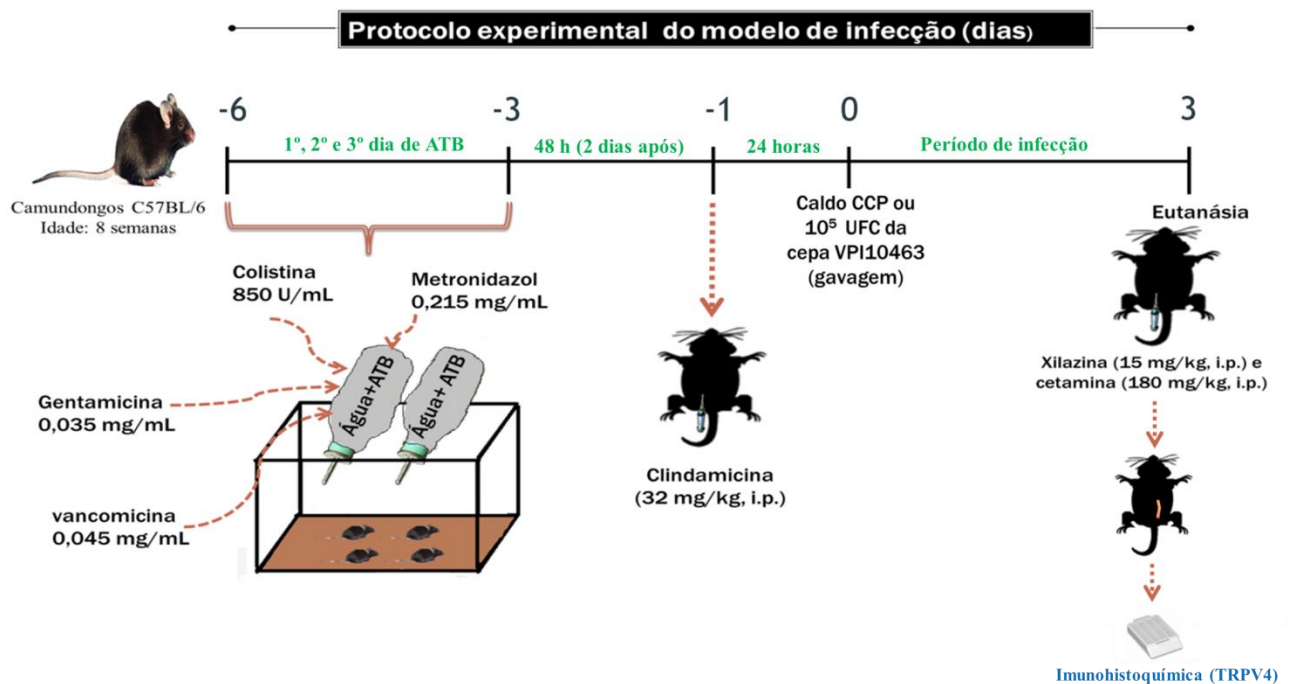
Os camundongos submetidos ao modelo de infecção por *C. difficile* foram divididos em dois grupos:

- ✓ **Grupo controle (n=6)**: camundongos C57BL/6 submetidos ao mesmo protocolo experimental dos animais infectados por *C. difficile* até o 6º dia do protocolo, porém receberam apenas CCP por gavagem no 7º dia do protocolo experimental (dia zero da infecção).

- ✓ **Grupo infectado por *C. difficile* (CDI) (n=6)**: camundongos C57BL/6 submetidos ao modelo de CDI, recebendo 10^5 UFC de *C. difficile* VPI10463 no 7º dia do protocolo experimental (dia zero da infecção).

Os animais foram eutanasiados no 10º dia do protocolo experimental com cetamina e xilazina (180 e 15 mg/kg, i.p.), conforme demonstrado na figura 11.

Figura 12 – Esquema de indução do modelo de CDI e protocolo experimental.



Fonte: Adaptado de Loureiro *et al.* (2022). Abreviações: CCP= caldo carne picada; i.p. = intraperitoneal; ATB= antibióticos.

4.6 Análise estatística

Todos os resultados quantitativos obtidos nessa pesquisa foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM).

A análise estatística dos dados foi realizada por meio do software *GraphPad Prism*, versão 5,0. Para a realização da análise estatística entre os grupos foram utilizados os seguintes testes: Teste t de Student para comparar dois grupos; teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

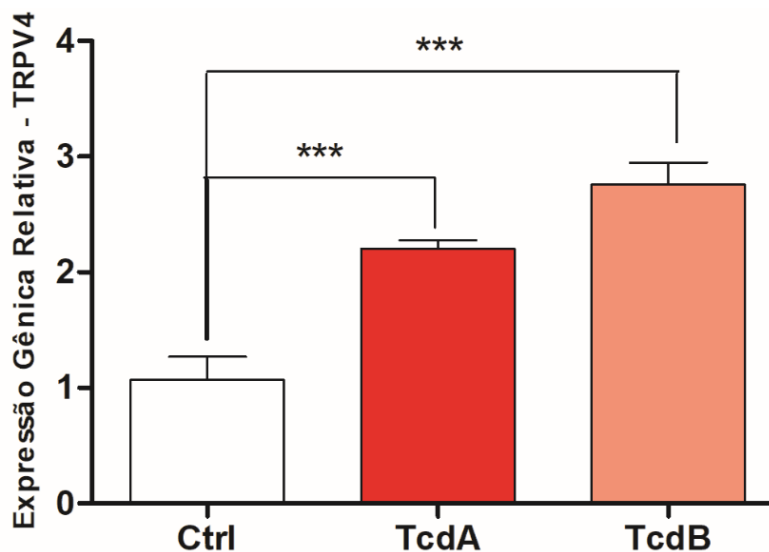
Com relação ao nível de significância adotado neste estudo foi de 0,05 ($\alpha = 5\%$) e níveis descritivos (p) inferiores a esse valor foram considerados significantes.

5 RESULTADOS

5.1 Efeito da TcdA e TcdB na expressão gênica e protéica do TRPV4 em CGEs

Sabe-se que as CGEs são essenciais para manter a homeostase do trato gastrintestinal (TGI) e que o TRPV4 é expresso e funcional em células epiteliais intestinais, participando dessa maneira do processo inflamatório do TGI (OCHOA-CORTES *et al*, 2016; D'ALDEBERT *et al*, 2011). Nesse sentido, foi questionado se as CGEs expressavam o receptor TRPV4 e se a TcdA e TcdB do *C. difficile* eram capazes de aumentar a expressão gênica e protéica desse receptor nessas células. Então, como pode ser observado na figura 13, tanto a TcdA quanto TcdB aumentaram significativamente ($p < 0,0001$) a expressão gênica do TRPV4 nas CGEs quando comparado ao grupo controle (Ctrl – CGEs incubadas apenas com DMEM) no tempo de incubação de 18h com as toxinas.

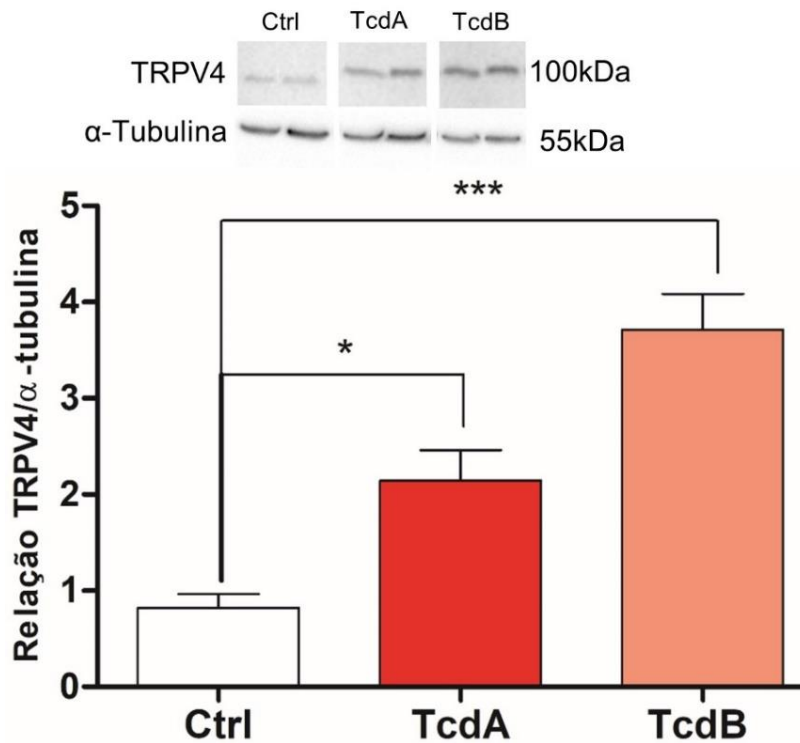
Figura 13 – TcdA e TcdB aumentam a expressão gênica do TRPV4 em CGEs.



Efeito da TcdA (50 ng/mL) e da TcdB (1 ng/mL) na expressão gênica do TRPV4 em CGEs. A expressão gênica do TRPV4 foi avaliada por qPCR em EGCs incubadas por um período de 18h com as toxinas. Os dados são apresentados como média ± EPM (n=5) da expressão gênica relativa do TRPV4. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Tukey. *** $p < 0,0001$.

Considerando que a TcdA e TcdB aumentaram a expressão gênica do TRPV4, então verificou se as toxinas também eram capazes de aumentar os níveis protéicos do receptor nas CGEs. Essa análise foi realizada através da técnica de Western blotting que revelou que ambas as toxinas conseguiram também aumentar de forma expressiva e significativa os níveis protéicos do TRPV4 nas CGEs no tempo de incubação de 18h quando comparado ao grupo controle, como pode ser observado na figura 14.

Figura 14 – TcdA e TcdB aumentam os níveis protéicos do TRPV4 em CGEs.



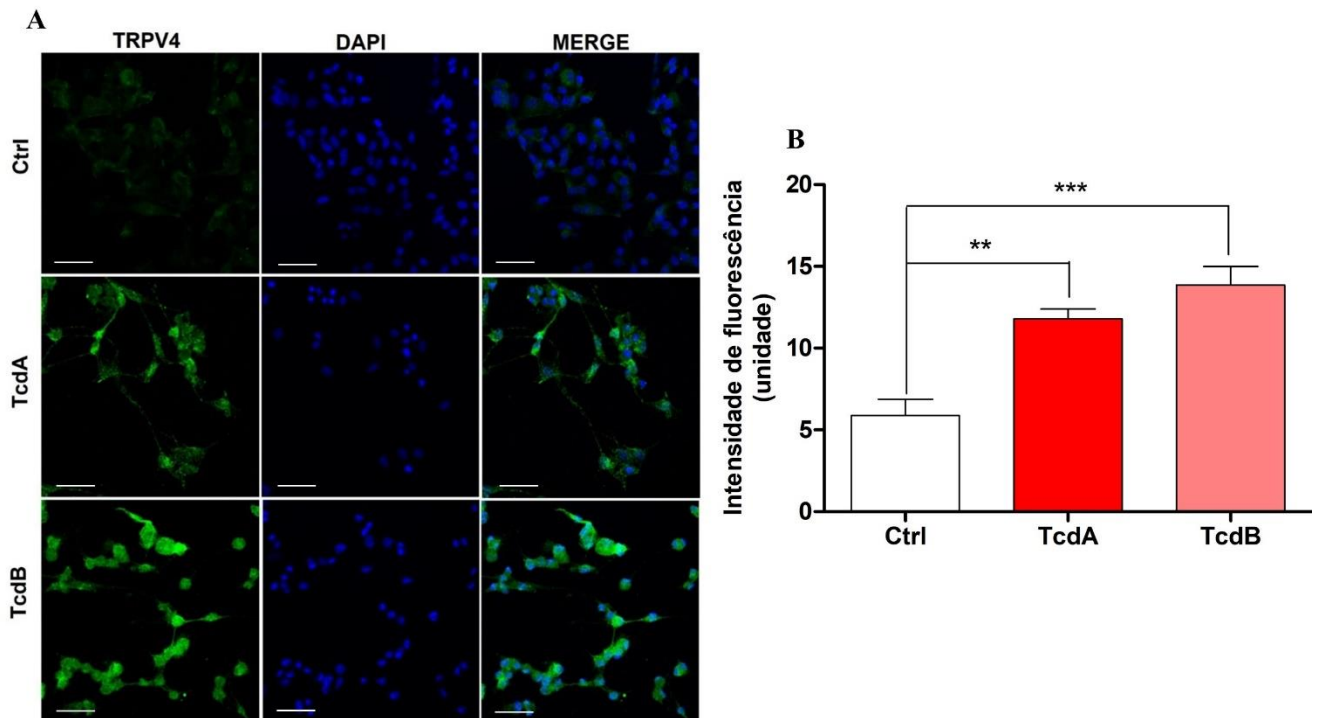
TcdA (50 ng/mL) e TcdB (1 ng/mL) aumentam a expressão protéica do TRPV4 em CGEs em um período de incubação de 18h. Os níveis protéicos do receptor nas CGEs foram avaliados por Western Blotting. Os dados são apresentados como média \pm EPM (n=5) da expressão proteica do TRPV4 relativo a α -tubulina. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Tukey. * $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.

5.2 TcdA e TcdB aumentam a imunomarcção citoplasmática do TRPV4 em CGEs

Com base nos resultados anteriores, pode ser observado na figura 15-A a presença da imunomarcção citoplasmática do receptor TRPV4 nas CGEs em condições basais (demonstrado em verde), o que mostra mais uma vez que as CGEs expressam o determinado receptor em estudo. No entanto, quando as CGEs foram expostas tanto a TcdA quanto a TcdB houve um aumento da imunomarcção desse receptor quando comparado ao grupo controle.

Em consonância com esses dados qualitativos, ao quantificar a intensidade de fluorescência da imunomarcção do TRPV4, observou-se que a TcdA e a TcdB aumentam de forma significativa os níveis do TRPV4 em CGEs quando comparado ao grupo controle (figura 15-B).

Figura 15 – TcdA e TcdB aumentam quali e quantitativamente a imunomarcção do TRPV4 em CGEs.



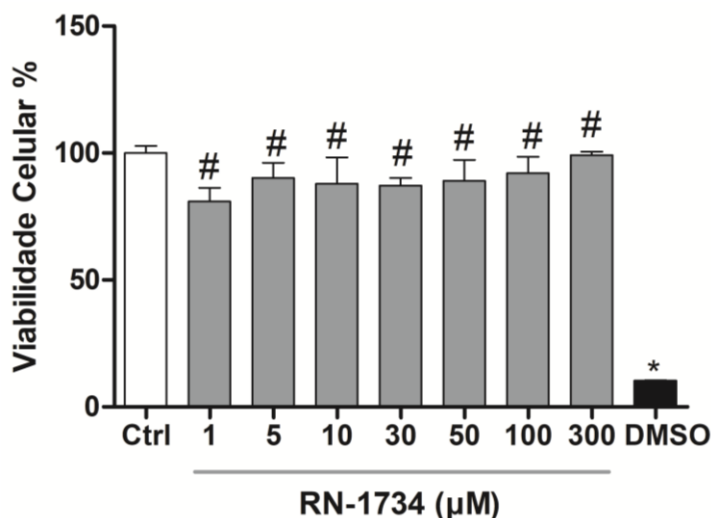
TcdA (50 ng/mL) e TcdB (1 ng/mL) aumentam a imunomarcção do TRPV4 em EGCs. A imunomarcção do TRPV4 foi avaliada por imunofluorescência em EGCs incubadas com TcdA, TcdB ou apenas meio de cultivo (grupo controle) por 18h. (A) representa a análise qualitativa da imunomarcção do TRPV4 em EGCs, sendo que as fotomicrografias destacam a imunocoloração citoplasmática do TRPV4 (verde) e da coloração nuclear com DAPI (azul). (B) representa a quantificação da intensidade média de fluorescência da imunocoloração do TRPV4 em CGEs que foi mensurada utilizando o software Zeiss. Os dados são apresentados como média \pm EPM da intensidade de fluorescência da imunomarcção do TRPV4. A sobreposição das imagens (MERGE) encontra-se nos painéis a direita, sendo que todos os painéis foram obtidos na escala de 50 μ m. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Tukey. ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.

5.3 Viabilidade das CGEs expostas ao antagonista do TRPV4

Para identificar a melhor concentração do antagonista RN-1734 do canal TRPV4 para realizar os demais experimentos envolvendo essa via de ativação, foi avaliada a viabilidade das CGEs expostas a diferentes concentrações do RN-1734 por 18h de incubação. A viabilidade celular foi determinada por meio do ensaio de MTT.

Nesse aspecto, todas as concentrações testadas (1, 5, 10, 30, 50, 100 e 300 μ M) foram viáveis por não apresentarem diferença estatística com relação ao grupo controle e por sua vez serem estatisticamente diferentes do grupo DMSO (controle de morte). Então, foi escolhida a concentração de 100 μ M para a execução dos demais experimentos (Figura 16).

Figura 16 – Efeito do antagonista do TRVP4 (RN-1734) na viabilidade das CGEs.



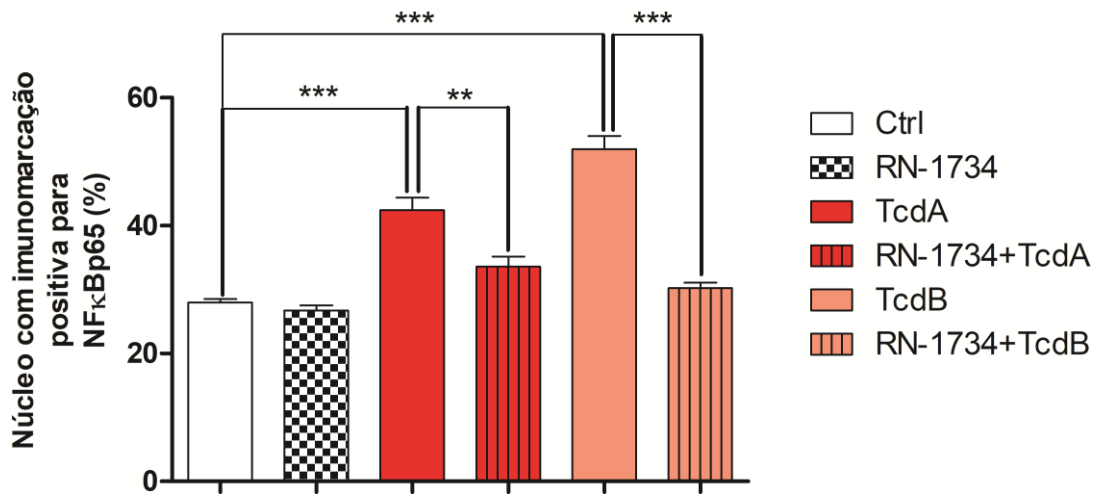
Ensaio da viabilidade celular realizado em CGEs incubadas com RN-1734 (1, 5, 10, 30, 50, 100 e 300µM), apenas com meio de cultura (grupo controle) ou com DMSO (grupo controle de morte) por 18h. A viabilidade celular foi determinada por meio do ensaio de MTT. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Tukey. * $p < 0,0001$ versus o grupo controle e # $p < 0,0001$ versus o grupo DMSO.

5.4 Efeito do antagonista do TRPV4 na translocação do NFκBp65 e no TNF-α em CGEs induzidas por TcdA e TcdB

De acordo com Costa e colaboradores (2021), tanto a TcdA quanto a TcdB ativam o fator de transcrição NFκB em CGEs e sua ativação regula a transcrição de citocinas pró-inflamatórias, por exemplo, IL-6. Nesse contexto, por meio da imunofluorescência analisou se o antagonista do TRPV4 (RN-1734) era capaz de bloquear a translocação nuclear do fator de transcrição NFκBp65 em CGEs expostas a TcdA e TcdB.

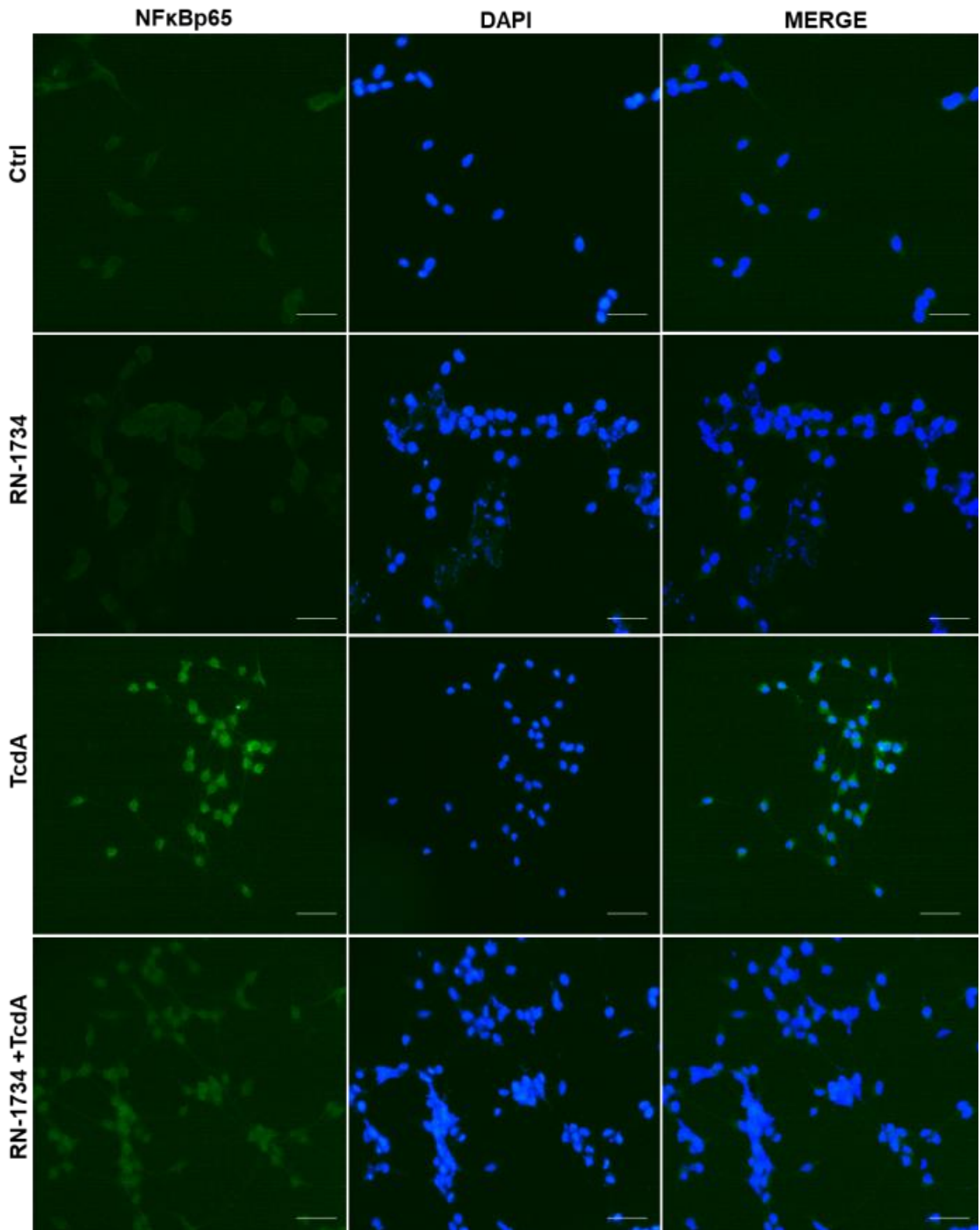
Ao efetuar a contagem das CGEs com núcleo positivo para NFκBp65, observou-se que tanto a TcdA quanto a TcdB aumentaram significativamente o número de células com núcleo positivo para esse fator de transcrição quando comparado ao grupo controle (figura 17). Por outro lado, o antagonista do TRPV4 reverteu de forma significativa comparado às toxinas a translocação de NFκBp65 para o núcleo das CGEs (figura 17). Notavelmente, esses achados podem ser melhor visualizados nas figuras 18 e 19, sendo que na ausência das toxinas algumas CGEs apresentaram translocação de NFκBp65 para o núcleo das células. Enquanto que na presença de TcdA e TcdB observou um aumento relevante de células com translocação nuclear desse fator de transcrição. Então, esses achados sugerem que TcdA e TcdB ativam o NFκB através do TRPV4, já que o bloqueio desse canal pelo antagonista resultou numa translocação diminuída desse fator comparado as toxinas.

Figura 17 – Antagonista do receptor TRPV4 diminui quantitativamente a translocação nuclear do NFκBp65 em CGEs induzidas por TcdA e TcdB do *C. difficile*.



RN-1734, antagonista do TRPV4, reverte a translocação nuclear do NFκBp65 em CGEs induzidas por TcdA e TcdB. Esse dado representa uma análise quantitativa da porcentagem de CGEs com imunomarcção positiva para NFκBp65 no núcleo das células após 18h de incubação com TcdA (50ng/mL), TcdB (1ng/mL), apenas as CGEs com DMEM (grupo controle - Ctrl), RN-1734 sozinho, RN-1734 mais TcdA ou RN-1734 mais TcdB. O antagonista do TRPV4 na presença das toxinas diminuiu de forma significativa a translocação nuclear do NFκBp65 em CGEs comparado as toxinas. Os dados são apresentados como média ± EPM da porcentagem de núcleos com imunomarcção positiva para o NFκBp65. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Tukey. **p<0,001 e ***p<0,0001.

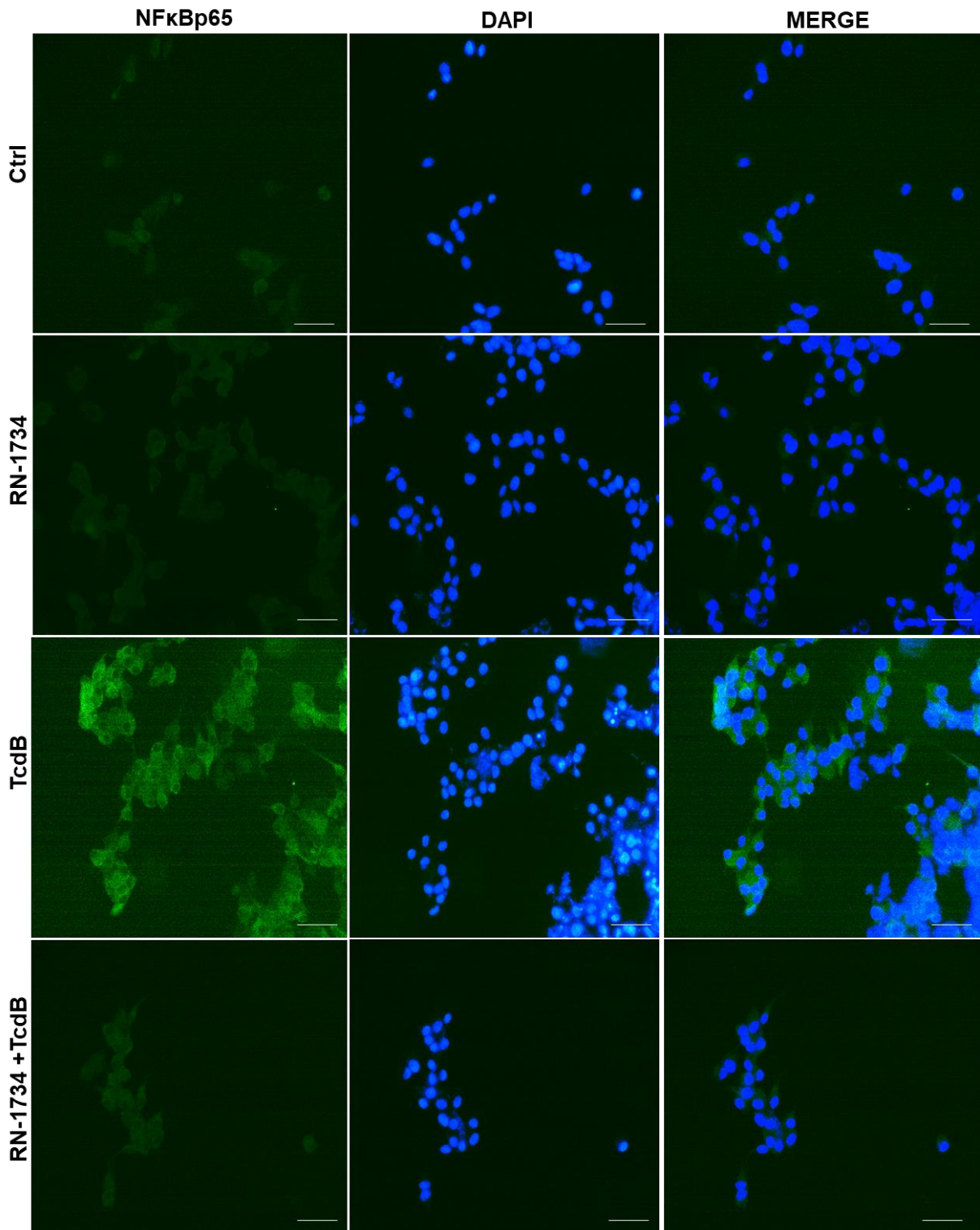
Figura 18 – Antagonista do TRPV4 diminui a translocação nuclear do NFκBp65 em CGEs induzida por TcdA do *C. difficile*.



RN-1734, antagonista do TRPV4, reverte a translocação nuclear do NFκBp65 em CGEs induzida por TcdA do *C. difficile*. Esse dado demonstra uma imunomarcagem da translocação nuclear do NFκBp65 em CGEs, que foi exposta a TcdA (50ng/mL), ao RN-1734 sozinho, ao RN-1734 mais TcdA por 18h. Pode ser observado nesses painéis que o antagonista do TRPV4 na presença da TcdA diminuiu de forma significativa a translocação nuclear do NFκBp65 nas células gliais comparado a TcdA. Fotomicrografia representativa da imunofluorescência para

NFκBp65 (em verde) e da coloração nuclear com DAPI (em azul). A sobreposição das imagens (MERGE) encontra-se nos painéis a direita, sendo que todos os painéis foram obtidos na escala de 50μm.

Figura 19 – Antagonista do TRPV4 diminui a translocação nuclear do NFκBp65 em CGEs induzida por TcdB do *C. difficile*.



RN-1734, antagonista do TRPV4, reverte a translocação nuclear do NFκBp65 em CGEs induzida por TcdB do *C. difficile*. Esse dado demonstra uma imunomarcagem da translocação nuclear do NFκBp65 em CGEs, que foi

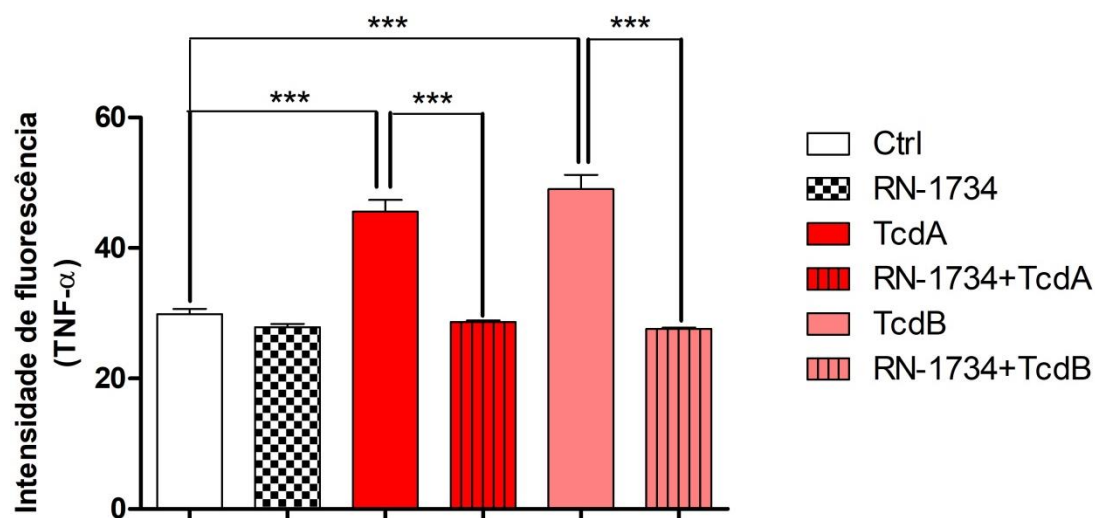
exposta a TcdB (50ng/mL), ao RN-1734 sozinho, ao RN-1734 mais TcdB por 18h. Pode ser observado nesses painéis que o antagonista do TRPV4 na presença da TcdB diminuiu de forma significativa a translocação nuclear do NFκBp65 nas células gliais comparado a TcdB. Fotomicrografia representativa da imunofluorescência para NFκBp65 (em verde) e da coloração nuclear com DAPI (em azul). A sobreposição das imagens (MERGE) encontra-se nos painéis a direita, sendo que todos os painéis foram obtidos na escala de 50µm.

Sabe-se que as CGEs respondem a sinais imunomoduladores, como as citocinas pró-inflamatórias (IL-1β, TNF-α, IL-4) e produtos bacterianos (LPS). Quando essas células são ativadas passam a secretar algumas citocinas como é o caso do próprio TNF-α e quimiocinas (CCL20), podendo ocasionar inflamação e danos neuronais (CHOW; GULBRANSEN, 2017; COSTA *et al.*, 2021). Nesse sentido, avaliou por meio da imunofluorescência se o antagonista do TRPV4 era capaz de reverter o aumento da expressão de TNF-α induzida por TcdA e TcdB em CGEs.

Conforme apresentado nas figuras 20, 21 e 22, tanto TcdA quanto a TcdB aumentaram quali e quantitativamente de forma significativa a imunomarcção (intensidade média de fluorescência) para o TNF-α quando comparado ao grupo controle (Ctrl) (figura 20). Já o RN-1734 foi capaz de diminuir de maneira significativa a intensidade de fluorescência da imunomarcção para essa citocina pró-inflamatória induzida pelas toxinas em CGEs a níveis praticamente iguais ao grupo controle.

Então, em conjunto esses dados indicam que o TRPV4 presente nas CGEs ao ser ativado por TcdA e TcdB do *C. difficile*, exerce um papel pró-inflamatório e o seu bloqueio proporciona um efeito anti-inflamatório.

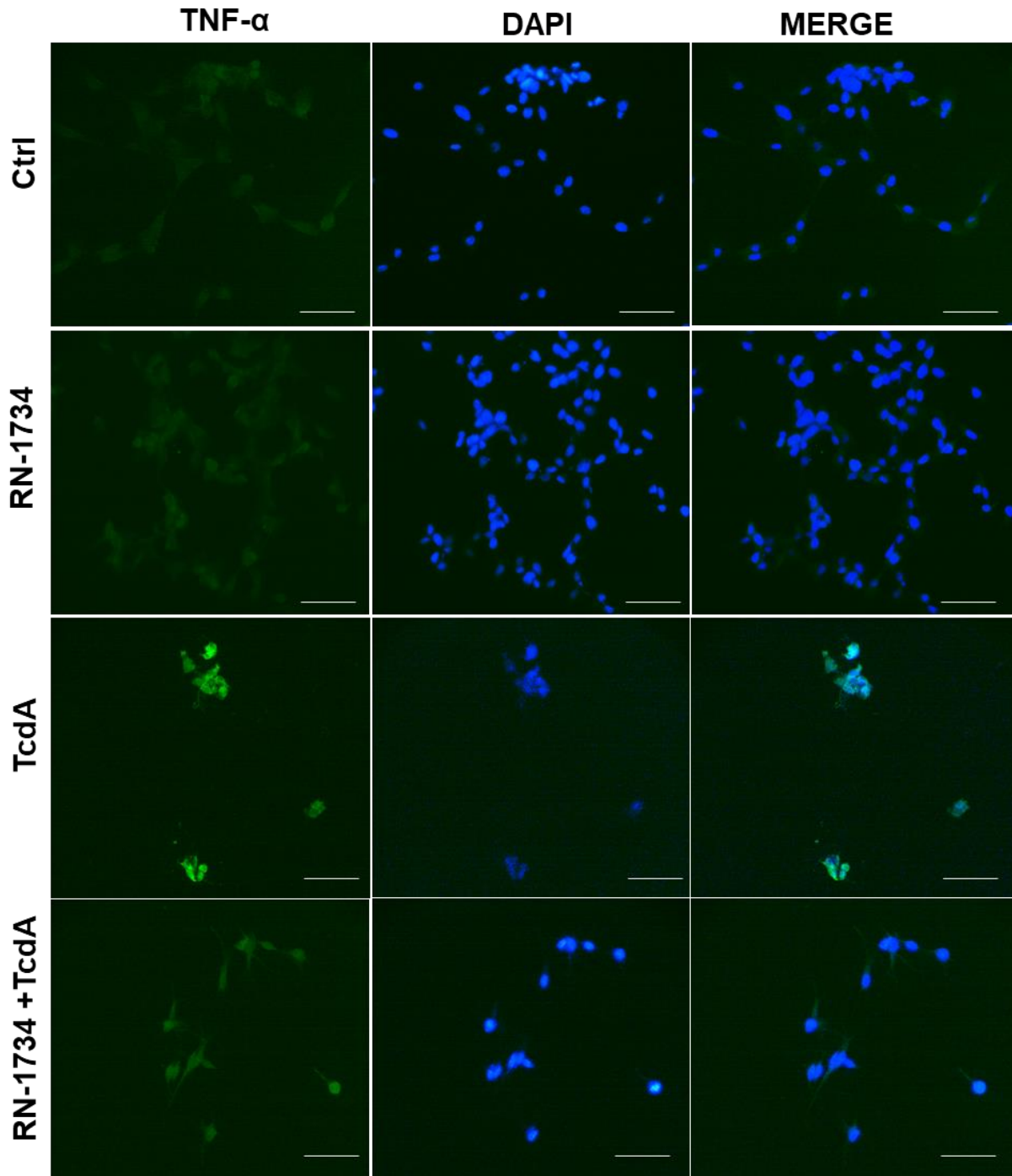
Figura 20 – Antagonista do TRPV4 diminui quantitativamente a expressão de TNF-α em CGEs induzidas por TcdA e TcdB do *C. difficile*.



Antagonista do TRPV4 diminui de forma significativa a imunomarcção do TNF-α em CGEs induzidas por TcdA e TcdB. Esse dado representa uma análise quantitativa da fluorescência para o TNF-α nas CGEs apenas

com DMEM (grupo controle - Ctrl) e nas mesmas células após 18h de incubação com TcdA (50ng/mL), TcdB (1ng/mL), RN-1734 sozinho, RN-1734 mais TcdA ou RN-1734 mais TcdB. O RN-1734 diminui a imunomarcação da citocina pr -inflat ria TNF- α em CGEs a níveis iguais ao grupo controle. Os dados são apresentados como média \pm EPM da intensidade média de fluorescência para o TNF- α . Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Tukey. ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.

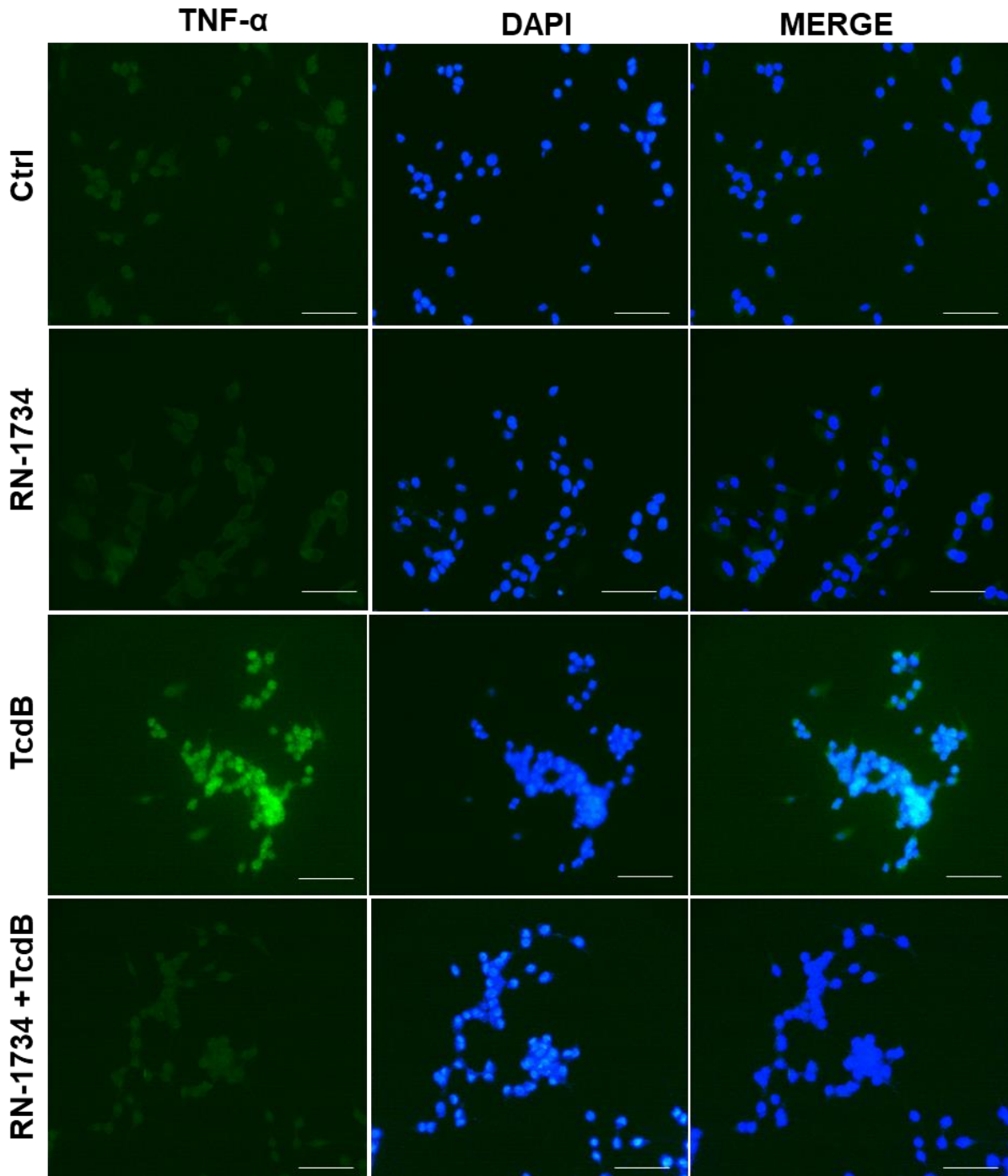
Figura 21 – Antagonista do TRPV4 diminui a imunomarcação para TNF- α em CGEs expostas a TcdA do *C. difficile*.



Antagonista do TRPV4 diminui a imunomarcação para TNF- α em CGEs exposta por TcdA. Esse dado representa uma análise qualitativa da fluorescência para o TNF- α nas CGEs apenas com DMEM (grupo controle

- Ctrl) e nas mesmas células após 18h de incubação com TcdA (50ng/mL), RN-1734 sozinho e RN-1734+TcdA. Observa-se que o RN-1734 incubado previamente antes da TcdA diminuiu de forma significativa a expressão da citocina pró-inflamatória TNF- α em CGEs a níveis quase semelhante ao grupo controle. Fotomicrografia representativa da imunofluorescência para TNF- α (em verde) e da coloração nuclear com DAPI (em azul). A sobreposição das imagens (MERGE) encontra-se nos painéis a direita, sendo que todos os painéis foram obtidos na escala de 50 μ m.

Figura 22 – Antagonista do TRPV4 diminui a imunomarcação para TNF- α em CGEs expostas a TcdB do *C. difficile*.



Antagonista do TRPV4 diminui a imunomarcação para TNF- α em CGEs exposta por TcdB. Esse dado representa uma análise qualitativa da fluorescência para o TNF- α nas CGEs apenas com DMEM (grupo controle

- Ctrl) e nas mesmas células após 18h de incubação com TcdB (1ng/mL), RN-1734 sozinho e RN-1734+TcdB. Observa-se que o RN-1734 incubado previamente antes da TcdB diminuiu de forma significativa a expressão da citocina pró-inflamatória TNF- α em CGEs a níveis quase semelhante ao grupo controle. Fotomicrografia representativa da imunofluorescência para TNF- α (em verde) e da coloração nuclear com DAPI (em azul). A sobreposição das imagens (MERGE) encontra-se nos painéis a direita, sendo que todos os painéis foram obtidos na escala de 50 μ m.

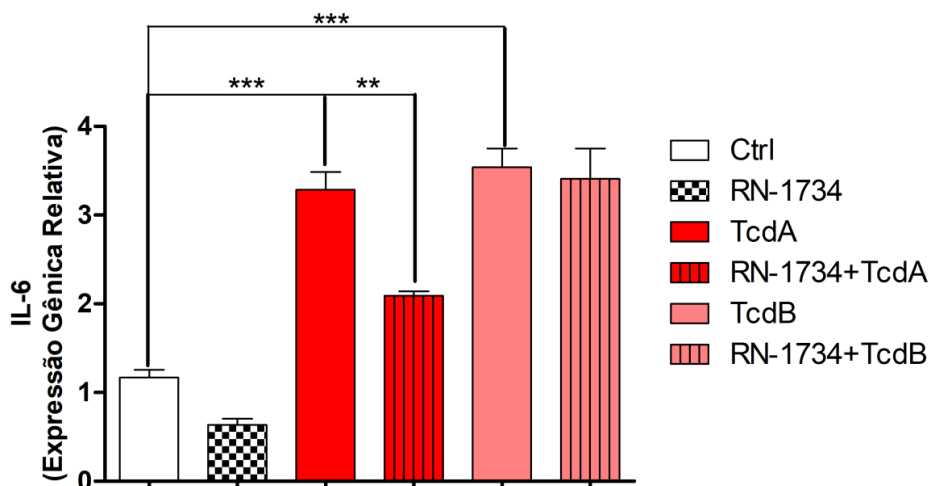
5.5 Efeito do antagonista do TRPV4 na expressão da citocina IL-6 e IL-1 β em CGEs induzidas por TcdA e TcdB

Estudos têm demonstrado que as CGEs quando ativadas passam a liberar citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6), quimiocinas (CXCL10) e outros mediadores como o óxido nítrico (NO) e a proteína S100B (CIRILLO *et al.*, 2011; LIU; YANG, 2022). Além disso, já foi demonstrado por nosso grupo de pesquisa que a TcdA e TcdB do *C. difficile* estimulam a expressão dessas citocinas, o que faz com que as CGEs atuem na resposta imunoinflamatória (COSTA *et al.*, 2021; LOUREIRO *et al.*, 2022).

Nesse aspecto, foi investigado se o bloqueio do receptor TRPV4 pelo seu antagonista (RN-1734) era capaz de diminuir a expressão gênica de IL-6 e IL-1 β em CGEs expostas a TcdA e TcdB. Como pode ser observado na figura 23, RN-1734 conseguiu diminuir de maneira significativa a nível gênico a expressão da IL-6 nas células gliais induzida pela TcdA, porém não foi capaz de reduzir a expressão gênica dessa citocina pleiotrópica induzida pela TcdB ao comparar os grupos expostos apenas à TcdA ou à TcdB.

Já com relação à interleucina IL-1 β , tanto a TcdA e TcdB aumentaram a expressão gênica desse mediador inflamatório nas CGE quando comparado ao grupo controle, porém o antagonista do TRPV4 na presença das toxinas não conseguiu reverter de forma significativa o aumento de expressão de IL-1 β induzida pela TcdA e TcdB (dados não mostrado).

Figura 23 – Antagonista do TRPV4 diminui a expressão gênica de IL-6 em CGEs exposta a TcdA, mas não pela TcdB.



Antagonista do TRPV4 diminui a expressão gênica da *IL-6* em CGEs induzida por TcdA (50ng/mL), mas não pela TcdB (1ng/mL) por um período de incubação de 18h. Expressão gênica de *IL-6* nas células gliais foi avaliado por qPCR. Os dados são apresentados como média \pm EPM (n=6) da expressão gênica relativa da *IL-6*. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Tukey. **p<0,001 e ***p<0,0001.

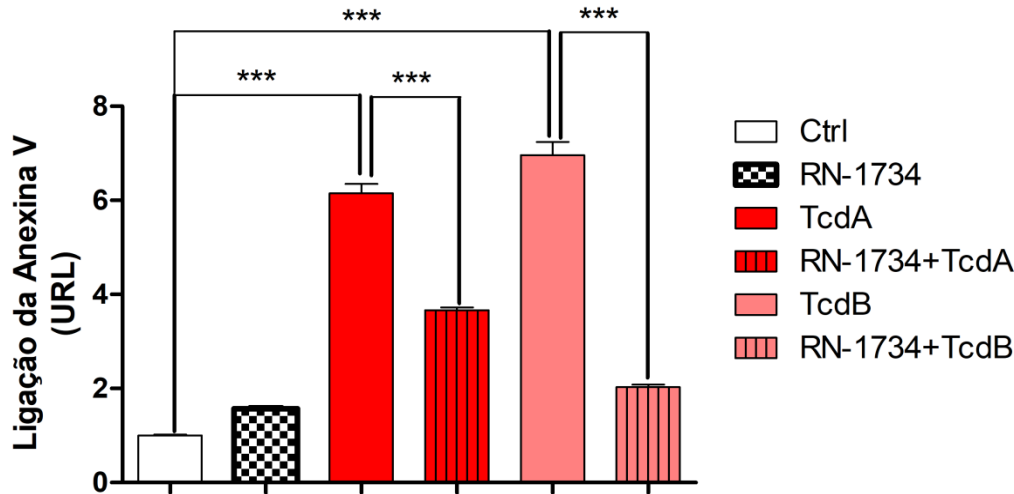
5.6 Efeito antiapoptótico do antagonista do TRPV4 em CGEs induzidas por TcdA e TcdB

Já é comprovado na literatura por vários pesquisadores que tanto a TcdA quanto a TcdB ocasionam apoptose (morte celular) em CGEs e também em outros tipos de células como, por exemplo, neurônios entéricos, enterócitos, células imunológicas e células nervosas (BRITO *et al.*, 2002a; MODI *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2022; COSTA *et al.*, 2022b). Vale destacar que a regulação e a execução da apoptose é atribuída principalmente a duas grandes famílias, sendo elas: a Bcl-2 (antiapoptótico) e as Caspases (proteases que quando ativadas irão desencadear a apoptose) (BRITO *et al.*, 2002a; FETTUCCIARI *et al.*, 2023). Dessa forma, investigou-se o efeito antiapoptótico do RN-1734, antagonista do TRPV4, em CGEs expostas às toxinas por meio do ensaio em tempo real Glo-anexina V apoptose e também pela expressão protéica de caspase-3 ativada e expressão gênica de *bcl-2* (gene relacionado à sobrevivência da célula).

O ensaio da anexina V é um método de luminescência em tempo real que permite detectar células em processo de morte celular (figura 24), isso só é possível por conta que a proteína anexina V se liga avidamente à fosfatidilserina que se expressa na camada externa da membrana celular de células apoptóticas formando um conjugado (anexina V+fosfatidilserina) e é esse conjugado que vai indicar quais células estão sofrendo morte celular (apoptose).

Então, podemos observar na figura 24 que tanto a TcdA e TcdB aumentam de forma significativa a morte celular das CGEs quando comparado ao grupo controle, ou seja, ambas toxinas aumentaram a formação desse conjugado apoptótico. Por outro lado, o antagonista do TRPV4 (RN-1734) reduziu de maneira significativa a morte celular das CGEs expostas a TcdA e TcdB, o que resultou na diminuição da exposição da fosfatidilserina para a camada externa da membrana celular, o que ocasionou na redução da formação deste conjugado apoptótico.

Figura 24 – Antagonista do TRPV4 diminui a morte celular induzida por TcdA e TcdB em CGEs.



A apoptose foi avaliada por meio do ensaio em tempo real Glo-anexina V em CGEs incubadas com TcdA (50 ng/mL) e TcdB (1ng/mL) por 18h, na presença ou ausência do antagonista do TRPV4 (RN-1734 -100 μ M). Observa-se que o RN-1734 incubado previamente antes da TcdA ou TcdB reduziu de forma significativa a morte celular em CGEs quando comparado as toxinas. O grupo controle consiste em CGEs incubadas apenas com meio de cultivo. Os dados são apresentados como média \pm EPM (n=5). A unidade de luminescência relativa (ULR) é proporcional à quantidade de ligação da fosfatidilserina-anexina V. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Tukey. ***p<0,0001.

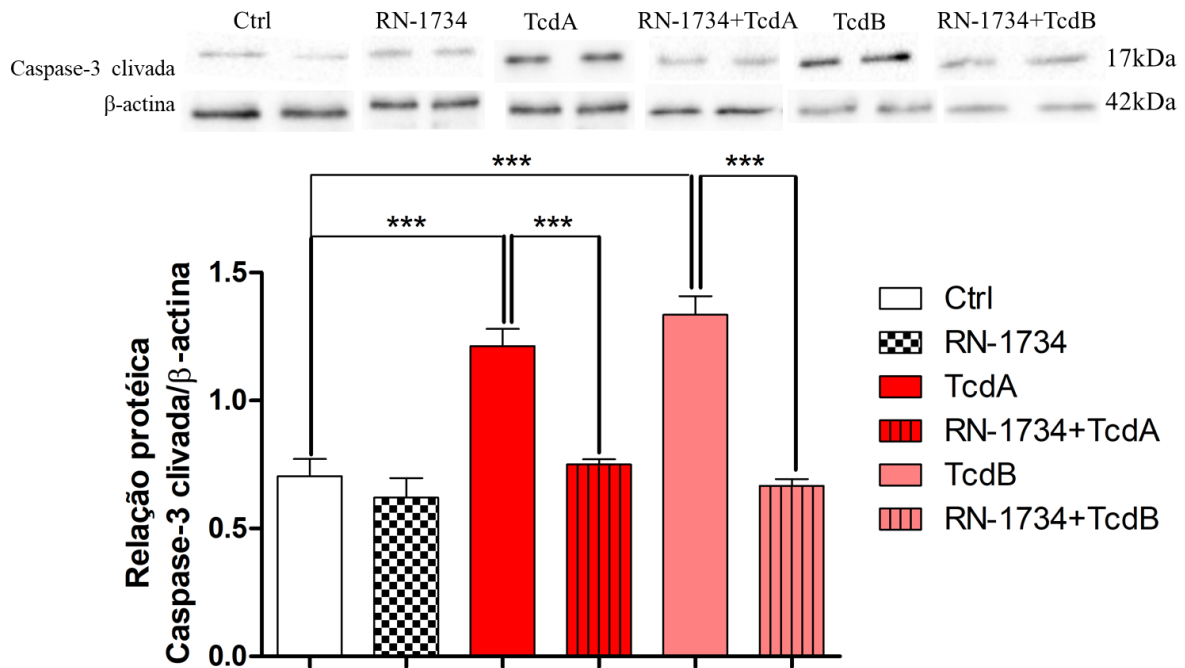
Com relação ao resultado da caspase-3 ativada ou clivada (figura 25), já é conhecido pela comunidade científica que as caspases fazem parte de uma grande família de proteases que são cruciais na inflamação (caspases inflamatórias) e na apoptose (caspases iniciadoras e efetora) (ESKANDARI; EAVES, 2022). Dentre as caspases iniciadoras temos: as caspase-2, -8, -9 e -10, no qual estímulos apoptóticos desencadeiam sua ativação que então clivam e ativam assim as caspases efetoras (caspase-3, -6 e -7) (ESKANDARI; EAVES, 2022).

Entre as caspases efetoras, a caspase-3 é uma protease, que catalisa a clivagem específica de muitas proteínas celulares tornando-se, assim, essencial para certos processos associados ao dismantelamento da célula e, conseqüentemente, para a formação de corpos apoptóticos. Vale ressaltar que a apoptose é uma forma de morte celular programada que é regulada tanto pela família de proteínas Bcl-2 quanto também pela família das caspases (BRENTNALL *et al.*, 2013; ESKANDARI; EAVES, 2022).

Dessa forma, para verificar se o antagonista do TRPV4 (com efeito antiapoptótico já demonstrado anteriormente) era capaz também de inibir a ativação de caspase-3 induzida por TcdA e TcdB em CGEs e assim prevenir a morte celular dessas células, então, utilizou-se da técnica do Western blotting. Como pode ser observado na figura 25, tanto a TcdA quanto a

TcdB aumentaram de maneira acentuada e significativa a expressão protéica de caspase-3 ativada em CGEs quando comparado ao grupo controle. Já o antagonista do TRPV4 reduziu a expressão da forma ativa de caspase-3 em CGEs expostas a TcdA e TcdB.

Figura 25 – Antagonista do TRPV4 reduz a ativação de caspase-3 induzida por TcdA e TcdB em CGEs



Antagonista do TRPV4 reduz a expressão protéica de caspase-3 clivada induzida por TcdA e TcdB em CGEs detectada por meio da técnica de Western Blotting. As CGEs foram incubadas com TcdA (50ng/mL) e TcdB (1 ng/mL) por 18h, na presença ou ausência do RN-1734 (100 μ M), um antagonista do TRPV4. O grupo controle são CGEs incubadas apenas com meio de cultivo. Os dados são apresentados como média \pm EPM (n=4) da expressão protéica de Caspase-3 clivada relativo à β -actina. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Tukey. ***p<0,0001.

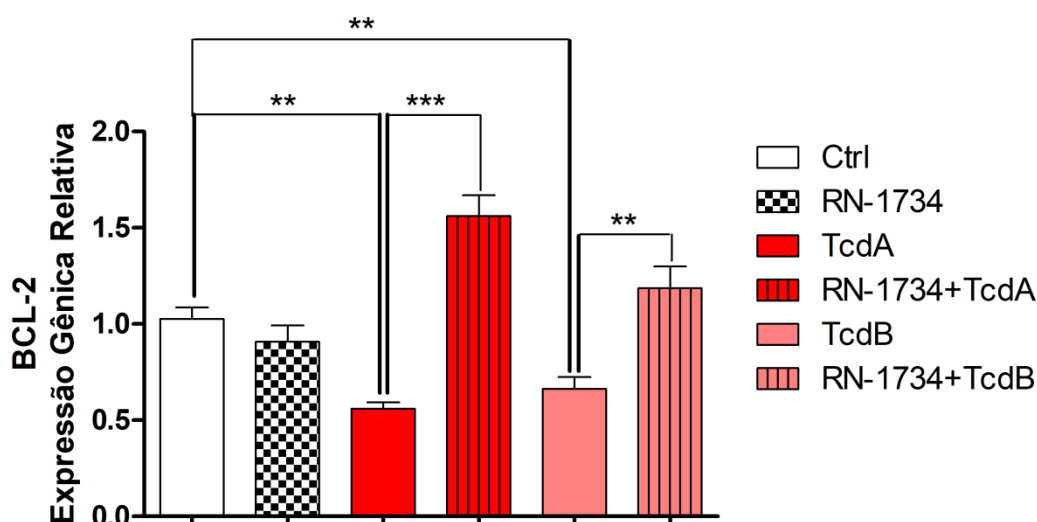
Como já mencionado anteriormente, a apoptose é regulada por várias proteínas, em particular membros da família do linfoma de células B antiapoptótico 2 (Bcl-2), que são conhecidas há muito tempo como supressores de apoptose e também pelos componentes da via das caspases (BRENTNALL *et al.*, 2013; ESKANDARI; EAVES, 2022). Além disso, já é bem estabelecido na literatura que tanto a TcdA quanto a TcdB do *C. difficile* são capazes de induzir a apoptose celular *in vitro* e *in vivo*, sendo que a superexpressão das proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e Bcl-X_L em células T84 inibe a morte celular induzida por TcdA do *C. difficile* (MATTE *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2022; SANTOS *et al.*, 2022).

Nesse sentido, investigou se o antagonista do receptor TRPV4 (RN-1734) era capaz de regular positivamente o nível de expressão gênica de *bcl-2* em CGEs expostas a TcdA e TcdB. Como pode ser observado na figura 26, TcdA e TcdB regularam negativamente a

expressão gênica de *bcl-2* em CGEs ao comparar com o grupo controle, ou seja, as toxinas diminuem a expressão gênica do fator antiapoptótico *bcl-2* e, como resultado, ocasiona a diminuição da sobrevivência das células. Já o RN-1734 conseguiu regular de forma positiva e acentuadamente a expressão gênica de *bcl-2* em CGEs expostas a TcdA e TcdB.

Em conjunto, estes achados indicam que a ativação do receptor TRPV4 em CGEs modula os efeitos apoptóticos induzidas pelas toxinas do *C. difficile* e que o bloqueio do TRPV4 pelo seu antagonista exerce um papel de suma importância ao diminuir a morte celular ocasionada pelas toxinas.

Figura 26 – Antagonista do TRPV4 regula positivamente a expressão gênica de *bcl-2* em CGEs induzida por TcdA e TcdB



RN-1734, antagonista do TRPV4, regula de forma positiva e acentuada a expressão gênica de *bcl-2* em CGEs expostas por TcdA e TcdB. Esse dado mostra que o receptor TRPV4 ao ser ativado pelas toxinas regula negativamente a expressão de *bcl-2*, diminuindo assim a sobrevivência das células. Já o RN-1734 regula positivamente a expressão de *bcl-2* na presença das toxinas fazendo com que o nível gênico do antiapoptótico *bcl-2* seja superior ao grupo controle. As CGEs foram incubadas com TcdA (50ng/mL) e TcdB (1 ng/mL) por 18h, na presença ou ausência do RN-1734 (100µM). O grupo controle (Ctrl) é representado pelas CGEs incubadas apenas com meio de cultivo. A expressão gênica de *bcl-2* nas células gliais foi avaliada por qPCR. Os dados são apresentados como média ± EPM (n=6) da expressão gênica relativa de *bcl-2*. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Tukey. **p<0,001 e ***p<0,0001.

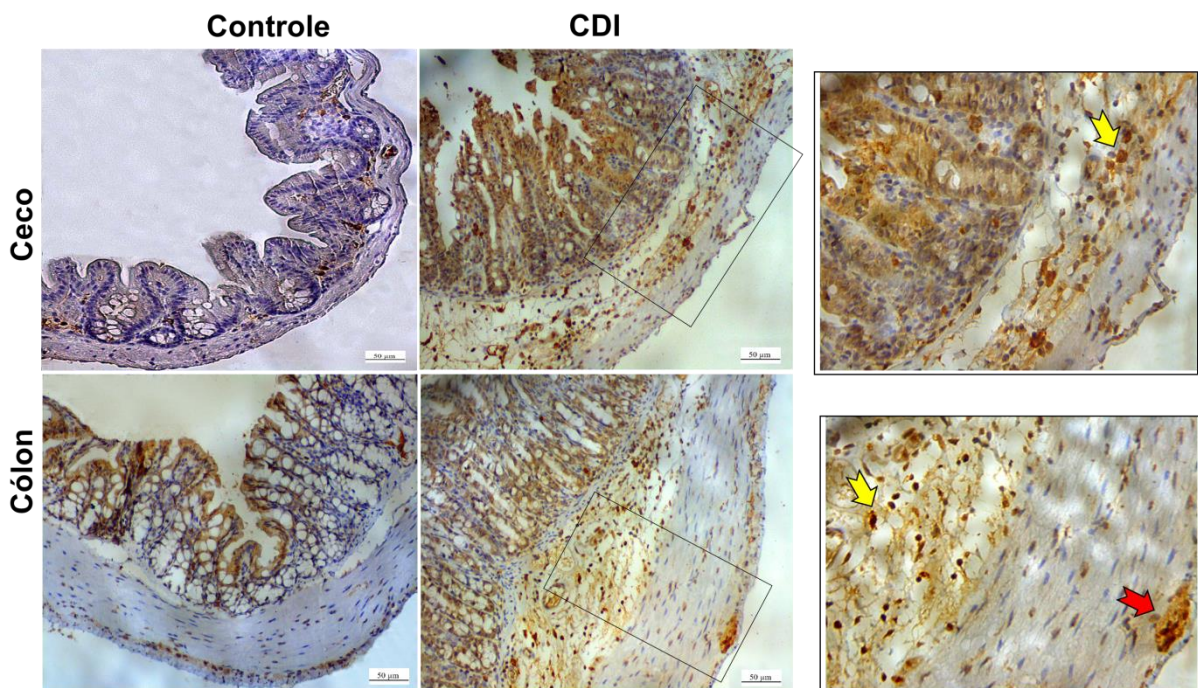
5.7 Infecção por *C. difficile* aumenta expressão protéica do TRPV4 no ceco e cólon de camundongos com CDI

Sabendo que o receptor TRPV4 é expresso ao longo do TGI e que o ceco e o cólon são as porções do intestino mais acometidas durante o período de infecção por *C. difficile* (CDI), então foi investigado se a infecção ocasionada por essa bactéria em camundongos aumentaria a expressão do TRPV4 tanto no ceco quanto no cólon analisadas por meio da técnica de

imunohistoquímica. Para isso, realizou-se uma análise qualitativa e quantitativa da expressão desse receptor nessas regiões do intestino.

Conforme apresentado na figura 27, em condições normais do grupo controle nas porções do ceco e cólon, os camundongos apresentaram células imunomarcadas para o TRPV4 no plexo submucoso e mioentérico. Por outro lado, os animais submetidos a CDI essa imunomarcção para tal receptor foi aumentada acentuadamente no ceco e no cólon, ou seja, pode ser observado aumento do TRPV4 nas células do epitélio, na submucosa e nas células do plexo mioentérico em comparação com os não infectados. Além disso, pode ser observado ainda nos animais infectados um aumento da imunomarcção nas células imunes (setas amarelas), já que esse receptor é expresso em tais células.

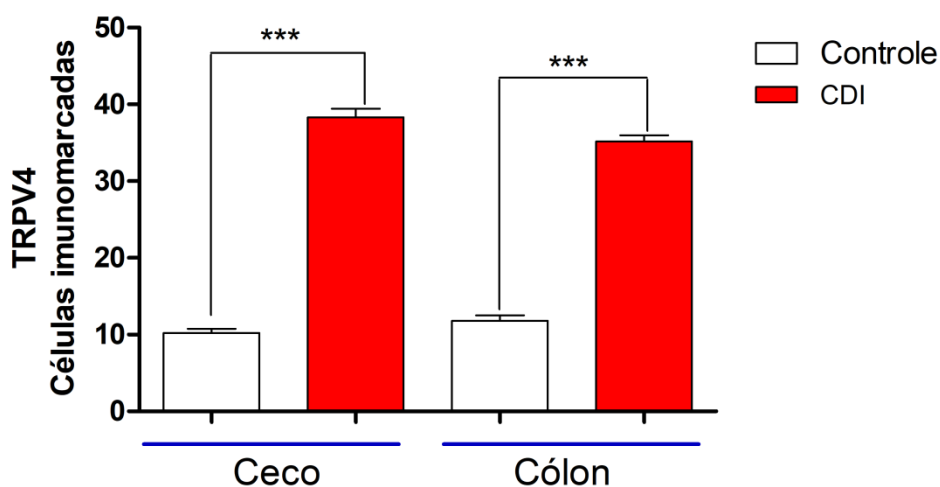
Figura 27 – Infecção por *C. difficile* em camundongos aumenta a imunomarcção para o TRPV4 no ceco e no cólon.



Os painéis representam imagens de imunohistoquímica para o TRPV4 no ceco e cólon de camundongos submetidos à CDI (Infecção por *C. difficile*). No grupo controle do ceco e cólon podem ser observada imunomarcção no plexo submucoso e mioentérico. Já os animais submetidos a CDI observa-se que houve um aumento de forma acentuada da imunomarcção tanto do ceco quanto do cólon e que podem ser evidenciadas células imunes marcadas (setas amarelas) e o plexo mioentérico (seta vermelha). Todas as imagens foram obtidas na escala de 50µm, exceto as imagens ampliadas à direita (aumento de 400 vezes).

Em consonância com esses dados qualitativos, a quantificação das células imunomarcadas para TRPV4 mostrou que a CDI aumenta de forma significativa a imunomarcção para o receptor investigado tanto no ceco quanto no cólon ao comparar com aos seus respectivos grupos controles (figura 28).

Figura 28 – Infecção por *C. difficile* em camundongos aumenta quantitativamente a imunomarcção para o TRPV4 no ceco e no cólon.



O gráfico representa a média \pm EPM da quantidade de células imunopositivas para TRPV4 no ceco e cólon de camundongos submetidos à CDI (grupo infectado) e não infectado (grupo controle). Para análise estatística foi utilizado o teste t de Student. *** $p < 0,0001$.

6 DISCUSSÃO

Em nossa pesquisa, evidenciamos de forma inédita que as CGEs expressam em suas membranas celulares o receptor TRPV4 e que ambas as toxinas do *C. difficile* aumentam a expressão desse receptor. De acordo com López-Gómez e colaboradores (2021) quando as CGEs adquirem fenótipo pró-inflamatório em resposta a estímulos patológicos proveniente de produtos bacterianos, por exemplo, essas células passam a expressar não só receptores e canais iônicos de membranas (receptor Toll-like, receptor P2X, Conexina-43, Panexina-1) (ESPOSITO *et al.*, 2014; SEGUILLA; GULBRANSEN, 2021; LOUREIRO *et al.*, 2022), como também citocinas inflamatórias e mediadores gliais (GFAP, S100B, GDNF, TNF- α e IL-1 β) (LE BERRE *et al.*, 2023). Logo, percebemos que alterações fenotípicas e funcionais na glia entérica fazem com que essas células expressem diferentes subpopulações de receptores e mediadores perante os estímulos inflamatórios presentes no microambiente entérico. Isso acontece durante a CDI quando as toxinas do *C. difficile* tem como um dos alvos as CGEs, população de células envolvidas em várias funções fisiológicas importantes do intestino, incluindo a motilidade, permeabilidade da mucosa, secreção, neurotransmissão e regulação do sistema imune entérico (BASSOTTI *et al.*, 2020; PAWOLSKI; SCHMIDT, 2021).

Nessa mesma pesquisa demonstramos ainda uma elevada expressão do TRPV4 no ceco e no cólon de camundongos infectados com *C. difficile*, principalmente, nas regiões da

submucosa, do plexo mioentérico e também nas células imunes entéricas. Esses achados juntamente com os estudos realizados por Brierley *et al.* (2008) e Fichna *et al.* (2015), que demonstraram a expressão do TRPV4 no plexo mioentérico do cólon de camundongos submetidos a hipersensibilidade visceral e dismotilidade intestinal, respectivamente, sugerem que esse receptor pode estar envolvido com a patogênese da CDI e com a dismotilidade pós-infecção. Esse distúrbio funcional após esta infecção foi evidenciado no trabalho realizado por Gutiérrez *et al.* (2015) em um estudo com 447 e 444 pacientes com diarreia associada ao *C. difficile* adquiridas respectivamente na comunidade e no hospital evidenciando dessa forma dismotilidades gastrintestinal nesses pacientes após um ano da infecção. Dentre as dismotilidades estão doença inflamatória intestinal, doença do refluxo gastroesofágico, constipação e dispepsia. Logo, essas dismotilidades podem ter importante relação com alterações da glia entérica induzidas por toxinas do *C. difficile*.

Além disso, o TRPV4 já foi descrita no plexo mioentérico do cólon humano de pacientes com doença de Crohn (DC) e colite ulcerativa (CU) (WIESE *et al.*, 2023). Wiese e colaboradores identificaram ainda no plexo mioentérico dos pacientes com DC infiltrações intraganglionares de células B e monócitos. Por outro lado, no plexo mioentérico dos pacientes com CU foram identificados infiltrados de células T CD8⁺ e uma maior extensão de apoptose de células ganglionares. Já Luo e colaboradores (2018) evidenciaram a expressão do TRPV4 em uma subpopulação distinta de macrófagos residentes no cólon de camundongos e a perda global da função desse canal iônico interrompeu a motilidade gastrointestinal nesses animais. Ademais, um pesquisa realizada por D'Aldebert *et al.* (2011) identificaram alta expressão do TRPV4 em amostras de cólon humano, linhagens de células epiteliais intestinais humanas (Caco-2 e T84) e cólon inflamado de camundongos. Com isso, percebemos que a identificação do TRPV4 no TGI de mamíferos pode desempenhar um papel importante na fisiologia ou fisiopatologia intestinal e que esse receptor está ligado a motilidade intestinal.

Vale ressaltar que a linhagem de CGEs de ratos utilizada nesse estudo apresenta propriedades funcionais semelhantes às CGEs provenientes de humanos (SORET *et al.*, 2013). Nesse aspecto, vários estudos fornecem insights sobre os mecanismos envolvidos no fenótipo pró-inflamatório reativo das células gliais entéricas humanas (CGEsh) em distúrbios gastrointestinais como é o caso da DC, CU e colite infecciosa causada pelo *C. difficile* (VON BOYEN *et al.*, 2011; TURCO *et al.*, 2014; ESPOSITO *et al.*, 2014; OCHOA-CORTES *et al.*, 2016). Além disso, as CGEs por desempenharem função central no microambiente entérico, elas detectam e respondem aos mais variados estímulos inflamatórios como é o caso das infecções virais, bacterianas e seus produtos (toxinas ou LPS) (PROGATZKY; PACHNIS,

2022). Isso faz com que essas células produzam numerosos mediadores que regulam seu ambiente e dentre os mediadores estão os fatores de crescimento, lipídios bioativos e citocinas (LE BERRE *et al.*, 2023).

Sendo assim, a nossa pesquisa evidencia que a TcdA e TcdB ao ativar o receptor TRPV4 expresso nas CGEs desencadeia uma cascata de eventos intracelulares resultando no aumento da translocação do NFκBp65 para o núcleo dessas células. Ao bloquear o TRPV4 com seu antagonista RN-1734, houve diminuição da translocação do NFκBp65 para o núcleo das CGEs. De acordo com LIU *et al.* (2017), NFκB é um fator de transcrição nuclear que é responsável por regular as funções imunes inatas e adaptativas, isto é, o NFκB uma vez ativado regulará a expressão de vários genes pró-inflamatórios, incluindo aqueles que codificam citocinas (TNF-α, IL-6, IL-1β, IL-2, IL-8), quimiocinas (CXCL-1, CXCL-10, MCP-1), e também participa da regulação do inflamassoma. Além disso, um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa mostrou que a TcdA e TcdB do *C. difficile* ativam o NFκB e por sua vez aumenta de forma significativa a expressão gênica de *IL-6*, uma citocina envolvida no prognóstico da CDI (COSTA *et al.*, 2021). Com isso, percebe-se que uma vez ativado o NFκB, esse se torna um mediador essencial nas respostas inflamatórias da glia entérica, cuja uma das funções é regular o sistema imunológico entérico.

Sabendo-se que a ativação do fator NFκB regula a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α, IL-6, IL-1β) (LIU *et al.*, 2017) e que as toxinas do *C. difficile* podem estimular vários tipos de células tais como, as células epiteliais intestinais, as células imunes, e neurônios, a secretarem citocinas e quimiocinas (BASSOTTI *et al.*, 2021). No nosso estudo foi demonstrado que o TRPV4 ao ser ativado pela TcdA e TcdB leva uma resposta inflamatória nas CGEs com aumento de forma inédita da expressão protéica de TNF-α e por sua vez, o bloqueio do TRPV4 pelo RN-1734 resultou na diminuição de TNF-α. Esse resultado sugere a participação desse receptor como mediador nas respostas inflamatórias de células gliais a essas toxinas.

Nesse sentido, anteriormente outros métodos foram utilizados para detectar o TNF-α secretado por essas células como é o caso da pesquisa realizada por Costa *et al.* (2021), que ao utilizar sobrenadante de CGEs desafiadas com TcdA ou TcdB não detectou o TNF-α utilizando o ensaio Bioplex por meio do ELISA. Isso sugere que as CGEs secretam baixos níveis desse mediador impossibilitando sua detecção mesmo utilizando ensaio de alta sensibilidade como é o caso do ELISA. Por outro lado, no mesmo trabalho ao utilizar lisado de proteínas obtidas de camundongos infectados pelo *C. difficile* observou-se um aumento de TNF-α. É importante frisar que níveis elevados das citocinas TNF-α, IL-2, IL-6 e IL-1β estão

associados a um mau prognóstico em pacientes com CDI (YU *et al.*, 2017; ABHYANKAR *et al.*, 2020).

Um estudo realizado por Fettucciari *et al.* (2017) demonstrou que as CGEs são mais suscetíveis à apoptose induzida por TcdB quando são estimuladas com a combinação de TNF- α mais interferon- γ (IFN- γ) antes, durante ou após o tratamento com TcdB. Esses dados sugerem que o desarranjo na rede das CGEs ocasionada pelo efeito sinérgico dessas citocinas pró-inflamatórias e TcdB pode ser um dos fatores cruciais na CDI e nas recaídas dos pacientes, uma vez que esse sinergismo pode favorecer o aumento da toxicidade da TcdB contra as CGEs em sua rede enteroglial (BASSOTTI *et al.*, 2020).

Como já mencionado anteriormente, o NF κ B desempenha um papel importante na indução da transcrição de IL-6, e fatores ativadores do NF κ B, incluindo LPS e toxinas induzem eficientemente a transcrição desta interleucina (WOLF *et al.*, 2014). A IL-6 é considerada uma citocina pleiotrópica visto que desempenha tanto papel anti-inflamatório quanto inflamatório a depender do contexto ao qual a mesma esteja inserida (MURAKAMI *et al.*, 2019). Sendo assim, em nossa pesquisa como já demonstrado, ambas as toxinas do *C. difficile* aumentaram a expressão gênica de *IL-6* nas CGEs, mas o bloqueio do TRPV4 pelo RN-1734 não interferiu no efeito da TcdB. Nesse aspecto, estudos realizados por nosso grupo de pesquisa mostraram que tanto a TcdA quanto a TcdB induzem uma suprarregulação de *IL-6* via ativação do receptor P2X7 e via S100B/RAGE/PI3K/NK κ B em CGEs (COSTA *et al.*, 2021; LOUREIRO *et al.*, 2022).

Um estudo publicado por D'Aldebert e colaboradores em 2011 demonstrou que a administração intracolônica do 4 α PDD (agonista TRPV4) em camundongos foi acompanhado por um aumento significativo da citocina IL-6 e das quimiocinas (MCP-1 e KC - quimiocina derivada dos queratinócitos). Nesse mesmo trabalho, os autores mostraram ainda que a administração de 4 α PDD em células Caco-2 e T84 ocasionou um aumento dependente da dose na concentração intracelular de Ca²⁺ e na liberação de IL-8. Perante esses resultados, percebe-se que a ativação do canal iônico do TRPV4 é funcional e expresso nas células intestinais humanas, já que sua ativação acarretou na liberação de quimiocinas e citocinas inflamatórias.

Como já citado acima, uma das citocinas liberada pela ativação do NF κ B é a IL-1 β , mediador chave da inflamação. Logo, em nossa pesquisa demonstramos que a ativação do TRPV4 pela TcdA e TcdB leva uma resposta inflamatória das CGEs com aumento da expressão gênica de *IL-1 β* . No entanto, o bloqueio desse receptor pelo RN-1734 não interferiu no efeito das toxinas nos níveis de *IL-1 β* . Uma das hipóteses que pode explicar para o

antagonista não ter diminuído os níveis gênicos de *IL-1 β* deve-se porque muitos mediadores inflamatórios como é o caso da própria *IL-1 β* possui RNA instável, o que pode prejudicar a análise por PCR. Esta instabilidade resulta frequentemente em parte pela presença de elementos ricos em adenina e uridina (STUMPO *et al.*, 2010).

Sabe-se que a desregulação das CGEs contribui não só nas respostas imunológicas entéricas em doenças inflamatórias intestinais, como é o caso da CDI, como também na morte celular de neurônios entéricos e das CGEs (CHOW; GULBRANSEN, 2017; COSTA *et al.*, 2021; SANTOS *et al.*, 2022). Nesse aspecto, o bloqueio do TRPV4 pelo RN-1734 resultou na redução da exposição da fosfatidilserina para a camada externa da membrana das células gliais, o que sugere que a ativação do receptor pela TcdA e TcdB leva a morte apoptótica das CGEs. Esses dados estão de acordo com os estudos já publicados na área enteroglial na qual as toxinas do *C. difficile* levam a morte das CGEs por diferentes vias de sinalização (COSTA *et al.*, 2021; LOUREIRO *et al.*, 2022; FETTUCCIARIA *et al.*, 2022). Além disso, sabe-se que o TRPV4 é um canal altamente permeável ao Ca^{2+} e esse íon por sua vez é um importante regulador da fisiologia celular (RYSKAMP *et al.*, 2016). Nesse sentido, conforme FETTUCCIARIA *et al.* (2023), alterações nos níveis fisiológicos de Ca^{2+} intracelular por TcdA e TcdB pode ser considerado o principal evento comum responsável pela ativação da morte celular.

Alteração na homeostase do Ca^{2+} pelas toxinas é associada pela inibição das Rho-GTPases, isto é, TcdA e TcdB ao inativar Rho-GTPase leva uma perda de todo o arcaboço do citoesqueleto de actina, arredondamento celular, parada do ciclo celular (efeitos citopáticos) e morte celular por necrose precoce ou apoptose (efeitos citotóxicos) (BASSOTTI *et al.*, 2021). Ademais, o aumento de Ca^{2+} citoplasmático ocasionado pelas toxinas têm efeitos importantes nas moléculas reguladas por esse íon, além de desempenhar um papel direto na morte celular ou até mesmo ativar outros efetores de morte celular, como caspases, calpaínas, EROs (espécies reativas de oxigênio) e membros da família Bcl-2 pró-apoptóticos (BRITO *et al.*, 2002a; FETTUCCIARIA *et al.*, 2023). Logo, diante desse resultado podemos afirmar que o TRPV4 exerce um papel de suma importância no controle da morte celular das CGEs induzida pelas toxinas do *C. difficile*, visto que o seu bloqueio diminuiu a morte dessas células.

Ao se falar em morte celular, especificamente, em apoptose, duas grandes famílias de proteínas estão envolvidas nesse evento intracelular, sendo elas, a família Bcl-2 e a família das caspases (BRITO *et al.*, 2002a; RUSSAR, 2022). Dentre as caspases têm as iniciadoras (2, 8, 9, 10) e as efetoras (3, 7, 6), sendo que caspases efetoras-3, efetoras-7 e efetoras-6 ao

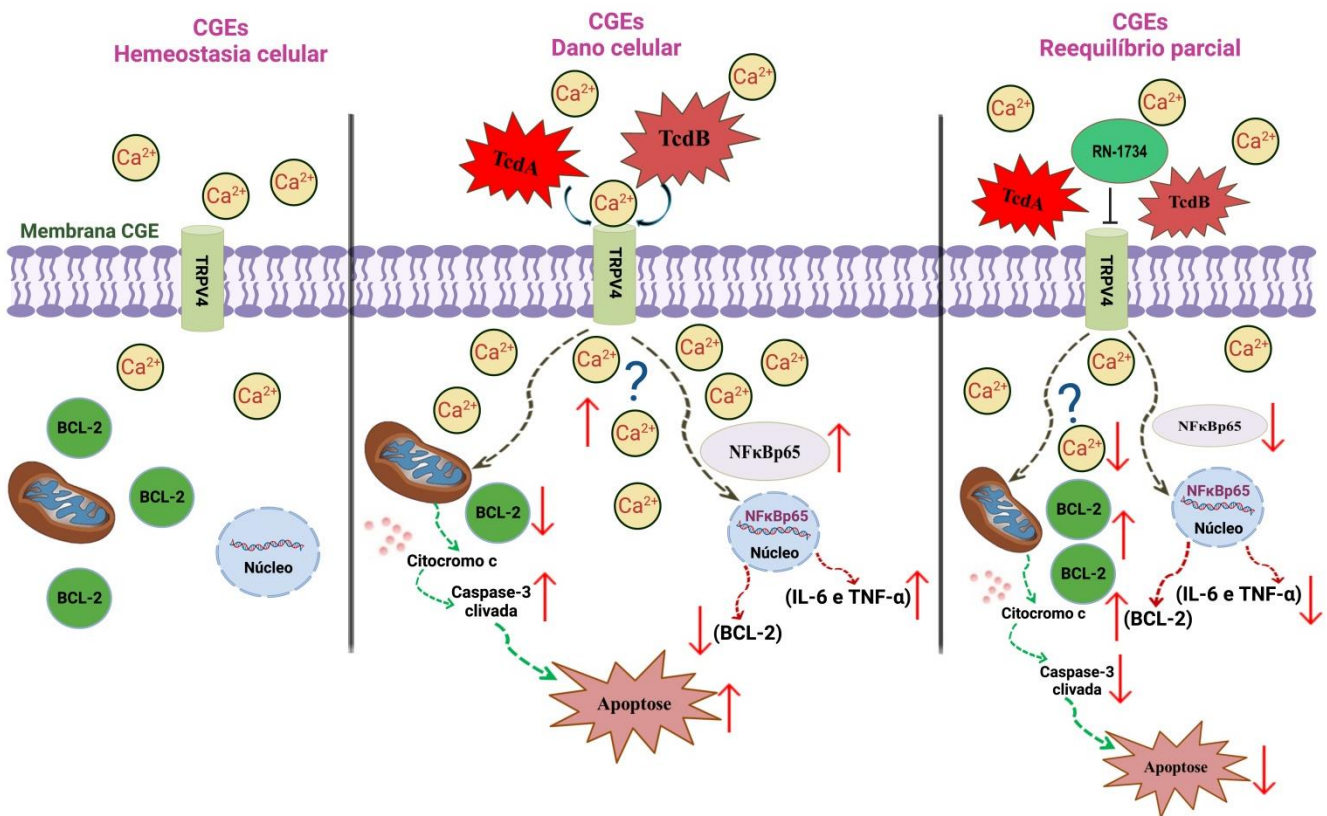
serem ativadas por caspases iniciadoras diferentes, caspase-8 e caspase-9, leva a ativação da via apoptótica (MACCHIONI *et al.*, 2017; ESKANDARI; EAVES, 2022). Nesse sentido, o bloqueio do TRPV4 pelo seu antagonista RN-1734 reduz ativação de caspase-3 ativada nas CGEs e esse resultado sugere que a ativação do receptor pelas toxinas do *C. difficile* aumenta os níveis protéicos dessa protease. Um dos mecanismos de apoptose induzida por TcdA ou TcdB em CGEs já foi evidenciado que a caspase-3 efetora desempenha um papel crucial na apoptose da glia entérica induzida pelas toxinas do *C. difficile* (FETTUCCIARI *et al.*, 2021; LOUREIRO *et al.*, 2022). Além disso, um estudo realizado por nosso grupo de pesquisa, mostrou que o TcdA induziu apoptose em células T84 via caspases-3, -6, -8 e -9 e ativação Bid e que por sua vez ainda leva interrupção do potencial de membrana mitocondrial e liberação de citocromo C (BRITO *et al.*, 2002a).

Vale ressaltar que a TcdB sozinha ou em combinação com TNF- α mais IFN- γ induz apoptose nas CGEs ativando três vias de sinalização diferentes, sendo elas mediadas por caspases, calpaínas e catepsina B (FETTUCCIARI *et al.*, 2022). Além disso, foi demonstrado que ativação (caspase-3/caspase-7) é fracamente responsável pela apoptose, isto é, que ela medeia 27% da apoptose apenas com a TcdB. Já a catepsina B contribui para o desencadeamento do sinal pró-apoptótico e é responsável em ambas as condições por cerca de 35% de apoptose de maneira independente de caspase. Diante dos resultados expostos, a ativação do TRPV4 na glia entérica é responsável por mediar à resposta de morte celular em uma das via de sinalização apoptóticas.

Como mencionado acima, a apoptose é regulada não só pelas caspases como também por outras proteínas como é o caso da própria família de proteínas Bcl-2, conhecidas como supressores de apoptose (antiapoptótico) e dentre estas estão a Bcl-2 e Bcl-X_L (BRENTNALL *et al.*, 2013). Dessa forma, em nosso resultado foi demonstrado que a ativação do TRPV4 pela TcdA e TcdB regula negativamente a expressão gênica de *bcl-2* nas CGEs, visto que houve diminuição da sobrevivida dessas células. Já o bloqueio do receptor pelo RN-1734 resultou na sobrevivida das CGEs, ou seja, a ativação do TRPV4 regula positivamente a expressão gênica de *bcl-2* na glia entérica. De acordo com MATTE *et al.* (2009), a superexpressão das proteínas (Bcl-2 e Bcl-X_L) inibem morte celular em células T84 e reduz a permeabilização da membrana externa mitocondrial (MOMP) induzida por TcdA. Além disso, um estudo com CGEs realizado por FETTUCCIARI *et al.* (2023), mostrou que TcdA e TcdB causam MOMP com conseqüente liberação de citocromo C e ativação de caspase-9 por uma via dependente de mitocôndrias, isto é, alterações na MOMP são reguladas por um equilíbrio entre membros pró e antiapoptóticos da família Bcl-2.

Em conjunto, os dados da nossa pesquisa evidenciam de forma inédita que a glia entérica expressa o receptor TRPV4 em sua membrana celular e esse por sua vez regula tanto a resposta inflamatória quanto a morte celular induzida pelas toxinas do *C. difficile*. Com isso, nos permitem sugerir um esquema do possível mecanismo de participação do TRPV4 na ação da TcdA e TcdB nas CGEs, como pode ser observado logo abaixo na figura 29.

Figura 29 – Possível mecanismo da participação do TRPV4 na ação da TcdA e TcdB nas CGEs



Fonte: Elaborado pelo autor. A) Homeostasia celular – as CGEs em condições fisiológicas expressam em suas membranas celulares o receptor TRPV4. B) Danos celulares – TcdA e TcdB ativam o receptor TRPV4 levando um aumento da sua expressão e atividade nas CGEs e, consequentemente, desencadeia uma cascata de eventos intracelulares, tais como: aumento da translocação do fator de transcrição NFκBp65, aumento das citocinas pró-inflamatórias (*IL-6*, *TNF-α* e *IL-1β*), diminuição de *bcl-2* e aumento de caspase-3 clivada que resulta na morte das CGEs (apoptose). Esses resultados indicam que as toxinas aumentam o influxo de cálcio, gerando esses efeitos nas CGEs. C) Reequilíbrio parcial – O antagonista do TRPV4 (RN-1734) diminui a resposta inflamatória e morte celular ocasionada pelas toxinas nas CGEs restabelecendo assim as condições fisiológicas parciais das células gliais.

7 CONCLUSÃO

Com base nos achados desta pesquisa, pode-se inferir que:

- As CGE expressam o receptor TRPV4 em suas membranas celulares;
- TcdA e TcdB ativam o receptor TRPV4 levando um aumento da sua expressão nas CGEs;
- A infecção por *C. difficile* (CDI) aumenta a expressão do TRPV4 no ceco e cólon de camundongos infectados;
- O receptor TRPV4 medeia à resposta inflamatória nas CGEs, visto que o bloqueio do TRPV4 pelo seu antagonista (RN-1734) reduz a translocação do fator de transcrição nuclear NF κ Bp65 em CGEs induzidas por TcdA e TcdB do *C. difficile*, levando a diminuição da expressão da citocina pró-inflamatória (TNF- α e *IL-6*);
- O receptor TRPV4 medeia à morte celular induzida pelas toxinas do *C. difficile*, uma vez que o bloqueio do TRPV4 diminui a ativação de caspase-3 induzida por TcdA e TcdB e por regular positivamente a expressão gênica de *bcl-2* nas CGEs.

REFERÊNCIAS

- AKTORIES, K.; SCHWAN, C.; JANK, T. *Clostridium difficile* Toxin Biology. **Annu Rev Microbiol.**, v. 71, p. 281–307, 2017.
- AWAD, M. J. *et al.* *Clostridium difficile* virulence factors: Insights into an anaerobic spore-forming pathogen. **Gut Microbes.**, v. 5, p. 579–593, 2014.
- ARAÚJO JUNQUEIRA, A.F.T *et al.* Adenosine Deaminase Inhibition Prevents *Clostridium difficile* Toxin A-Induced Enteritis in Mice. **Infect Immun.**, v. 79, n. 2, p. 653–662, 2011.
- ANTUNES, A. *et al.* Global transcriptional control by glucose and carbon regulator CcpA in *Clostridium difficile*. **Nucleic Acids Res.**, v. 40, n. 21, p. 10701–10718, 2012.
- ARONSSON, B.; MÖLLBY, R.; Nord, C.E. Occurrence of toxin-producing *Clostridium difficile* in antibiotic-associated diarrhea in Sweden. **Med Microbiol Immunol.**, v. 170, p. 27–35, 1981.
- ANNAHAZI, A.; SCHEMANN, M. The enteric nervous system: “A little brain in the gut”. **Neuroforum.**, v. 26, p. 31–42, 2020.
- ALAIMO, A.; RUBERT, J. The Pivotal Role of TRP Channels in Homeostasis and Diseases throughout the Gastrointestinal Tract. **Int J Mol Sci.**, v. 20, p. 5277, 2019.
- ABHYANKAR, M. M. *et al.* Immune Profiling To Predict Outcome of *Clostridioides difficile* Infection. **mBio.**, v. 11, p. e00905-20, 2020.
- BABAN, S. T. *et al.* The Role of Flagella in *Clostridium difficile* Pathogenesis: Comparison between a Non-Epidemic and an Epidemic Strain. **PLoS ONE.**, v. 8, n. 9, 2013.
- BALASSIANO, I.; T. *et al.* *Clostridium difficile*: a problem of concern in developed countries and still a mystery in Latin America. **J Med Microbiol.**, v. 61, p. 169–179, 2012.
- BARTLETT, J.G. *et al.* Symptomatic Relapse After Oral Vancomycin Therapy of Antibiotic-Associated Pseudomembranous Colitis. **Gastroenterology.**, v. 78, p. 431–434, 1980.
- BARTLETT, J. G. *Annals of Internal Medicine Review Narrative Review*: The New Epidemic of *Clostridium difficile* – Associated Enteric Disease. **Ann Intern Med.**, v. 145, p. 758–764, 2006.
- BRADSHAW, W. J. *et al.* The structure of the S-layer of *Clostridium difficile*. **J Cell Commun Signal.**, v. 12, p. 319 - 331, 2018.
- BARTLETT, J. G.; GERDING, D. N. Clinical Recognition and Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection. **Clin Infect Dis.**, v. 46, p. S12–S18, 2008.
- BOUILLAUT, L. *et al.* Integration of metabolism and virulence in *Clostridium difficile*. **Res Microbiol.**, v. 166, n. 4, p. 375–383, 2015.

- BRAUN, V. *et al.* Definition of the single integration site of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile*. **Gene.**, v. 181, n. 1–2, p. 29–38, 1996.
- BRITO, G. A. C. *et al.* Mechanism of *Clostridium difficile* Toxin A – Induced Apoptosis in T84 Cells. **J Infect Dis.**, v. 186, p. 1438–1447, 2002a.
- BRITO, G. A. C. *et al.* *Clostridium difficile* Toxin A Alters In Vitro – Adherent Neutrophil Morphology and Function. **J Infect Dis.**, v. 185, p. 1297–1306, 2002b.
- BROUWER, M. S. M. *et al.* Horizontal gene transfer converts non-toxigenic *Clostridium difficile* strains into toxin producers. **Nat Commun.**, v. 4, p. 1–6, 2013.
- BLONDEAU, J. M. What have we learned about antimicrobial use and the risks for *Clostridium difficile*-associated diarrhoea? **J Antimicrob Chemoth.**, 63:238-42, 2009.
- BOUILLAUT, L.; SELF, W. T.; SONENSHEIN, A. L. Proline-Dependent Regulation of *Clostridium difficile* Stickland Metabolism. **J Bacteriol.**, v. 195, n. 4, p. 844–854, 2013.
- BOESMANS, W. *et al.* Development, Diversity, and Neurogenic Capacity of Enteric Glia. **Front Cell Dev Biol.**, v. 9, p. 775102, 2022.
- BRIERLEY, S. M. *et al.* Selective role for TRPV4 ion channels in visceral sensory pathways. **Gastroenterology.**, v. 134, p. 2059-2069, 2008.
- BLACKSHAW, L. A. *et al.* TRP channels: new targets for visceral pain. **Gut.**, v. 59, p. 126-35, 2008.
- BAGNELL, A. M. *et al.* TRPV4: a trigger of pathological RhoA activation in neurological disease. **BioEssays.**, v. 44, p. 2100288, 2022.
- BRENTNALL, M. *et al.* Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. **Bmc Cell Biology.**, v.14, P. 14-32, 2013.
- BASSOTTI, G. *et al.* The cytotoxic synergy between *Clostridioides difficile* toxin B and proinflammatory cytokines: an unholy alliance favoring the onset of *Clostridioides difficile* infection and relapses. **Microbiology.**, v. 9, p. e1061, 2020
- BOYEN, G. T. V. *et al.* Distribution of enteric glia and GDNF during gut inflammation. **BMC Gastroenterology.**, v. 11, 2011.
- CARTER, G. P. *et al.* The Anti-Sigma Factor TcdC Modulates Hypervirulence in an Epidemic BI / NAP1 / 027 Clinical Isolate of *Clostridium difficile*. **PLoS Pathog.**,v. 7, n. 10, 2011.
- CARTER, G. P. *et al.* Binary Toxin Production in *Clostridium difficile* Is Regulated by CdtR, a LytTR Family Response Regulator. **J Bacteriol.**, v. 189, n. 20, p. 7290–7301, 2007.
- CHANDRASEKARAN, R.; LACY, D. B. The role of toxins in *clostridium difficile* infection. **FEMS Microbiol Ver.**, v. 41, n. 6, p. 723–750, 2017.

CHEN, P. *et al.* Structural basis for recognition of frizzled proteins by *Clostridium difficile* toxin B. **Science.**, v. 669, p. 664–669, 2018.

CHEN, S. *et al.* The Role of Rho GTPases in Toxicity of *Clostridium difficile* Toxins. **Toxins (Basel).**, v. 7, p. 5254–5267, 2015.

CHILTON, C. H. *et al.* Co-amoxiclav induces proliferation and cytotoxin production of *Clostridium difficile* ribotype 027 in a human gut model. **J Antimicrob Chemother.**, v. 67, p. 951–954, 2012.

CHAVES-OLARTE, E. *et al.* R-Ras Glucosylation and Transient RhoA Activation Determine the Cytopathic Effect Produced by Toxin B Variants from Toxin A-negative Strains of *Clostridium difficile*. **J. Biol Chem.**, v. 278, n. 10, p. 7956–7963, 2003.

COLLINS, J. *et al.* Dietary trehalose enhances virulence of epidemic *Clostridium difficile*. **Nature.**, v. 553, n. 7688, p. 291–294, 2018.

COSTA, D.; V; S. *et al.* S100B Inhibition Attenuates Intestinal Damage and Diarrhea Severity During *Clostridioides difficile* Infection by Modulating Inflammatory Response. **Front Cell Infect Microbiol.**, v. 11, p. 739874, 2021a.

CHEN, Y. *et al.* Transient Receptor Potential Channels and Inflammatory Bowel Disease. **Front Immunol.**, v. 11, p. 180, 2020.

CENAC, N. *et al.* Transient receptor potential vanilloid-4 has a major role in visceral hypersensitivity symptomS.. **Gastroenterology.**, v. 135, p. 937-46, 2008.

CHOW, A.; GULBRANSEN, B. D. Potential roles of enteric glia in bridging neuroimmune communication in the gut. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 312, p. G145-G152, 2016.

CIRILLO, C. *et al.* Proinflammatory stimuli activates human-derived enteroglia cells and induces autocrine nitric oxide production. **Neurogastroenterol Motil.**, v. 23, p. e372-82, 2011.

COSTA, D.; V; S. *et al.* Adenosine receptors differentially mediate enteric glial cell death induced by *Clostridioides difficile* Toxins A and B. **Front Immunol.**, v. 13, p. 956326, 2022b.

CHOW, A. K; GULBRANSEN, B.D. Potential roles of enteric glia in bridging neuroimmune communication in the gut. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 312, p. G145-G152, 2017.

DARKOH, C. *et al.*, Toxin Synthesis by *Clostridium difficile* Is Regulated through Quorum. **MBio.**, v. 6, n. 2, p. 1–10, 2015.

DESAI, K. *et al.* Epidemiological and economic burden of *Clostridium difficile* in the United States : estimates from a modeling approach. **BMC Infect Dis.**, v. 16, p. 303, 2016.

DINEEN, S. S. *et al.* Repression of *Clostridium difficile* toxin gene expression by CodY. **Mol Microbiol.**, v. 66, p. 206–219, 2007.

DINGLE, K. E. *et al.* Clinical *Clostridium difficile*: Clonality and pathogenicity locus diversity. **PLoS ONE.**, v. 6, n. 5, 2011.

DON GJ, D. A. The association between antibiotic- associated diarrhoea and *C. difficile* toxin in children. **Aust N Z J Med.**, v. 11, p. 433–4, 1981.

DUBBERKE, E. R.; OLSEN, M. A. Burden of *Clostridium difficile* on the Healthcare System. **Clin Infect Dis.**, v. 55, p. 88–92, 2012.

DUBBERKE, E. R.; WERTHEIMER, A. I. Review of Current Literature on the Economic Burden of *Clostridium difficile* Infection. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v. 30, n. 01, p. 57–66, 2009.

DUNBAR, S. A.; ZHANG, H.; TANG, Y. W. Advanced techniques for detection and identification of microbial agents of gastroenteritis. **Clin Lab Med.**, v. 33, n. 3, p. 527–552, 2013.

DUPUY, B.; SONENSHEIN, A. L. Regulated transcription of *Clostridium difficile* toxin genes. **Biochem Pharmacol.**, v. 230, p. 115195, 2022.

D'ALDEBERT, E. *et al.* Transient receptor potential vanilloid 4 activated inflammatory signals by intestinal epithelial cells and colitis in mice. **Gastroenterology.**, v. 140, p. 275–85, 2011.

DU, Y. *et al.* Transient receptor potential vanilloid 4 activated inflammatory signals by intestinal epithelial cells and colitis in mice. **Mol Microbiol.**, v. 27, p. 107–120, 1998.

DE FILIPPIS, D. *et al.* Cannabidiol Reduces Intestinal Inflammation through the Control of Neuroimmune Axis. **PLoS ONE.**, v. 6, p. e28159, 2011.

DI BELLA, S. *et al.* *Clostridium difficile* toxins A and B: Insights into pathogenic properties and extraintestinal effects. **Toxins.**, v. 8, n. 5, p. 1–25, 2016.

EGERER, M. *et al.* Auto-catalytic Cleavage of *Clostridium difficile* Toxins A and B Depends on Cysteine Protease Activity. **J Biol Chem.**, v. 282, n. 35, p. 25314–25321, 2007.

ETIENNE-MANNEVILLE; HALL. Rho GTPases in cell biology. **Nature.**, v. 420, p. 629–635, 2002.

ELLIOTT, B. *et al.* Infection, Genetics and Evolution *Clostridium difficile* infection: Evolution, phylogeny and molecular epidemiology. **Infect Genet Evol.**, v. 49, p. 1–11, 2017.

ESPOSITO, B. *et al.* Palmitoylethanolamide improves colon inflammation through an enteric glia/toll like receptor 4-dependent PPAR- α activation. **GUT.**, v. 63, p. 1300–12, 2014.

ESKANDARI, E.; EAVES, C. J. Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis. **J Cell Biol.**, v. 221, p. e202201159, 2022.

EVERAERTS, W. *et al.* The vanilloid transient receptor potential channel TRPV4: from structure to disease. **Prog Biophys Mol Biol.**, v. 63, p. 2-17, 2010.

FLORIN, I; THELESTAM M. Internalization of *Clostridium difficile* cytotoxin into cultured human lung fibroblasts. **Biochim Biophys Acta.**, v. 19, p. 383 – 92, 1983.

FIMLAID, K.; A. *et al.* Identification of a Novel Lipoprotein Regulator of *Clostridium difficile* Spore Germination. **PLoS Pathog.**, v. 11, p. 23 – 9, 2015.

FETTUCCIARIA, K.; A. *et al.* Enteric glial cells are susceptible to *Clostridium difficile* toxin B. **Cell Mol Life Sci.**, v. 74, p. 1527 – 51, 2017.

FUNG, C.; BERGHE, P. V. Functional circuits and signal processing in the enteric nervous system. **Cell Mol Life Sci.**, v. 77, p. 4505 – 4522, 2022.

FICHNA, J. *et al.* Transient receptor potential vanilloid 4 inhibits mouse colonic motility by activating NO-dependent enteric neurotransmission. **J. Mol. Med.**, v.93, p. 1297–1309, 2015a.

FICHNA, J. *et al.* Transient receptor potential vanilloid 4 blockade protects against experimental colitis in mice: a new strategy for inflammatory bowel diseases treatment?. **Neurogastroenterol Motil.**, v.24, p. e557-60, 2012b.

FETTUCCIARIA, K.; A. *et al.* *Clostridioides difficile* toxin B alone and with pro-inflammatory cytokines induces apoptosis in enteric glial cells by activating three different signalling pathways mediated by caspases, calpains and cathepsin B. **Cell Mol Life Sci.**, v. 79, p. 1527 – 51, 2022.

FETTUCCIARIA, K.; A. *et al.* Role of the Alteration in Calcium Homeostasis in Cell Death Induced by *Clostridioides difficile* Toxin A and Toxin B. **Biology.**, v. 10, p. 1117, 2023.

FETTUCCIARI, K. *et al.* Invisible steps for a global endemy: molecular strategies adopted by *Clostridioides difficile*. **Ther Adv Gastroenterol.**, v. 14, p. 175628482110327, 2021.

FETTUCCIARI, K. *et al.* Role of the Alteration in Calcium Homeostasis in Cell Death Induced by *Clostridioides difficile* Toxin A and Toxin B. **Biology.**, v. 12, p. 1117, 2023.

GENISYUERK, S. *et al.* Structural determinants for membrane insertion , pore formation and translocation of *Clostridium difficile* toxin B. **Mol Microbiol.**, v. 79, p. 1643–1654, 2011.

GEORGE, R. H. *et al.* Identification of *Clostridium difficile* as a cause of pseudomembranous colitis. **Br Med J.**, v. 1, n. 6114, p. 695, 1978.

GEORGE, W. L. *et al.* *Clostridium difficile* and Cytotoxin in Feces of Patients with Antimicrobial Agent-associated Pseudomembranous Colitis. **Infection.**, v. 10, n. 4, p. 205–207, 1982.

GEORGE, W. L.; SUTTER, V. L.; CITRON, D. Selective and differential medium for isolation of Selective and Differential Medium for Isolation of *Clostridium difficile*. **J Clin Microbiol.**, v. 9, n. 2, p. 214–219, 1979.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. **Lancet.**, v. 361, n. 9356, p. 512–519, 2003.

GENTH, H.; AKTORIES, K.; JUST, I. Monoglucosylation of RhoA at Threonine 37 Blocks Cytosol-Membrane Cycling. **J. Biol Chem.**, v. 274, p. 29050–29056, 1999.

GEORGE, W. L. *et al.* Aetiology of Antimicrobial-Agent-Associated Colitis. **Lancet.**, v. 311, n. 8068, p. 802–803, 1978.

GERHARD, R. *et al.* Glucosylation of Rho GTPases by *Clostridium difficile* toxin A triggers apoptosis in intestinal epithelial cells. **J Med Microbiol.**, v. 57, p. 765–770, 2008.

GUYER, R. *et al.* Single-cell multiome sequencing clarifies enteric glial diversity and identifies an intraganglionic population poised for neurogenesis. **Cell Rep.**, v. 57, p. 765–770, 2008.

GUPTA, K; ANANTHAKRISHNAN, A. N. Economic burden and cost-effectiveness of therapies for *Clostridiodes difficile* infection: a narrative review. **Therap Adv Gastroenterol.**, v. 14, p. 1–13, 2021.

GUTIÉRREZ, R. L.; RIDDLE, M. S.; PORTER, C. K. Increased risk of functional gastrointestinal sequelae after *Clostridium difficile* infection among active duty United States military personnel (1998-2010). **Gastroenterology**, v. 149, n. 6, p. 1408-14, Nov 2015.

HIPPENSTIEL, S. *et al.* Rho protein inactivation induced apoptosis of cultured human endothelial cells. **Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.**, v. 283, p. L830–L838, 2002.

HAMMOND, G. A.; JOHNSON, J. L. The toxigenic element of *Clostridium difficile* strain VPI 10463. **Microb Pathog.**, v. 19, n. 4, p. 203–213, 1995.

HALL I. C; O'TOOLE, E. Intestinal flora in new-born infants with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. **Am J Dis Child.**, v. 49, p. 390–402, 1935.

HENNEQUIN, C. *et al.* GroEL of *Clostridium difficile* is involved in cell adherence. **Microbiology.**, v. 147, n. 2001, p. 87–96, 2001.

HALABI-CABEZON, I. *et al.* Prevention of the cytopathic effect induced by *Clostridium difficile* Toxin B by active Rac1. **Febs.**, v. 582, p. 3751–56, 2008.

HANANI, M.; REICHENBACH, A. Morphology of horseradish peroxidase (HRP)-injected glial cells in the myenteric plexus of the guinea-pig. **Cell Tissue Res.** v. 278, p.153–160, 1994.

HUSSAR, P. Apoptosis Regulators Bcl-2 and Caspase-3. **Medicine & Pharmacology.**, v. 2, p. 1624-1636, 2022.

JANK, T.; AKTORIES, K. Structure and mode of action of clostridial glucosylating toxins: the ABCD model. **Trends Microbiol.**, v. 16, n. 5, p. 222–229, 2008.

- JAFFE, A. B; HALL, A. Rho GTPases: biochemistry and biology. **Annu Rev Cell Dev Biol.**, v. 21, p. 247 – 69, 2005.
- KARASAWA, T. *et al.* Effect of Arginine on Toxin Production *Clostridium difficile* in Defined Medium. **Microbiol Immunol.**, v. 41, n. 8, p. 581–585, 1997.
- KARLSSON, S. *et al.* Expression of *Clostridium difficile* Toxins A and B and Their Sigma Factor TcdD Is Controlled by Temperature. **Infect Immun.**, v. 71, n. 4, p. 1784–1793, 2003.
- KACHRIMANIDOU, M.; TSINTARAKIS, E. Insights into the Role of Human Gut Microbiota in *Clostridioides difficile* Infection. **Microorganisms.**, v. 200, p. 1–16, 2020.
- KELLY, C. P.; KYNE, L. The host immune response to *Clostridium difficile*. **J Med Microbiol.**, v. 60, p. 1070–1079, 2011.
- KUIJPER, E. J. *et al.* Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. **Clin Microbiol Infect.**, p. 2–18, 2006.
- KOMMINENI, S. *et al.* Nitric oxide-sensitive and -insensitive interaction of *Bacillus subtilis* NsrR with a ResDE-controlled promoter. **Mol Microbiol.**, v. 78, p. 1280–1293, 2010.
- KOZMA, R. *et al.* The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. **Mol Cell Biol.**, v. 15, p. 1942–1952, 1995.
- KHALIL, M. *et al.* Functional Role of Transient Receptor Potential Channels in Immune Cells and Epithelia. **Front Immunol.**, v. 9, p. 174, 2018.
- KIM, K. J. *et al.* Astrocyte contributions to flow/pressure-evoked parenchymal arteriole vasoconstriction. **J. Neurosci.**, v. 35, p. 8245–8257, 2015.
- KWON, D. H. *et al.* TRPV4-Rho GTPase complex structures reveal mechanisms of gating and disease. **Nat Commun.**, v. 14, p. 3732, 2023.
- KHANNA, S.; PARDI, D. S. Clinical implications of antibiotic impact on gastrointestinal microbiota and *Clostridium difficile* infection. **Expert Rev Gastroenterol Hepatol.**, v. 1, p. 1145-1152, 2016.
- LEE, C.; C. *et al.* Clinical Significance of Toxigenic *Clostridioides difficile* Growth in Stool Cultures during the Era of Nonculture Methods for the Diagnosis of *C. difficile* Infection. **Microbiol Spectr.**, v. 9, p. e00799-21, 2021.
- LIMA, B.B *et al.* *Clostridium difficile* toxin A attenuates Wnt/ β -catenin signaling in intestinal epithelial cells. **Infect Immun.**, v. 82, p. 2680–2687, 2014.
- LAWSON, P. A. *et al.* Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O’Toole 1935) Prévot 1938. **Anaerobe.**, v. 40, p. 95–99, 2016.
- LESSA FC, WINSTON LG, *et al.* Burden of *Clostridium difficile* infection in the United States. **N Engl J Med.**, v. 372, p. 2369–70, 2015.

- LIU, T. S. *et al.* Protective role of HSP72 against *Clostridium difficile* toxin A-induced intestinal epithelial cell dysfunction. **AJP: Cell Physiol.**, v. 284, n. 4, p. C1073–C1082, 2003.
- LOO, V. G *et al.* A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. **N Engl J Med.**, v. 353, p. 2442–2449, 2005.
- LOO, V. G *et al.* Host and pathogen factors for *Clostridium difficile* infection and colonization. **N Engl J Med.**, v. 3, p. 1693–703, 2011.
- LUIZ, A. *et al.* Identification of *Clostridium difficile* Asymptomatic Carriers in a Tertiary Care Hospital. **Bio Med Res Internat.**, v. 2017, 2017.
- LYERLY, D. M.; KRIVAN, H. C.; WILKINS, T. D. *Clostridium difficile*: Its Disease and Toxins. **Clin Microbiol Ver.**, v. 1, n. 1, p. 1–18, 1988.
- LYON, S. A.; HUTTON, M. L.; ROOD, J. I.; CHEUNG, J. K.; LYRAS, D. CdtR Regulates TcdA and TcdB Production in *Clostridium difficile*. **PLoS Pathog.**, p. 1–19, 2016.
- LAFRANCE, M. E. *et al.* Identification of an epithelial cell receptor responsible for *Clostridium difficile* TcdB-induced cytotoxicity. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 112, p. 7073–8, 2010.
- LOUREIRO, A. V. *et al.* Role of Pannexin-1-P2X7R signaling on cell death and pro-inflammatory mediator expression induced by *Clostridioides difficile* toxins in enteric glia. **Front Immunol.**, v. 13, p. 956340, 2022.
- LIU, C.; YANG, J. Enteric Glial Cells in Immunological Disorders of the Gut. **Front Cell Neurosci.**, v. 16, p. 895871, 2022.
- LÓPEZ-GÓMEZ, L. Nutraceuticals and Enteric Glial Cells. **Molecules.**, v. 26, p. 3762, 2021.
- LOU, J. *et al.* TRPV4 Channel Signaling in Macrophages Promotes Gastrointestinal Motility via Direct Effects on Smooth Muscle Cells. **Immunity.**, v.49, p. 107–119.e4, 2018.
- LI, Y. *et al.* Increased enteric glial cells in proximal margin of resection is associated with postoperative recurrence of Crohn's disease. **J Gastroenterol Hepatol.**, v.33, p. 638-644, 2018.
- LI, Y. *et al.* Activation of TRPV4 Induces Exocytosis and Ferroptosis in Human Melanoma Cells. **Int J Mol Sci.**, v.23, p. 4146, 2022.
- LUFFT, F. Tripping out on TRPV4. **J Mol Med.**, v. 93, p. 1283-5, 2015.
- LE BERRE, C. *et al.* Enteric glia at center stage of inflammatory bowel disease. **Neuroscience Letters.**, v. 809, p. 137315, 2023.
- LIU, T. *et al.* NF- κ B signaling in inflammation. **Signal Transduct Target Ther.**, v. 2, p. 17023, 2017.

MESQUITA, A.M.R.C *et al.* Diarreia nosocomial e outras infecções adquiridas em hospital universitário. **R. Ci. md. Biol.**, n. 85, p. 54–61, 2011.

MANI, N.; DUPUY, B. Regulation of toxin synthesis in *Clostridium difficile* by an alternative RNA polymerase sigma factor. **PNAS.**, v. 98, n. 10, 2001.

MANI, N. *et al.* Environmental Response and Autoregulation of *Clostridium difficile* TxeR , a Sigma Factor for Toxin Gene Expression. **J Bacteriol.**, v. 184, n. 21, p. 5971–5978, 2002.

MARTIN, J. S. H.; MONAGHAN, T. M.; WILCOX, M. H. *Clostridium difficile* infection: Epidemiology, diagnosis and understanding transmission. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol.**, v. 13, n. 4, p. 206–216, 2016.

MATAMOUROS, S.; ENGLAND, P.; DUPUY, B. *Clostridium difficile* toxin expression is inhibited by the novel regulator TcdC. **Mol Microbiol.**,v. 64, p. 1274–1288, 2007.

MATSUSHITA, O.; OKABE, A. Clostridial hydrolytic enzymes degrading extracellular components. **Toxicon.**, v. 39, n. 11, p. 1769–1780, 2001.

MCCOLLUM, D. L.; RODRIGUEZ, J. M. Detection, Treatment, and Prevention of *Clostridium difficile* Infection. **Clin Gastroenterol Hepatol.**, v. 10, n. 6, p. 581–592, 2012.

MERRIGAN, M. *et al.* Human hypervirulent *Clostridium difficile* strains exhibit increased sporulation as well as robust toxin production. **J Bacteriol.**, v. 192, n. 19, p. 4904–4911, 2010.

MONCRIEF, J. S.; BARROSO, L. A.; WILKINS, T. D. Positive Regulation of *Clostridium difficile* Toxins. **Infect Immun.**, v. 65, n. 3, p. 1105–1108, 1997.

MONOT, M. *et al.* *Clostridium difficile*: New Insights into the Evolution of the Pathogenicity Locus. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–13, 2015.

MOORE, R. *et al.* *C. difficile* toxin A increases intestinal permeability and induces Cl⁻ secretion. **Am J Physiol.**, v. 259, p. 165–72, 1990.

MOORE, R. *et al.* Identification of the orphan GPCR, P2Y(10) receptor as the sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid receptor. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 11, p. 707-12, 2008.

MOORE, J. H. *et al.* Correction: Defined Nutrient Diets Alter Susceptibility to *Clostridium difficile* Associated Disease in a Murine Model. **PLoS One**, v. 10, p. e0137037, 2015

MANION, J. *et al.* *C. difficile* toxin A increases intestinal permeability and induces Cl⁻ secretion. **Am J Physiol.**, v. 622, p. 611-618, 2023.

MCCRAY, B. A. *et al.* Neuropathy-causing TRPV4 mutations disrupt TRPV4-RhoA interactions and impair neurite extension. **Nat. Commun.** v. 12, p. 1444, 2021.

MAJHI, R. K. *et al.* Functional expression of TRPV channels in T cells and their implications in immune regulation. **FEBS J.**, v. 282, p. 2661-81, 2015.

MULLISH, B. H.; WILLIAMS, H. R. T. *Clostridium difficile* infection and antibiotic-associated diarrhoea. *Clin Med.*, v. 18, p. 237–241, 2018.

MURTHY, S. K. *et al.* Impact of *Clostridium difficile* colitis on 5-year health outcomes in patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther.*, v. 36, p. 1032-9, 2012.

MODI, S. K. *et al.* Differential binding and internalization of *Clostridium difficile* toxin A by human peripheral blood monocytes, neutrophils and lymphocytes. *Scand J Immunol.*, v. 74, p. 264-271, 2011.

MATTE, S. K. *et al.* Antiapoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-XL inhibit *Clostridium difficile* toxin A-induced cell death in human epithelial cells. *Infect Immun.*, v. 77, p. 5400-10, 2009.

MURAKAMI, M. *et al.* Pleiotropy and Specificity: Insights from the Interleukin 6 Family of Cytokines. *Immunity*, v. 50, p. 812-831, 2019.

MACCHIONI, L. *et al.* Enteric glial cells counteract *Clostridium difficile* Toxin B through a NADPH oxidase/ROS/JNK/caspase-3 axis, without involving mitochondrial pathways. *Sci Rep.*, v. 7, p. 45569, 2017.

Matte, I. *et al.* Antiapoptotic Proteins Bcl-2 and Bcl-XL Inhibit *Clostridium difficile* Toxin A-Induced Cell Death in Human Epithelial Cells. *Infect Immun.*, v. 77, p. 5400-5410, 2009.

NAPOLITANO, L.; M.; EDMISTON, C. E. *Clostridium difficile* disease: Diagnosis, pathogenesis, and treatment update. *Surgery.*, v. 162, n. 2, p. 325–348, 2017.

NORÉN, T. *et al.* Rapid and sensitive loop-mediated isothermal amplification test for *Clostridium difficile* detection challenges cytotoxin B cell test and culture as gold standard. *J Clin Microbiol.*, v. 49, n. 2, p. 710–711, 2011.

NUKUI, M. *et al.* Structure and Molecular Mechanism of *Bacillus anthracis* Cofactor-Independent Phosphoglycerate Mutase: A Crucial Enzyme for Spores and Growing Cells of *Bacillus* Species. *Biophys J.*, v. 92, p. 977–988, 2007.

NG, J. *et al.* *Clostridium difficile* toxin-induced inflammation and intestinal injury are mediated by the inflammasome. *Gastroenterology.*, v. 139, p. 542–52, 2010.

NGUYEN, T. N. *et al.* Diverse Roles of TRPV4 in Macrophages: A Need for Unbiased Profiling. *Front Immunol.*, v. 12, p. 828115, 2021.

NISHIMOTO, R. *et al.* Thermosensitive TRPV4 channels mediate temperature-dependent microglia movement. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v. 27, p. e2012894118, 2021.

NADEZHGIN, K. D. *et al.* Structure of human TRPV4 in complex with GTPase RhoA . *Nat Commun.*, v. 14, p. 3733, 2023.

NG, J. *et al.* *Clostridium difficile* toxin-induced inflammation and intestinal injury are mediated by the inflammasome. *Gastroenterology.*, v. 139, p. 542-52, 552.e1-3, 2010.

OFOSU, A. *Clostridium difficile* infection: a review of current and emerging therapies. **Ann Gastroenterol.**, v. 29, p. 147–54, 2016.

OWENS, R. C. *et al.* Antimicrobial-associated risk factors for *Clostridium difficile* infection. **Clin Infect Dis**, v. 46, p. 19–31, 2008.

OCHOA-CORTES, *et al.* Enteric Glial Cells: A New Frontier in Neurogastroenterology and Clinical Target for Inflammatory Bowel Diseases. **Inflamm Bowel Dis**. v. 22, p. 433-449, 2016.

OLSEN, *et al.* *Clostridium difficile* Infection increases acute and chronic morbidity and mortality. **Infect Control Hosp Epidemiol**. v. 40, p. 65–71., 2019.

PAREDES-SABJA, D.; SHEN, A.; SORG, J. A. *Clostridium difficile* spore biology: Sporulation, germination, and spore structural proteins. **Trends Microbiol.**, v. 22, n. 7, p. 406–416, 2014.

PECHINE, S.; JANOIR, C.; COLLIGNON, A. Variability of *Clostridium difficile* Surface Proteins and Specific Serum Antibody Response in Patients with *Clostridium difficile*-Associated Disease. **J Clin Microbiol.**, v. 43, n. 10, p. 5018–5025, 2005.

PICCIONI, A. *et al.* Gut Microbiota and *Clostridium difficile*: What We Know and the New Frontiers. **Int J Mol Sci.**, v. 23, n. 1, p. 13323, 2022.

PENDERS, J. *et al.* Quantification of *Bifidobacterium* spp., *Escherichia coli* and *Clostridium difficile* in faecal samples of breast-fed and formula-fed infants by real-time PCR. **FEMS Microbiol Letters.**, v. 243, n. 1, p. 141–147, 2005.

PENG, W.-P.; CHOU, S.-W.; PATIL, A. A. Measuring masses of large biomolecules and bioparticles using mass spectrometric techniques. **The Analyst.**, v. 139, n. 14, p. 3507–3523, 2014. Disponível

PETERSON, L. R. *et al.* Detection of Toxigenic *Clostridium difficile* in Stool Samples by Real-Time Polymerase Chain Reaction for the Diagnosis of *C. difficile*-Associated Diarrhea. **Clin Infect Dis.**, v. 45, n. 9, p. 1152–1160, 2007.

PIRES, R. N. *et al.* American Journal of Infection Control *Clostridium difficile* infection in Brazil : A neglected problem? **Am J Infect Control.**, v. 42, n. 4, p. 459–460, 2014.

PAPARELLA, A. S. *et al.* Inhibition of *Clostridium difficile* TcdA and TcdB toxins with transition state analogues. **Nat Commun.**, v. 12, p. 6285, 2021.

PAWOLSKI, V.; SCHMIDT, M. H. H. *et al.* Neuron-Glia Interaction in the Developing and Adult Enteric Nervous System. **Cell.**, v. 10, p. 47, 2021.

POCHARD, C. *et al.* The multiple faces of inflammatory enteric glial cells: is Crohn's disease a gliopathy? **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 325, p. G1-G11, 2018.

PROGATZKY, F.; PACHNIS, V. The role of enteric glia in intestinal immunity. **Curr Opin Immunol.**, v. 77, p. 102183, 2022.

- QIU, H. *et al.* Novel *clostridium difficile* anti-Toxin (TcdA and TcdB) humanized monoclonal antibodies demonstrate in vitro neutralization across a broad spectrum of clinical strains and in vivo potency in a hamster spore challenge model. **PLoS ONE.**, v. 11, n. 6, p. 1–21, 2016.
- QA'DAN, M. *et al.* *Clostridium difficile* toxin B activates dual caspase-dependent and caspase-independent apoptosis in intoxicated cells. **Cell Microbiol.**, v. 4, p. 425–34, 2002.
- RUHL A, TROTTER J, STREMMEL W. Isolation of enteric glia and establishment of transformed enteroglia cell lines from the myenteric plexus of adult rat. **Neurogastroenterol Motil.**, v. 113, p. 95–106, 2001.
- ROCHA, M. F. G. *et al.* *Clostridium difficile* Toxin A Induces the Release of Neutrophil Chemotactic Factors From Rat Peritoneal Macrophages: Role of Interleukin-1beta, Tumor Necrosis Factor Alpha, and Leukotrienes. **Infect Immun.**, v. 65, n. 7, p. 2740–2746, 1997.
- ROCHA, M. F. G. *et al.* Absence of intestinal secretion on supernatants from macrophages stimulated with *Clostridium difficile* toxin B on rabbit ileum. **Toxicon**, v. 39, p. 335–340, 2001.
- RUPNIK, M. *et al.* A novel toxinotyping scheme and correlation of toxinotypes with serogroups of *Clostridium difficile* isolates. **J Clin Microbiol.**, v. 36, p. 2240–2247, 1998.
- RUPNIK, M.; JANEZIC, S. An Update on *Clostridium difficile* Toxinotyping. **J Clin Microbiol.**, v. 54, n. 1, p. 13–18, 2016.
- RUPNIK, M.; WILCOX, M. H.; GERDING, D. N. *Clostridium difficile* infection: New developments in epidemiology and pathogenesis. **Nat Rev Microbiol.**, v. 7, n. 7, p. 526–536, 2009.
- RYAN, A. *et al.* A Role for TLR4 in *Clostridium difficile* Infection and the Recognition of Surface Layer Proteins. **PLoS Pathog.**, v. 7, n. 6, p. E20–76, 2011.
- RESCIGNO, M. Don't forget to have a second brain. **Mucosal Immunology.**, v.1, p. 328–329, 2008.
- ROSENBERG, H.; RAO, M. Enteric glia in homeostasis and disease: From fundamental biology to human pathology. **iScience.**, v.24, p. 102863, 2021.
- RYSKAMP, D. A. *et al.* TRPV4 regulates calcium homeostasis, cytoskeletal remodeling, conventional outflow and intraocular pressure in the mammalian eye. **Scientific Reports.**, v. 6, 2016
- SANDERS, N. L. *et al.* Appendectomy and *Clostridium difficile* colitis: Relationships revealed by clinical observations and immunology. **World J Gastroenterol.**, v. 19, n. 34, p. 5607–5614, 2013.
- SCHÄFFLER, H.; BREITRÜCK, A. *Clostridium difficile* – From Colonization to Infection. **Front Microbiol.**, v. 9, p. 1–12, 2018.

SCHEEPERS, L. *et al.* The intestinal microbiota composition and weight development in children : the KOALA Birth Cohort Study. **Int J Obes (Lond)**., v. 39, n. 1, p. 16–25, 2014.

SCHENCK, L. P.; BECK, P. L.; MACDONALD, J. A. Gastrointestinal dysbiosis and the use of fecal microbial transplantation in *Clostridium difficile* infection. **World J Gastrointest Pathophysiol.**, v. 6, n. 4, p. 169–180, 2015.

SMITS, W. K. *et al.* *Clostridium difficile* infection. **Nat Rev Dis Primers.**, v. 7, p. 1–47, 2016.

STAMPER, P. D. *et al.* Comparison of a commercial real-time PCR assay for tcdB detection to a cell culture cytotoxicity assay and toxigenic culture for direct detection of toxin-producing *Clostridium difficile* in clinical samples. **J Clin Microbiol.**, v. 47, n. 2, p. 373–378, 2009.

STARE, B. G.; DELME, M. Variant forms of the binary toxin CDT locus and tcdC gene in *Clostridium difficile* strains. **J Med Microbiol.**, v. 56, p. 329–335, 2007.

STECHER, B.; MAIER, L.; HARDT, W. D. “Blooming” in the gut: How dysbiosis might contribute to pathogen evolution. **Nat Rev Microbiol.**, v. 11, n. 4, p. 277–284, 2013.

SVENSSON, A. M.; LASALA, P. R. Pathology consultation on detection of *clostridium difficile*. **Am J Clin Pathol.**, v. 137, n. 1, p. 10–15, 2012.

SWINDELLS, J. *et al.* Evaluation of diagnostic tests for *Clostridium difficile* infection. **J Clin Microbiol.**, v. 48, n. 2, p. 606–608, 2010.

SEHR, P. *et al.* Glucosylation and ADP ribosylation of rho proteins: effects on nucleotide binding, GTPase activity, and effector coupling. **Biochemistry.**, v. 37, p. 5296–5304, 1998.

SANTOS, J. A.; PEREIRA, P. J. B.; MACEDO-RIBEIRO, S. What a difference a cluster makes: The multifaceted roles of IscR in gene regulation and DNA recognition. **Bioch Biophys Acta.**, v. 1854, p. 1101–1112, 2015.

SHEPARD, W. *et al.* Insights into the Rrf2 repressor family – the structure of CymR , the global cysteine regulator of *Bacillus subtilis*. **FEBS J.**, v. 278, p. 2689–2701, 2011.

SANTOS, J. A. *et al.* The unique regulation of iron-sulfur cluster biogenesis in a Gram-positive bacterium. **PNAS.**, v. 111, p E2251–E2260, 2014.

SANTOS, A. A. Q. A. *et al.* P2X7 receptor blockade decreases inflammation, apoptosis, and enteric neuron loss during *Clostridioides difficile* toxin A-induced ileitis in mice. **World J Gastroenterol.**, v. 28, p. 4075–4088, 2022.

SEGUELLA, L.; GULBRANSEN, B. D. Enteric glial biology, intercellular signalling and roles in gastrointestinal disease. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol.**, v. 18, p. 571–5878, 2021.

SEHGAL, K. *et al.* The interplay of *Clostridioides difficile* infection and inflammatory bowel disease. **Therap Adv Gastroenterol.**, v. 14, p. 1–10, 2021.

SEHGAL, K.; KHANNA, S. Gut microbiome and *Clostridioides difficile* infection: a closer look at the microscopic interface. **Therap Adv Gastroenterol.**, v. 14, p. 1–9, 2021.

SORET, R. *et al.* Characterization of human, mouse, and rat cultures of enteric glial cells and their effect on intestinal epithelial cells. **Neurogastroenterol. Motil.**, v. 25, p. 755-64, 2013.

TAO, L. *et al.* Frizzled proteins are colonic epithelial receptors for *C. difficile* toxin B. **Nature.**, v. 538, p. 350–355, 2016.

STUMPO, D. J. *et al.* Inflammation: Cytokines and RNA-based Regulation. **Wiley Interdiscip Rev RNA.**, v. 1, p. 60-80, 2010.

TINOCO-VERAS, C. M. *et al.* Transforming Growth Factor β 1/SMAD Signaling Pathway Activation Protects the Intestinal Epithelium from *Clostridium difficile* Toxin A-Induced Damage. **Infect Immun.**, v. 85, n. 10, p. 1–13, 2017.

TURECKOVA, J. *et al.* Astrocytic TRPV4 Channels and Their Role in Brain Ischemia. **Int J Mol Sci.**, v. 24, p. 7101, 2023.

TAKAHASHI, N. *et al.* TRPV4 channel activity is modulated by direct interaction of the ankyrin domain to PI(4,5)P(2). **Nat. Commun.**, v. 5, p. 4994, 2014.

TETLOW, A. L.; TAMANOI, F. The Ras superfamily G-proteins. **The Enzymes.** v.33, p. 1–14, 2013.

TURCO, F. *et al.* Enteroglial-derived S100B protein integrates bacteria-induced Toll-like receptor signalling in human enteric glial cells. **Gut.**, v. 63, p. 105-15, 2014.

VON BOYEN, W. *et al.* Nerve growth factor secretion in cultured enteric glia cells is modulated by proinflammatory cytokines. **J Neuroendocrinol.**, v. 18, p. 1365-2826, 2006.

VON BOYEN, W. *et al.* The endothelin axis influences enteric glia cell functions. **Med Sci Moni.**, v. 16, p. BR161-7, 2010.

VOTH, D. E.; BALLARD, J. D. *Clostridium difficile* Toxins: Mechanism of Action and Role in Disease. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 18, n. 2, p. 247–263, 2005.

VARADARAJAN, S. *et al.* Mechanosensitive calcium flashes promote sustained RhoA activation during tight junction remodeling. **J. Cell Biol.**, v. 221, p. e202105107, 2022.

WARNY, M. *et al.* Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. **Lancet.**, v. 366, p. 1079–1084, 2005.

WU, D. *et al.* Effects of *Clostridium difficile* toxin A and B on human T lymphocytes migration. **Toxins**, v. 4, p. 926-938, 2013.

WEISE, J. J. *et al.* Myenteric Plexus Immune Cell Infiltrations and Neurotransmitter Expression in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. **Journal of Crohn's and Colitis.**, v. 11, p. jjad122, 2023.

WOLF, J. *et al.* Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system. *Cytokine.*, v. 70, p. 11-20, 2014.

YUAN, P. *et al.* Chondroitin sulfate proteoglycan 4 functions as the cellular receptor for *Clostridium difficile* toxin B. **Cell Res.**, v. 25, p. 157–68, 2015.

YOSHINO, Y. *et al.* *Clostridium difficile* flagellin stimulates toll-like receptor5 , and toxin B promotes fl agellin-induced chemokine production via TLR5. **Life Sci.**, v. 92, n. 3, p. 211–217, 2013.

YU, Y.; LI, Y. Enteric glial cells and their role in the intestinal epithelial barrier. **World J Gastroenterol.**, v. 20, p. 11273–280, 2014.

YE, L. Enteroendocrine cells sense bacterial tryptophan catabolites to activate enteric and vagal neuronal pathways. **Cell Host Microbe.**, v. 29, p. 179-196, 2020.

YIN, J. *et al.* Role of Transient Receptor Potential Vanilloid 4 in Neutrophil Activation and Acute Lung Injury. **Am J Respir Cell Mol Biol.**, v. 54, p. 370-83, 2016.

YU, H. *et al.* Cytokines Are Markers of the *Clostridium difficile*-Induced Inflammatory Response and Predict Disease Severity. **Clin Vaccine Immunol.**, v. 24, p. e00037-17, 2017.

ZHANG, Y. *et al.* *Clostridium difficile* toxin B recombinant protein inhibits tumor growth and induces apoptosis through inhibiting Bcl-2 expression, triggering inflammatory responses and activating C-erbB-2 and Cox-2 expression in breast cancer mouse model. **Biomed Pharmacother.**, v. 101, p. 391–398, 2018.

ZHANG, M. *et al.* Organellar TRP Channels. **Nat Struct Mol Biol.**, v. 25, p. 1009–1018, 2018.

ZIELINSKA, Y. *et al.* Role of transient receptor potential channels in intestinal inflammation and visceral pain: novel targets in inflammatory bowel diseases. **Inflamm Bowel Dis.**, v. 21, p. 419-27, 2018.

ZHANG, Q. *et al.* Involvement of Sensory Neurone-TRPV4 in Acute and Chronic Itch Behaviours. **Acta Derm. Venereol.**, v. 102, p. adv00651, 2022.

ZHANG, Q. *et al.* *Clostridium difficile* Toxin A Induces Reactive Oxygen Species Production and p38 MAPK Activation to Exert Cellular Toxicity in Neuronal Cells. **J Microbiol Biotechnol.**, v. 27, p. 1163-1170, 2022.

ZHANG, M. *et al.* TRP (transient receptor potential) ion channel family: structures, biological functions and therapeutic interventions for diseases. **Nat.**, v. 8, p. 261, 2023.

APÊNDICE

➤ Fármacos

Fármacos	Fabricante	Código do produto
GSK1016790A	Interprise-Cayman	942206-85-1
RN-1734	Interprise-Cayman	946387-07-1

➤ Reagentes e materiais

Reagentes/materiais	Fabricante	Código do produto
Albumina sérica bovina	Sigma-Aldrich	A2153-100
<i>Antifade Prolong Gold</i> contendo DAPI	Thermo Scientific	P36931
Brometo de tiazolil azul de tiazolil (MTT)	Sigma-Aldrich	M2128
DAB	Dako	K3468
Dako <i>Pen</i>	Dako	52002
Diluinte do anticorpo	Spring Bioscience	ADS-125
DNase I	Invitrogen	18068-015
Inibidor de protease	Sigma-Aldrich	P8340
<i>Gel BIS-Tris 4-12%</i>	Invitrogen	NP0322BOX
High Capacity cDNA (Kit de transcriptase reversa)	Applied biosystems	4368814
Tampão da amostra (Western Blotting)	Biorad	1610737
TEMED	Biorad	1610801
Peróxido de hidrogênio	Abcam	Ab64218
Kit de dosagem de proteína	Thermo Scientific	23227
Kit de extração do RNA	Promega	Z3105
Membrana de nitrocelulose	Invitrogen	LC2000/LC2006
<i>Precision Plus Protein Kaleidoscope</i> (Western Blotting)	Biorad	1610375
Reagente A e B (dosagem de citocinas)	R&D Systems	DY999
Reagente diluente (dosagem de citocinas)	R&D Systems	DY995
Solução de parada (dosagem de citocinas)	R&D Systems	DY994
Solução de paraformaldeído	Alfa Aesar	43388
SYBER Green PCR master mix	Applied biosystems	4309155
Tris Base	Promega	H5135
Triton-X-100	Sigma-Aldrich	T8787
TWEEN 20	Biorad	1706531

ARTIGOS SUBMETIDOS**TRPV4 modulates Inflammatory Responses and Apoptosis in Enteric Glial Cells
Triggered by *Clostridioides difficile* Toxins A and B**

Dvison de Melo Pacífico¹, Maria Lucianny Lima Barbosa¹, Conceição Silva Martins Rebouças¹, Simone de Goes Simonato¹, Deiziane Viana da Silva Costa², Francisco Maick dos Santos Marques¹, Maria Luana Gaudencio dos Santos Morais¹, Renata Ferreira de Carvalho Leitao^{1*}, Gerly Anne de Castro Brito¹.

¹Department of Morphology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil.

²Division of Infectious Diseases and International Health, University of Virginia, Charlottesville, Virginia, VA, United States.

***Correspondence:** Renata Ferreira de Carvalho Leitão, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará. 60430-170 Fortaleza, CE, Brazil (renata.carvalho@ufc.br)

Abstract

Clostridioides difficile, a spore-forming anaerobic bacterium, is the primary cause of hospital antibiotic-associated diarrhea. Key virulence factors, toxins A (TcdA) and B (TcdB), significantly contribute to *C. difficile* infection (CDI). Yet, the specific impact of these toxins, particularly on enteric glial cells (EGCs), still needs to be fully understood. This study examines the role of the transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4), a calcium-

permeable channel, in the inflammatory response and apoptosis of EGCs induced by TcdA and TcdB, and evaluates TRPV4 expression in the cecum and colon of infected mice. EGCs were treated with TcdA (50ng/mL) or TcdB (1ng/mL) for 18 hours, with or without the TRPV4 antagonist RN-1734 (100 μ M), to assess TRPV4 gene and protein levels, inflammatory markers, and cell death. CDI mice were euthanized on day 3 post-infection for TRPV4 expression in the cecum and colon. Findings reveal that EGCs naturally express TRPV4, increasing its expression by TcdA and TcdB exposure. CDI significantly upregulates TRPV4 in the cecum and colon's submucosal and myenteric plexus regions. TRPV4 mediates TNF- α release in EGCs and is partially involved in the increase in IL-6 gene expression triggered by these toxins. Our results highlight TRPV4's role in triggering EGC apoptosis via caspase 3 activation and inhibiting the reduction of Bcl-2, an anti-apoptotic protein in EGCs, caused by *C. difficile* toxins. These results highlight TRPV4's significant role in CDI pathogenesis and its potential as a therapeutic target to counteract the detrimental effects of *C. difficile* toxins on enteric glia.

Keywords: *C. difficile*; Enteric glia; TRPV4; Inflammation; Cell death.

Introduction

Clostridioides difficile (*C. difficile*), a Gram-positive, spore-forming anaerobic bacterium, found in the human gastrointestinal tract, has emerged as a significant enteropathogen, largely attributed to its association with antibiotic use, which disrupts the natural microbial balance [1, 2]. This bacterium produces a range of proteins critical to its pathogenicity. Among these, toxins A (TcdA) and B (TcdB) are particularly noteworthy as the

primary virulence factors, directly contributing to the clinical symptoms and outcomes of *C. difficile* infection (CDI) [3].

The cytotoxic effects of *C. difficile* toxins allow the pathogen to infiltrate the deeper layers of the intestinal mucosa, impacting not only the intestinal mucosal cells but also cells within other layers of the intestine [4]. Specifically, enterocytes, colonocytes, and enteric neurons are particularly vulnerable to the cytotoxic impacts of TcdA and TcdB, leading to a wide range of clinical manifestations seen in CDI [5-7]. Recent research, including studies from our group, has demonstrated the role of EGCs in the pathophysiology of CDI [8-10].

EGCs, specialized non-neuronal glial cells within the ENS, are distributed throughout the intestinal tract [11]. As integral components of the ENS, EGCs play crucial roles in maintaining the normal function of the intestinal tract under physiological conditions, regulating gut motility, intestinal barrier integrity, and the modulation of immune responses. Beyond their established roles in normal physiological processes, EGCs have also been documented in the literature as playing critical roles in various intestinal pathophysiological conditions, including Crohn's disease, ulcerative colitis, irritable bowel syndrome, and CDI [12,13]. The pivotal role of these cells in gastrointestinal disorders underscores their substantial contributions to gut health and their involvement in inflammatory responses through dynamic interactions with other cell types in the complex gut environment [11]. However, the precise mechanisms these cells impact such processes still need to be fully understood. This area of research has been relatively overlooked within the scientific community, particularly compared to the extensive research focused on other gut cell types, such as epithelial cells. Our study aims to address this gap by spotlighting the effects of *C. difficile* toxins on EGCs.

The transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) is among the most extensively studied members of the Transient Receptor Potential (TRP) ion channels superfamily. It

functions as a polymodal cation channel with high permeability to Ca^{2+} , activated by various physical and chemical stimuli such as heat, cellular swelling, and endogenous ligands, including arachidonic acid and its metabolites [14-17]. TRPV4 expression has been identified in the myenteric plexus of the human colon and immune system cells, such as macrophages, neutrophils, and dendritic cells [16-18]. Moreover, TRPV4 shows widespread expression in the stomach, small intestine, and colon within the intestinal tract of rodents [19].

The association of TRPV4 with the pathophysiology of inflammatory bowel disease (IBD) [20] underscores its significance in intestinal inflammation research, spotlighting its potential contribution to the mechanisms driving intestinal disorders. Despite its established involvement in IBD, a condition closely associated with an increased risk of CDI, the specific role of TRPV4 in the pathophysiology of CDI remains unexplored in current scientific literature.

For the first time, this research explores whether EGCs express TRPV4 under physiological conditions and during CDI. Furthermore, it aimed to investigate the role of this receptor in modulating the inflammatory response and cell death induced by *C. difficile* toxins in EGCs.

Methods

***In vitro* Studies**

Rat Enteric Glial Cell culture and treatment

The immortalized EGC line used in this study comes from the jejunum region of *Rattus norvegicus* ATCC (PK060399egfr CRL-2690, Virginia-United States). These cells have demonstrated morphological and functional characteristics comparable to primary enteric glial cells [21].

EGCs were cultured in DMEM medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco) and supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% antibiotics (100 mg/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin, Gibco), and 1 mM sodium pyruvate (Gibco) at 37°C in a humidified incubator under 5% CO₂ for no more than 25 passages. For all experiments in this research, EGCs were released from the culture flasks using 0.05% trypsin-EDTA for 5 min. The cells were incubated with the TRPV4-specific antagonist (RN-1734 – 100µM, Cayman, 946387-07-1) for 1 h before incubation with TcdA (50ng/mL) or TcdB (1ng/mL). The concentration of RN-1734 was obtained from the results of the MTT assay (Fig. S1 – supplementary material). Furthermore, it is worth highlighting that TcdA and TcdB used in the study were purified from TechLab (Virginia-United States), and these in turn, were produced by the *C. difficile* strain VPI10463.

Quantitative real-time PCR (qPCR)

Initially, we aimed to determine whether EGCs express the TRPV4 receptor, establishing this as a prerequisite for advancing our research. To achieve this objective, we investigated the gene expression of TRPV4 by the Polymerase Chain Reaction (PCR). Subsequently, our research extended to examine other genes that may play a role in the pathophysiology of CDI, such as interleukin-6 (*IL-6*), interleukin-1 beta (*IL1-β*), and antiapoptotic B-cell lymphoma family gene 2 (*bcl-2*) genes, using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as the reference gene.

EGCs (6x10⁵ cells/well), at passage 20, were cultivated in 6-well plates and incubated with TcdA (50ng/mL) or TcdB (1ng/mL) for 18h. The control group of cells was cultured exclusively in a culture medium (DMEM), without exposure to *C. difficile* toxins (control). After incubation, total RNA extraction was performed using a RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) on the QIAcube platform (Qiagen). Furthermore, RNA was quantified

using the equipment Nanodrop. The RNA's purity was evaluated using the following proportions: nucleic acids/proteins (260/280) and nucleic acids/other contaminants (260/230). Then, the RNA underwent reverse transcription using a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's protocol.

Amplification of TRPV4, GAPDH, *IL-6*, *IL1- β* , and *bcl-2* genes in cell samples was carried out using the StepOne apparatus. Amplification of specified genes in EGC samples was performed using a CFX Connect system (Bio-Rad) with the following conditions: 95°C for 30 s, 40 cycles of 95°C for 5 s, and 60°C for 30 s, and analysis of the melting curve from 65 to 95°C in increments of 0.5°C for 2 s each. Gene expression was calculated by the Livak & Schmittgen method ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

Following the same procedural steps described, the cells were co-incubated for 18 hours with either TcdA or TcdB and the TRPV4 pharmacological modulator (RN-1734). We have also analyzed and compared the protein and gene expression profiles when cells were pre-treated with the TRPV4 modulator for one hour before toxin exposure. The primer sets used for these experiments are listed in Supplementary Material (Table S1).

Western blotting Analysis

To assess the expression of TRPV4 protein, EGCs (6×10^5 cells/well) were seeded into 6-well plates and subsequently incubated with TcdA or TcdB for 18h.

Following incubation, the supernatant was discarded, and the cells were lysed with RIPA lysis buffer (Thermo Fisher Scientific, containing EDTA and phosphatase-free protease inhibitor). The lysate was centrifuged for 17min, at 4°C and 13,000rpm, and the supernatant was collected for further analysis.

Protein concentrations were determined using the bicinchoninic acid assay following the manufacturer's instructions (Thermo Fisher Scientific). Forty micrograms of protein,

previously mixed with Laemmil sample buffer and β -mercaptoethanol, were denatured at 95°C for 5 min. Subsequently, these proteins were separated on 10% BIS-Tris gel and transferred onto PVDF membranes for 2 h.

Following the transfer, the membranes were blocked with a 5% blocking solution (BioRad) at room temperature for 1 h. They were then incubated overnight at 4°C with primary antibodies (anti- α -tubulin 1:500, Sigma-Aldrich T8203 and anti-TRPV4 1:2000, abcam39260). After primary antibody incubation, membranes were exposed to secondary antibodies (anti-mouse 1:500 and anti-rabbit 1:500) for 1 h and 30 minutes. Membranes were washed in Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20 (TSB-T) and then incubated with Enhanced Chemiluminescence – ECL (Biorad 1705060). The chemiluminescence signal was detected using a ChemiDoc system (BioRad). Densitometric quantification of bands was performed using ImageLab software (BioRad).

In a distinct experimental set, replicating all the previously described procedural steps, the protein expression of cleaved caspase-3 (an apoptosis marker) was assessed in EGCs exposed to TcdA and TcdB, in the presence or absence of the TRPV4 antagonist. Specifically, cells were pretreated with RN-1734 (100 μ M) 1 hour before toxin incubation. The antibodies used included primary antibodies (β -actin 1:200, Santa Cruz sc-7210; cleaved Caspase-3, 1:400, Millipore AB3623) and the secondary antibody (anti-rabbit; 1:400).

Immunofluorescence

Immunofluorescence was performed to investigate the localization of the TRPV4 receptor in EGCs following an 18-hour treatment with TcdA or TcdB. EGCs at passage 17 were seeded in 24-well plates (4x10⁴ cells/well). After the 18h incubation period with the toxins, the cells were fixed in 4% paraformaldehyde (500 μ L per well) for 15 minutes,

followed by permeabilization in PBS containing 0.025% Triton X100 (Sigma-Aldrich) and 0.2% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich) for 15 minutes. After permeabilization, cells were blocked with 0.25% Triton X100 (Sigma-Aldrich) and 5% BSA (Sigma-Aldrich) in PBS at room temperature for 1 hour, then washed with a washing solution. Then, the cells were incubated with an anti-TRPV4 primary antibody (1:1000, abcam39260) at 4°C overnight. After three washes with wash buffer (0.01% Tween 20 in PBS), cells were overnight incubated with AlexaFluo 488 secondary antibody (1:400, Invitrogen). Following a wash with PBS, cells were mounted with ProLong Gold antifade reagent containing DAPI (Thermo Scientific, P36931). The samples were visualized by confocal fluorescence microscopy (LM10-Confocal Zeiss).

Immunofluorescence for TRPV4 was assessed from ten digital images captured in each section, with four samples per group. The quantification of the average positive fluorescence intensity was measured using Zeiss software.

In a separate experimental set, to assess the impact of blocking TRPV4 with RN-1734) on the nuclear translocation of the transcription factor NFκBp65 in EGCs, as well as its effect on the expression of TNF-α, cells were pre-incubated with RN-1734 1 hour before to exposure to TcdA and TcdB. The primary antibodies used were anti-NFκBp65 (1:500, Abcam 16502) and anti-TNF-α (1:500, Abcam 6671), along with the secondary antibody (Alexa Fluor 488, 1:400 , Invitrogen).The remaining steps of the procedure were carried out as previously described, with an average of 10 images acquired per slide. The average TNF-positive fluorescence intensity was quantified using Zeiss software. For the NFκBp65 protein, 100 cells were counted, and the percentage of cells (%) exhibiting positive nuclear immunostaining for NFκBp65 was determined.

Realtime-Glo annexin V apoptosis assay

Cell death was assessed using a live cell real-time assay (Realtime-Glo annexin V apoptosis assay, Promega, JA1000), following the manufacturer's instructions. EGCs (10^4 cells/well), at passage 20, were seeded in white tissue culture-treated 96-well plates (Falcon, solid white bottom). These cells were incubated with TcdA or TcdB for 18h, in either the absence or presence of RN-1734, added 1h before exposure to the *C. difficile* toxins. Subsequently, 200 μ L of 2x detection reagent containing 2 μ L of annexin NanoBit substrate, 2 μ L of CaCl₂, 2 μ L of annexin V-SmBit, and 2 μ L of annexin V-LgBit in 1000 μ L of pre-warmed, supplemented DMEM was added to each well. The cells were then incubated at 37°C in a humidified incubator under 5% CO₂. Luminescence readings were recorded using a luminometer (NanoLuc technology ready, Promega). The intrinsic luminescence of the reagent (no-cell, no-compound background control) was subtracted from the sample luminescence signals. The adjusted values were normalized against the mean of control cells to obtain the relative luminescent units (RLUs).

***In vivo* Studies**

Mice

Male C57BL/6 mice, 8 weeks old, were obtained from the Jackson Laboratory, Farmington, US. Furthermore. These animals were accommodated in polypropylene cages lined with wood shavings, with bedding changes occurring twice a week. Throughout the experiments, the animals were maintained in consistent environmental conditions (temperature: 22°C \pm 2°C, with air exhaustion, and a 12h light/12h dark cycle). They had unrestricted access to water and standard chow ad libitum. The study's experimental protocol received approval from the Ethics of Animal Experiments Committee at the University of Virginia (Protocol number 4096).

***C. difficile* infection model**

The murine CDI model utilized in this study follows a well-established protocol due to its ability to mimic clinical symptoms, such as severe diarrhea, presented by humans with CDI [8]. This model consists of disturbing the animal's microbiota and thus facilitating colonization or infection by *C. difficile* in wild-type (WT) C57BL/6 mice (n=6 for each group). The animals received a cocktail of antibiotics in their drinking water for 3 days, consisting of 0.035 mg per mL of gentamicin, 850 U per mL of colistin, 0.215 mg per mL of metronidazole and 0.045 mg per mL of vancomycin, as illustrated in Fig. 1. Following a 1-day antibiotic-free period, the animals received an intraperitoneal injection of clindamycin (32 mg per kg, i.p.) 1 day before *C. difficile* challenge. Subsequently, 10^5 CFU (in 100 μ L of chopped meat broth, a pre-reduced medium) of the vegetative *C. difficile* strain VPI10463 (ATCC 43255, *tcdA*+*tcdB*+*cdtB*-) was administered by oral gavage. Control mice received chopped meat broth (100 μ L). The mice's weight and disease symptoms development were monitored daily. Three days after infection, animals were euthanized using a combination of ketamine (180 mg.kg; i.p) and xylazine (15 mg/kg, i.p.). Segments from the cecum and colon were collected and processed for immunohistochemistry analysis.

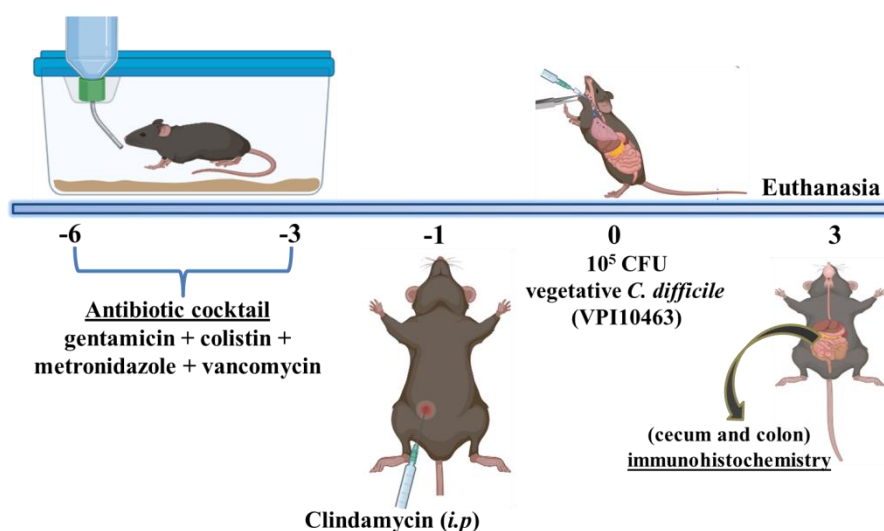


Fig. 1: *C. difficile* infection model induction scheme

Immunohistochemistry

Sections (4 μm thick) were prepared from paraffin-embedded mouse cecum and colon tissues. After deparaffinization, antigens were recovered by incubating the slides in citrate buffer (pH 9.0) for 20 min at 95°C in a PT link tank (DAKO). To reduce non-specific binding, endogenous peroxidase was blocked with 3% H₂O₂ for 10 min. The sections were then incubated overnight with an Anti-TRPV4 antibody (ab39260, Abcam, 1:1000), followed by a 30-minute incubation with polymer HRP (K8000, Dako). The antibody-binding sites were visualized by incubating the samples with diaminobenzidine–H₂O₂ (DAB, Dako) solution. The brown coloration identified positive staining, and the number of immunostaining cells was quantified using the ImageJ Software, counting cells with positive staining in ten different fields per slide (considering 1 slide per animal and four specimens per group) [22].

Statistical analysis

All quantitative results obtained in this research were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical analysis of the data was performed using *GraphPad Prism* software, version 8.0. The Student's t-test was used to compare the means between two groups, and the analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test was used to compare the means among three or more groups. A p-value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

Results

TcdA and TcdB lead to an upregulation of TRPV4 gene and protein expression in enteric glia cells (EGCs)

We found that EGCs constitutively express the TRPV4 receptor and that TcdA and TcdB significantly increased ($p < 0.0001$) the basal TRPV4 gene expression in EGCs after 18-hour incubation with the toxins (Fig. 2A).

In addition, both toxins significantly increased the TRPV4 protein expression in EGCs detected by Western Blot over the 18-hour incubation period compared to the control group (Fig. 2B).

Supporting the Western Blot findings, Fig. 2C, illustrates the cytoplasmic immunostaining of the TRPV4 receptor in EGCs (green). Notably, upon exposure to TcdA and TcdB, there was a noticeable increase in the immunostaining of this receptor in EGCs compared to the control group. Consistent with these qualitative observations (Fig. 2C), the quantification of the fluorescence intensity of TRPV4 immunostaining revealed that TcdA and TcdB significantly increased TRPV4 protein expression in EGCs compared to the control group (Fig. 2D).

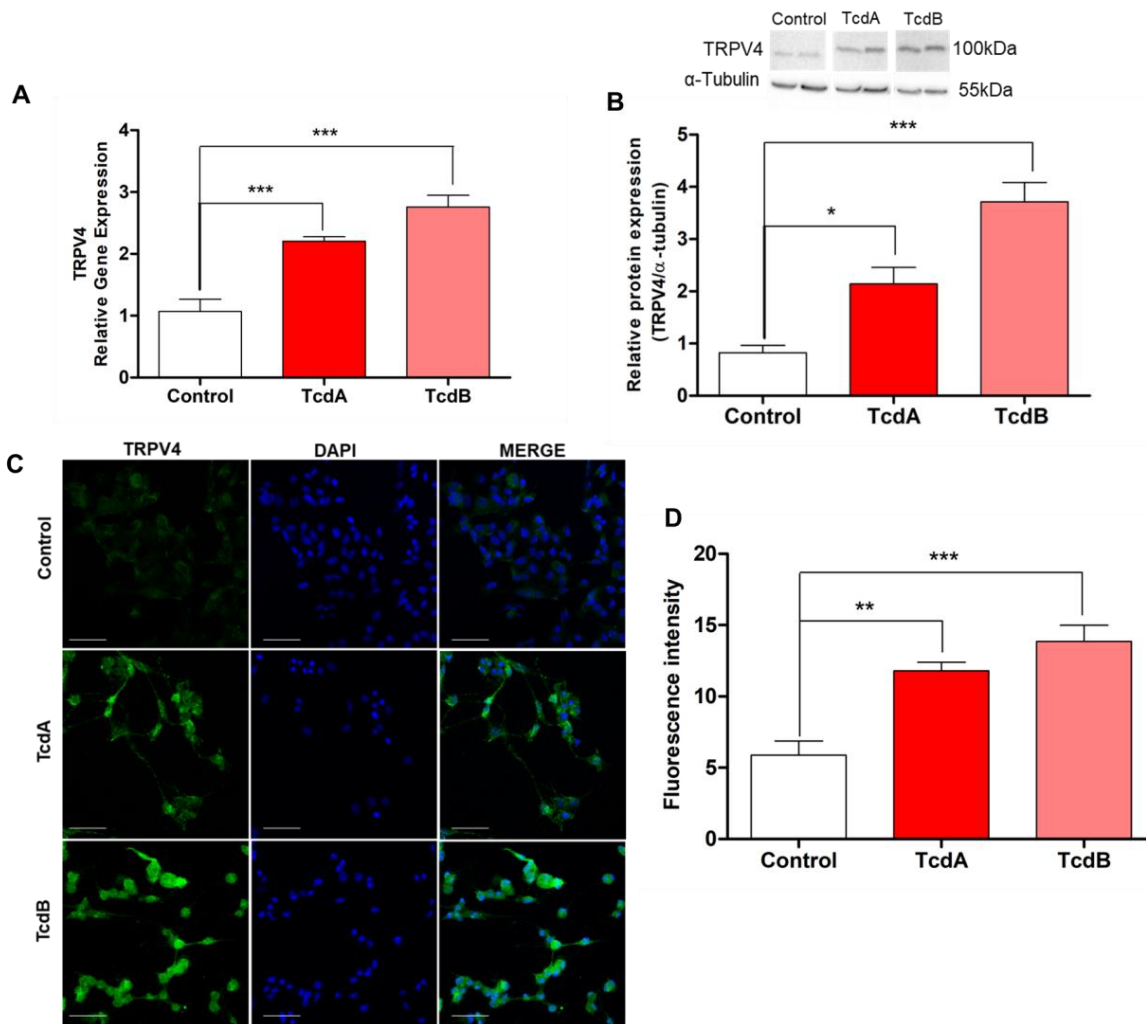


Fig 2 – *C. difficile* toxins A (TcdA) and B (TcdB) increase TRPV4 gene and protein expression in enteric glia cells (EGCs) in vitro. A) Administration of TcdA (50ng/mL) and TcdB (1ng/mL) led to a significant elevation in TRPV4 gene expression in EGCs. The gene expression was evaluated by qPCR after incubating EGCs with the toxins for 18 hours. The data are presented as mean \pm SEM of the relative expression of TRPV4. Statistical significance was determined using the one-way ANOVA and Tukey tests; *** p <0.0001. B) TcdA and TcdB significantly increase TRPV4 protein expression in EGCs, assessed by Western Blotting. Data are presented as mean \pm SEM, normalized to α -tubulin for comparison. Statistical significance was determined using the one-way ANOVA and Tukey

tests. * $p < 0.001$ and *** $p < 0.0001$. C) Exposure to TcdA and TcdB increases the cytoplasmic immunostaining of TRPV4 in EGCs. Photomicrographs showcase the cytoplasmic immunostaining of TRPV4 (green), the nuclear staining with DAPI (blue), and the merged images (MERGE). D) illustration of the quantification of the mean fluorescence intensity of TRPV4 immunostaining in EGCs, measured using Zeiss software. The results are expressed as mean \pm SEM of TRPV4 immunostaining fluorescence intensity. Statistical significance was determined using the one-way ANOVA and Tukey tests. * $p < 0.001$ and *** $p < 0.0001$.

***C. difficile* infection increases TRPV4 expression in the cecum and colon of mice**

As shown in Fig. 3A, TRPV4 is naturally expressed in the cecum and colon's submucosal (orange arrows) and myenteric plexus regions (red arrow) of healthy mice (control). Following a *Clostridium difficile* infection (CDI), there was a marked elevation in the expression of this receptor across both the cecum and colon areas. Notably, an increase in TRPV4 immunostaining was observed in the epithelial, submucosal, and myenteric plexus cells of infected mice (green arrow) compared to the control group, which was not infected. Furthermore, increased immunostaining in immune cells (yellow arrows) can also be observed in infected animals.

The quantification of TRPV4-positive cells demonstrates a significant impact of CDI on TRPV4 expression (Fig. 3B). There was a significant increase in the number of these cells in the infected group within both the cecum and colon compared to their respective control groups, as illustrated in Fig. 3B. This evidence further supports the involvement of this receptor in the context of the infection, highlighting its potential role in mediating the immune response to CDI.

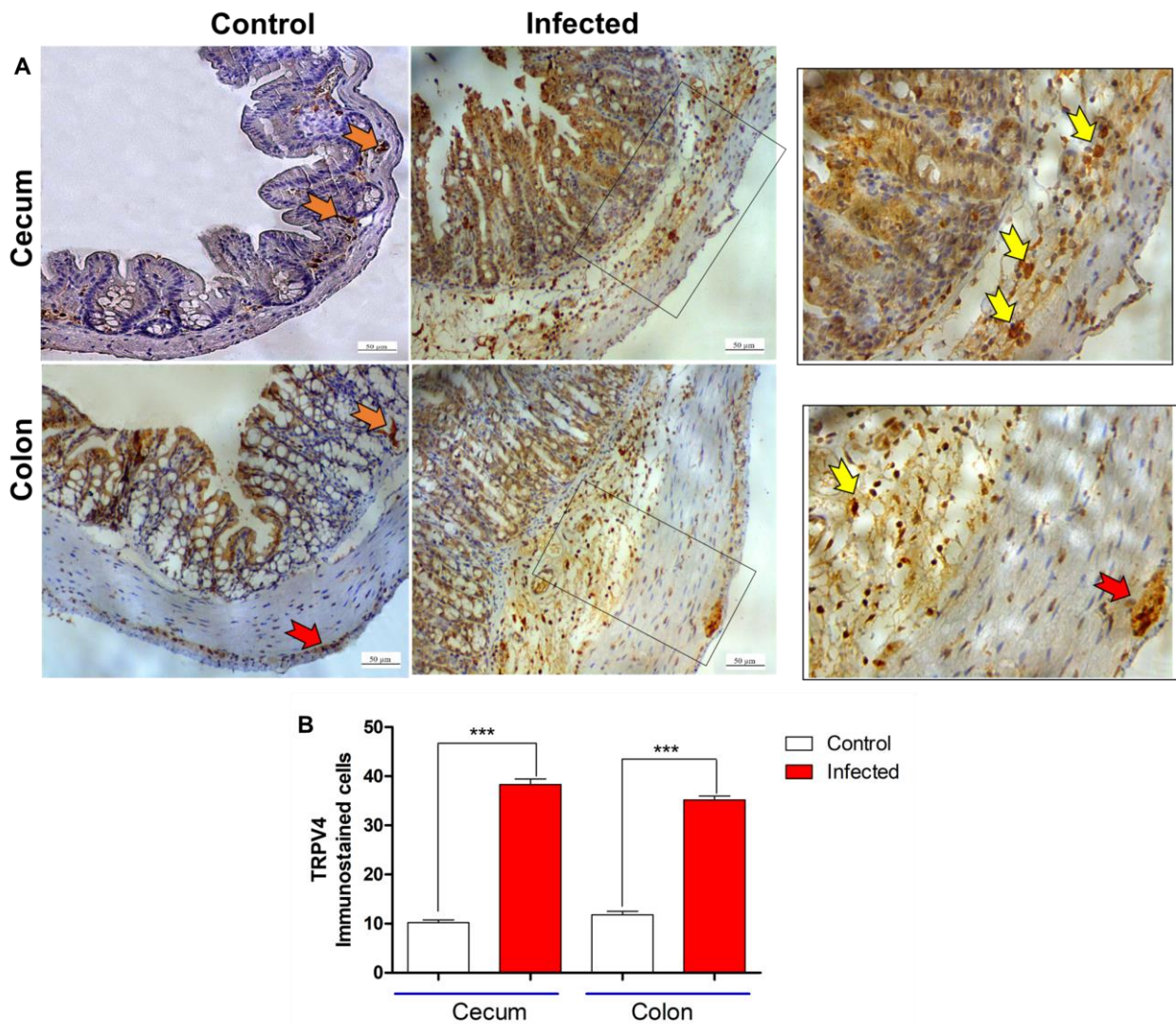


Fig. 3 – *C. difficile* infection increases the expression of TRPV4 in the cecum and colon of infected mice. A) Photomicrographs showing the immunohistochemical staining for TRPV4 within the intestinal regions (cecum and colon) of uninfected mice and those subjected to CDI. In the control group of uninfected animals, TRPV4 is constitutively expressed in the submucosal (orange arrow) and myenteric plexus (red arrow), In animals exposed to CDI, a pronounced increase in immunostaining is observed in the cecum and colon, particularly in immune cells (yellow arrows) and in the myenteric plexus (red arrow), clearly observed at 400x magnification. The standard images were taken at 100x magnification. Scale bar = 50 μ m. B) The graph represents the mean \pm SEM of the number of immunopositive cells for

TRPV4 in the cecum and colon of mice subjected to CDI (infected group) and non-infected (control group). Statistical analysis was conducted using the Student's t test was used. *** $p < 0.0001$.

Blocking TRPV4 by RN-1734 reduces the nuclear translocation of NF κ Bp65 in enteric glia cells (EGCs) triggered by TcdA and TcdB

To assess the involvement of TRPV4 in the activation of the NF κ B transcription factor in EGCs upon exposure to TcdA and TcdB, we examined the nuclear expression of NF κ Bp65 using immunofluorescence in EGCs exposed to TcdA and TcdB, in the presence of a TRPV4 inhibitor.

Our results indicate that TcdA and TcdB significantly increased the number of NF κ Bp65 positive cells compared to the control group cultured exclusively in DMEM (Fig. 4A). This finding suggests that TcdA and TcdB directly contribute to the activation of NF κ B. In contrast, pre-treating EGCs with RN-1734, a TRPV4 inhibitor, one hour before exposure to TcdA or TcdB partially prevented the nuclear translocation of NF κ Bp65 (Fig. 4A), indicating that TcdA and TcdB activate NF κ B through TRPV4. Furthermore, there were no significant differences between the control group and the RN-1734-treated group of cells, which were incubated with the TRPV4 antagonist but not exposed to TcdA or TcdB, indicating that RN-1734's effect is specific to the condition of toxin exposure.

The expression of NF κ Bp65 is visualized by immunolabelling in Fig. 4B.

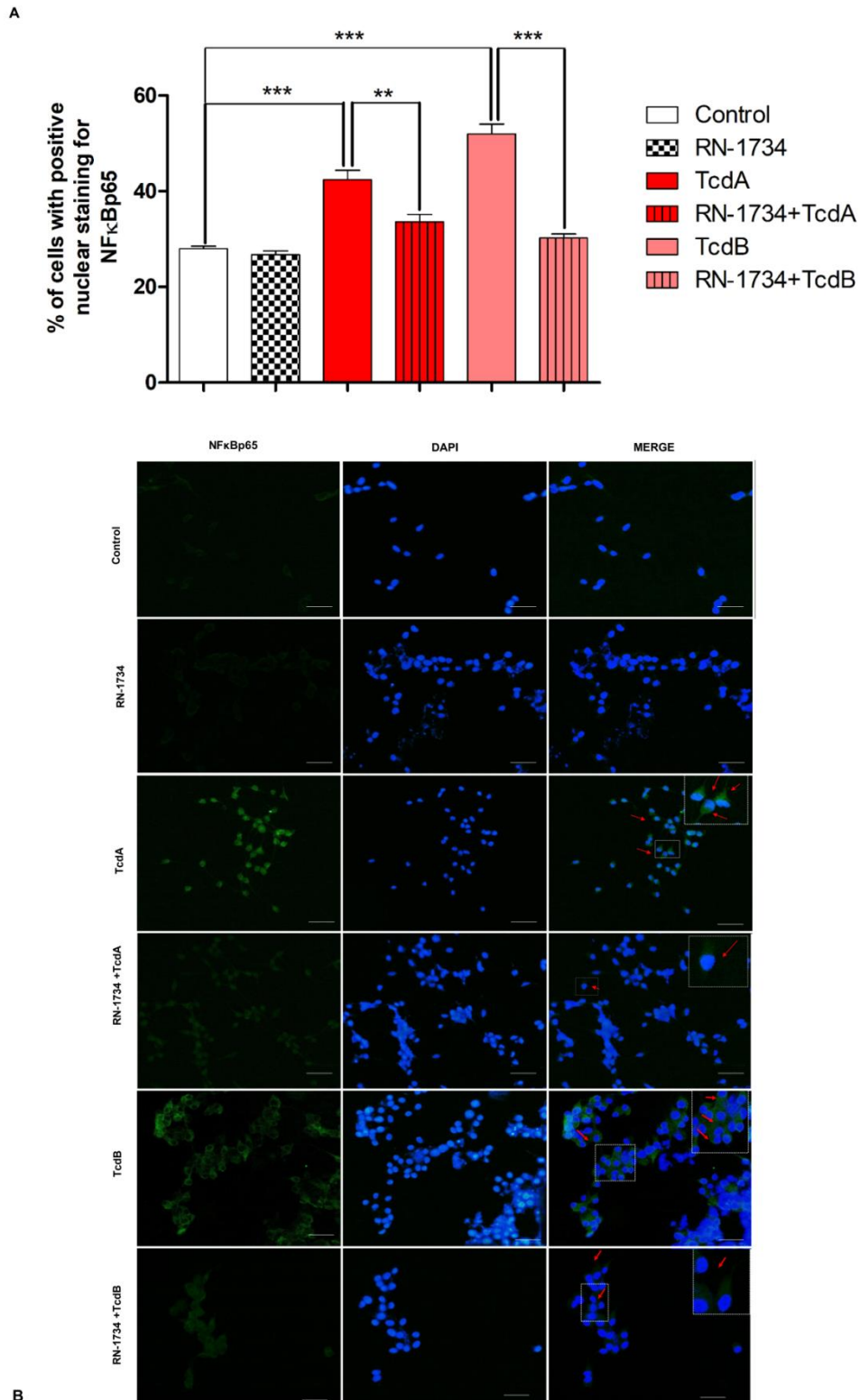


Fig. 4 – Blocking TRPV4 with RN-1734 partially prevents the activation of NFκB induced by *C. difficile* toxins A (TcdA) and B (TcdB) in enteric glial cells (EGCs). A) The data represent a quantitative analysis of the percentage of EGCs showing positive nuclear immunostaining for NFκBp65 after 18h of incubation with either TcdA (50ng/mL), TcdB (1ng/mL), EGCs

with only DMEM (control group), RN-1734 alone (100 μ M), RN-1734 plus TcdA or RN-1734 plus TcdB. TcdA and TcdB activate TRPV4 leading to increased and increase the translocation of NF κ Bp65 to the nuclei of EGCs. Conversely, blocking the receptor with RN-1734 decreases this nuclear translocation compared to the toxin groups. Data are presented as mean \pm SEM of the percentage of nuclei with positive immunostaining for NF κ Bp65. Statistical significance was determined using the one-way ANOVA and Tukey tests. ** $p < 0.001$ and *** $p < 0.0001$. B) Photomicrographs illustrate the nuclear immunostaining of NF κ Bp65 (green), the nuclear staining with DAPI (blue), and the merged images (MERGED). Red arrows indicate the nuclear translocation of NF κ B. The percentage of cells positive for NF κ Bp65 was evaluated in every 100 cells counted ($n=5$), specifically targeting the hot areas of each group (areas showing intense staining). Scale bars =50 μ m.

Blocking TRPV4 by RN-1734 reduces the inflammatory response in enteric glia cells (EGCs) triggered by TcdA and TcdB

Building on our research group's prior findings, which highlighted the impact of TcdA and TcdB on EGCs [30,38], leading to the secretion of inflammatory cytokines, we aimed to elucidate the role of the TRPV4 receptor in this process. Specifically, we investigated whether blocking the TRPV4 receptor with its antagonist, RN-1734, could decrease the gene expression of IL-6 and IL-1 β , as well as the protein expression of TNF- α in EGCs exposed to TcdA and TcdB.

Our findings show that inhibiting TRPV4 with RN-1734 significantly reduces IL-6 gene expression in EGCs exposed to TcdA. In contrast, this effect was not evident in cells subjected to TcdB treatment (Fig. 5A). Additionally, we observed that TcdA and TcdB increased IL-1 β gene expression (Fig. 5B) and TNF- α protein expression (Fig. 5C) in EGCs

compared to the control group. However, the impact of the *C. difficile* toxins on IL-1 β expression seems to be TRPV4-independent, as inhibiting this receptor with RN-1734 failed to prevent the increased IL-1 β gene expression induced by the toxins (Fig. 5B). On the contrary, RN-1734 reduced TNF protein expression induced by TcdA and TcdB (Fig. 5C), suggesting that TRPV4 plays a role in this process.

The expression of TNF in ECGs is visualized by immunolabelling in Fig. 5D.

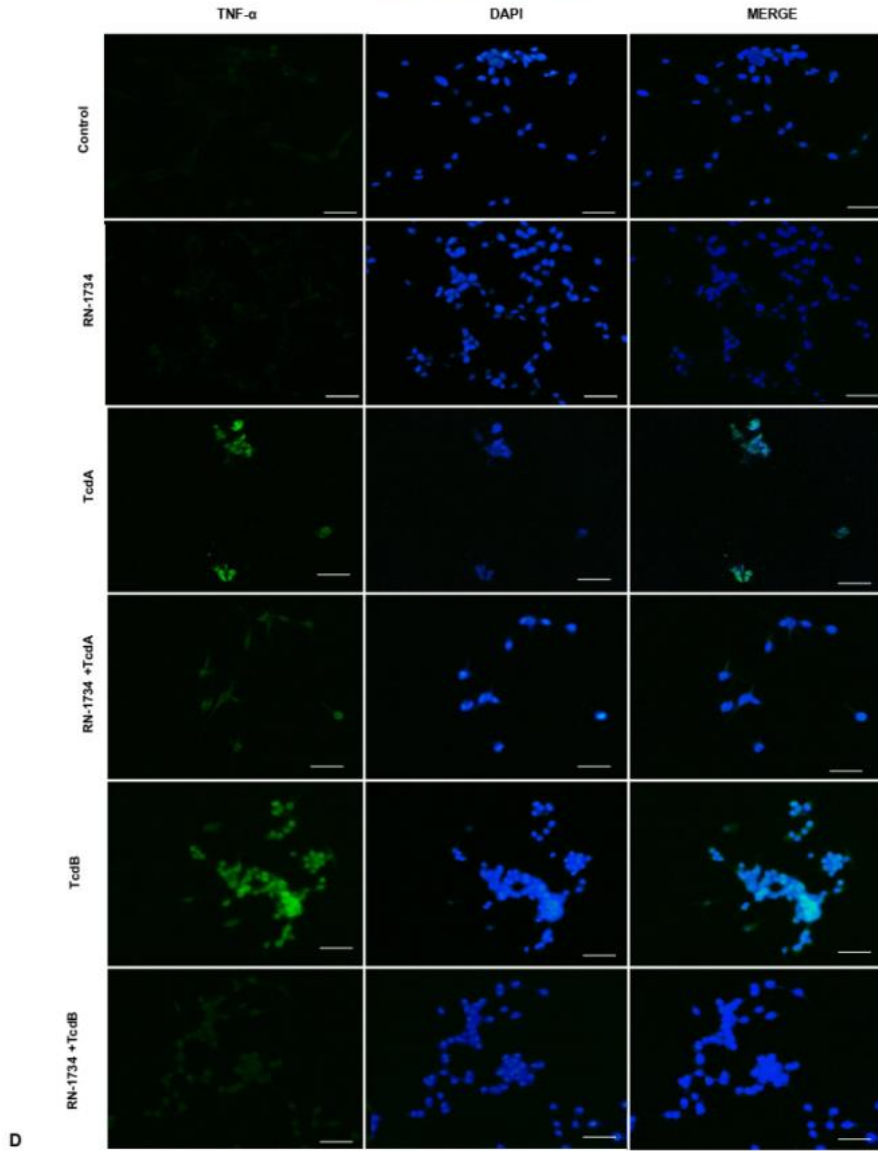
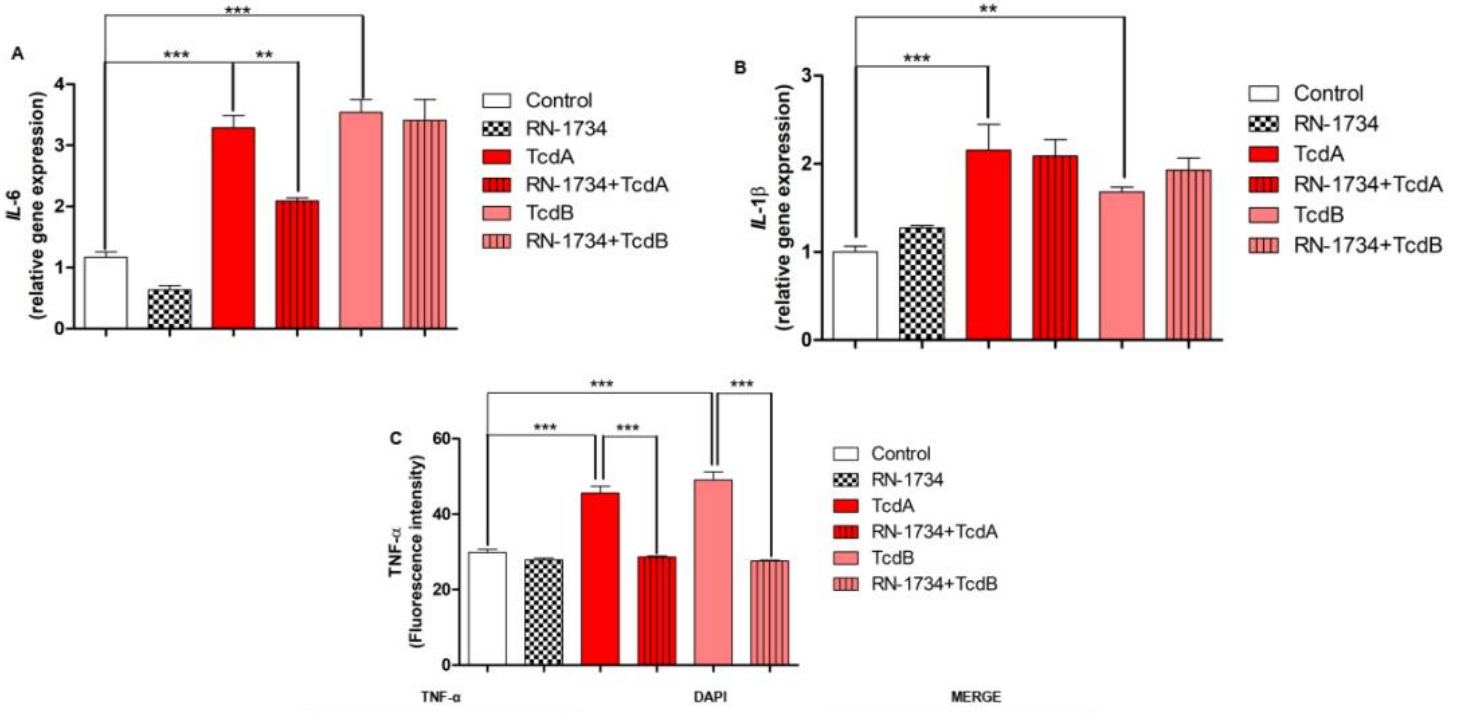


Fig. 5 – TRPV4 modulates the inflammatory response induced by *C. difficile* toxins in enteric glia cells (EGCs). A) Inhibition of TRPV4 by the antagonist RN-1734 decreases *IL-6* gene expression in EGCs exposed to TcdA, but not TcdB, over an 18-hour incubation period. *IL-6* gene expression in EGCs was assessed by qPCR. Data are presented as mean \pm SEM (n=6) of relative *IL-6* gene expression. Statistical significance was determined using the one-way ANOVA and Tukey test. **p<0.001 and ***p<0.0001. B) Exposure to TcdA and TcdB increased the *IL-1 β* gene expression in EGCs compared to controls. TRPV4 inhibition by RN-1734 does not significantly mitigate the upregulation of *IL-1 β* gene expression by TcdA and TcdB. *IL-1 β* gene expression in EGCs was assessed by qPCR. Data are presented as mean \pm SEM (n=6) of relative *IL-1 β* gene expression. Statistical significance was determined using the one-way ANOVA and Tukey tests. **p<0.001 and ***p<0.0001. C) This graph illustrates a quantitative assessment of TNF- α fluorescence in EGCs following 18h of incubation with either TcdA (50ng/mL), TcdB (1ng/mL), only EGCs with only DMEM (control group), RN -1734 alone (100 μ M), RN-1734 plus TcdA or RN-1734 plus TcdB. Zeiss software determined the fluorescence intensity in 5 hot areas per slide (n=6) (areas showing intense staining). Data are presented as mean \pm SEM of TNF- α fluorescence intensity. Statistical significance was determined using the one-way ANOVA and Tukey tests. ***p<0.0001. D) Representative photomicrographs illustrate TNF- α immunofluorescence (green), the nuclear staining with DAPI (blue), and the merged images (MERGED). Scale bars = 50 μ m.

Blocking TRPV4 with RN-1734 reduces *C. difficile* toxins-induced cell death in EGCs by reducing caspase-3 activation and upregulating *bcl-2* expression

To investigate the impact of the TRPV4 receptor on apoptosis induced by *C. difficile* toxins, we utilized the real-time Glo-annexin V apoptosis assay. Furthermore, we analyzed the expression of activated caspase-3 protein and *bcl-2* gene expression, which serve as indicators of cell survival.

In Fig. 6A, we observe a significant increase in the death of EGCs when exposed to TcdA and TcdB compared to the control groups. Both toxins prompted an increase in the formation of the apoptotic conjugate, evidenced by the binding of annexin V to phosphatidylserine on the outer layer of the cell membrane. Conversely, the inhibition of TRPV4 with RN-1734 significantly reduced the death of EGCs triggered by TcdA and TcdB.

The effect of TcdA and TcdB in promoting apoptosis in EGCs was confirmed as the exposure of EGCs to these toxins resulted in a significant increase in caspase-3 protein expression compared to the control group. This effect appears to be dependent on the TRPV4 receptor, as the inhibition of this receptor with its antagonist substantially reduced the expression of caspase-3 protein in EGCs exposed to TcdA or TcdB (Fig. 6B).

Furthermore, TcdA and TcdB decrease the gene expression of *bcl-2* in EGCs compared to the control group, reducing cell survival. The blockade of the TRPV4 receptor by RN-1734 protects the cells from this toxic effect. We observed an upregulation of *bcl-2* gene expression in EGCs pre-incubated with RN-1734 and subsequently exposed to TcdA or TcdB (Fig. 6C).

These findings indicate that activating the TRPV4 receptor in EGCs modulates the apoptotic effects of *C. difficile* toxins. Moreover, inhibiting TRPV4 with its antagonist significantly reduces toxin-induced enteric glia apoptosis, highlighting its critical role in protecting these cells from toxic effects.

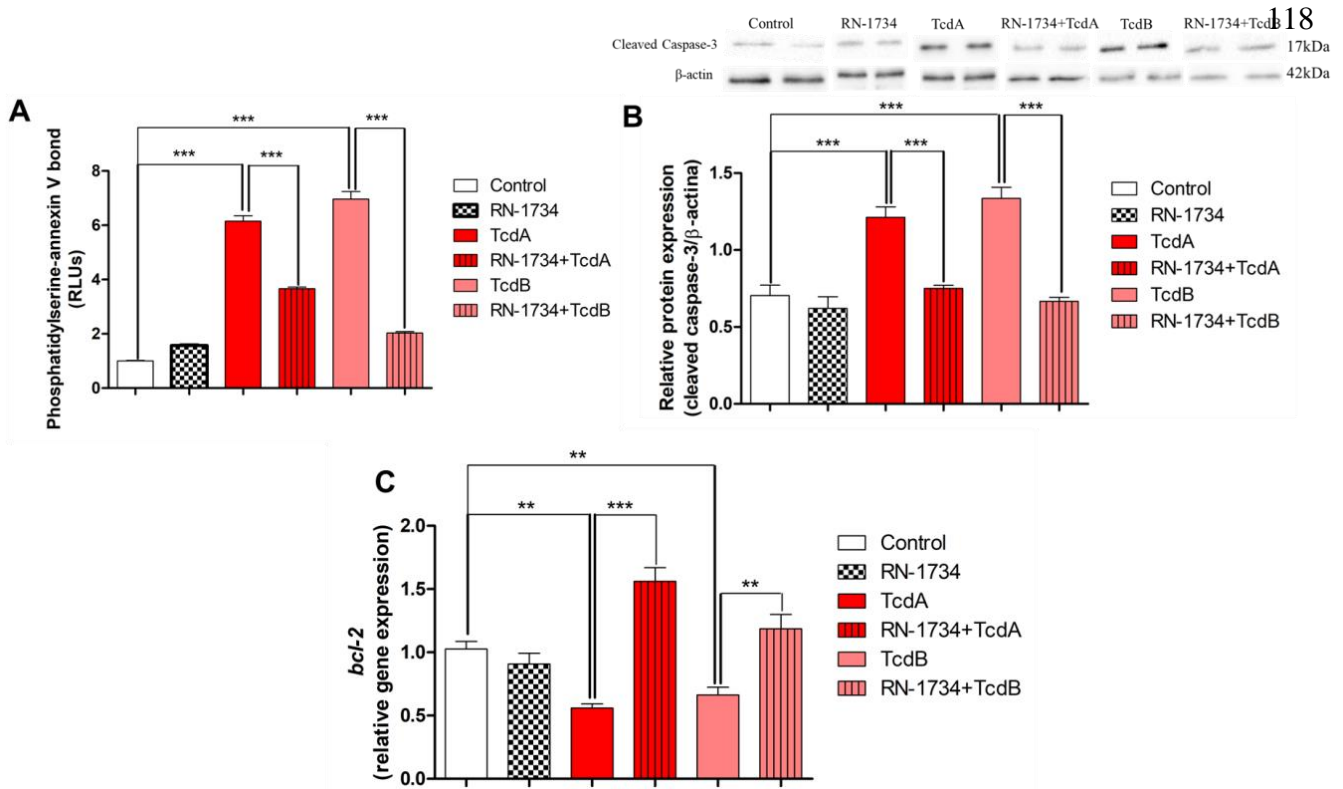


Fig. 6 – TRPV4 regulates cell death in enteric glia induced by *C. difficile* toxins. A) Inhibition of TRPV4 by the antagonist RN-1734 significantly reduced cell death in EGCs exposed to TcdA and TcdB over an 18-hour incubation period. Apoptosis was assessed using the Glo-annexin V real-time assay. Data are presented as mean \pm SEM (n=5) of the relative luminescence unit (RLUs), proportional to the amount of phosphatidylserine-annexin V binding. Statistical significance was determined using ANOVA and Tukey tests. ***p<0.0001. B) Inhibition of TRPV4 by the antagonist RN-1734 significantly reduced the cleaved caspase-3 protein expression in EGCs exposed to TcdA and TcdB over an 18-hour incubation period. Western Blotting detected protein expression in glial cells. Data are presented as mean \pm SEM (n=5) of cleaved Caspase-3 protein expression relative to β -actin. Statistical significance was determined using one-way ANOVA and Tukey tests. ***p<0.0001. C) Inhibition of TRPV4 by the antagonist RN-1734 significantly upregulates *bcl-2* gene expression in EGCs exposed to TcdA and TcdB over an 18-hour incubation period compared to the control group. Gene expression of *bcl-2* in glial cells was assessed by qPCR. Data are presented as mean \pm SEM of relative *bcl-2* gene expression. Statistical significance

was determined using one-way ANOVA and Tukey tests. ** $p < 0.001$ and *** $p < 0.0001$. EGCs following 18h of incubation with either TcdA (50ng/mL), TcdB (1ng/mL), only EGCs with only DMEM (control group), RN -1734 alone (100 μ M), RN-1734 plus TcdA or RN-1734 plus TcdB.

Discussion

In this study, we provide new evidence indicating that the Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4) plays a pivotal role in regulating the inflammatory response and enteric glial cells (EGCs) death triggered by *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) toxins. Our research illuminates a previously poorly explored area within gastroenterological science, emphasizing the significant impact of *C. difficile* toxins on EGCs. This focus is particularly noteworthy given the extensive research traditionally dedicated to other gut cell types, such as epithelial cells, while the involvement of EGCs has remained relatively overlooked. By identifying the TRPV4 receptor's modulation in this context, our study fills a critical gap in our understanding of gut pathology. It opens new avenues for therapeutic interventions targeting gut inflammation and cell death mechanisms.

We found that EGCs constitutively express the TRPV4 receptor on their cell membranes. Furthermore, we demonstrate that exposure to *C. difficile* toxins A (TcdA) and B (TcdB) leads to an upregulation of this receptor's expression in these cells. Moreover, our research demonstrates that *C. difficile* infection (CDI) significantly elevates the expression of this receptor in the submucosal and myenteric plexus regions of the cecum and colon in mice.

EGCs are pivotal for many essential physiological functions within the intestine. These include regulating motility, maintaining mucosal integrity, managing secretion, blood flow, and neurotransmission, and overseeing the regulation of the enteric immune system [23,24]. Additionally, EGCs are emerging as active components within the enteric nervous

system, playing crucial roles during intestinal inflammatory and immune responses. The literature has documented a pivotal shift in EGCs, transitioning to a pro-inflammatory phenotype in response to pathological stimuli, such as bacterial products [25,26]. A pronounced increase in the expression of various receptors and membrane ion channels, including Toll-like receptor, P2X receptor, Connexin-43, and Pannexin-1 marks this transformation [6,9,11,27]. Notably, to our knowledge, the overexpression of TRPV4 in enteric glial cells in response to bacterial products is reported for the first time in the present study.

Moreover, studies in the literature, including those conducted by our group, have demonstrated that EGCs contribute to the inflammatory response by releasing cytokines and glial mediators, such as GFAP, S100B, GDNF, TNF- α , and IL-1 β [28,29]. Particularly on CDI, it is well established that *C. difficile* toxins can induce various cells, including intestinal epithelial cells, immune cells, and neurons, to release cytokines and chemokines [5]. Our recent research sheds light on the impact of TcdA and TcdB on EGCs [8]. We found that these toxins trigger the activation of NF κ B, resulting in a significant increase in *IL-6* gene expression, a cytokine critically involved in the onset and progression of CDI [8]. The current study confirms the activation of NF- κ B by these toxins in EGCs, leading to a significant upregulation of *IL-6* gene expression, as well as a substantial increase in *IL-1 β* gene expression in these cells.

Interestingly, our findings suggest that TRPV4 appears to be implicated only in the effects of TcdA on increasing *IL-6* gene expression. Blocking this receptor did not affect the *IL-6* gene upregulation triggered by TcdB in EGCs, nor did it influence the impact of both toxins on *IL-1 β* gene expression. This suggests the involvement of alternative mechanisms in mediating these responses.

Moreover, we demonstrate that that inhibition of TRPV4 using its antagonist, RN-1734, reduces the translocation of NF κ Bp65 to the nucleus in EGCs and consequently prevents the overexpression of TNF in these cells. This finding suggest that TcdA and TcdB trigger TNF- α release by activating NF κ B in EGCs, with TRPV4 playing a crucial role in mediating these responses. The translocation of NF κ Bp65 to the nucleus is a crucial step for activating this transcription factor, highlighting the essential role of TRPV4 in facilitating NF κ B pathway activation in response to *C. difficile* toxins.

NF κ B is a nuclear transcription factor critical in regulating innate and adaptive immune functions [30]. Once activated, NF κ B regulates the expression of several pro-inflammatory genes, including those that encode cytokines (TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-2, IL-8), chemokines (CXCL-1, CXCL-10, MCP-1), and additionally plays a role in inflammasome regulation [30, 31]. These findings align with our data, which show that the activation of NF- κ B by TcdA and TcdB resulted in a significant increase in IL-6 and IL-1 β gene expressions in EGCs, subsequently leading to apoptosis of these cells.

Studies have shown the impact of TcdA and TcdB inducing apoptosis in EGCs and other cells, including enteric neurons, enterocytes, immune cells, and nerve cells [5-10,32-34]. However, the precise mechanism behind cell death induced by *C. difficile* toxins remains incompletely understood. Our research provides new insights, revealing the crucial involvement of TRPV4 in the death of EGCs triggered by *C. difficile* toxins.

Additionally, our research offers insights into the molecular mechanisms supporting the protective role of TRPV4 inhibition in safeguarding EGCs against the deleterious effects of *C. difficile* toxins. A key mechanism identified is the inhibition of caspase 3 activation by RN-1734, preventing apoptosis. The effector caspase-3 has been identified as playing a critical role in the apoptosis of enteric glia induced by TcdA or TcdB [9,35,36]. However, the involvement of TRPV4 in this process is being uncovered in our study, as evidenced by the

observation that its antagonist prevented the increase in caspase-3 protein expression in EGCs induced by *C. difficile* toxins. We propose that upon activation by *C. difficile* toxins, the TRPV4 increases intracellular Ca^{2+} concentrations, thereby promoting the activation of caspase 3. This effect is attributed to the TRPV4 receptor's notable permeability to Ca^{2+} [37]. This is in line with observations that alterations in physiological levels of intracellular Ca^{2+} triggered by TcdA and TcdB are linked to the initiation of cellular death mechanisms [24].

Furthermore, evidence shows that increased cytoplasmic Ca^{2+} levels can trigger the activation of cell death mechanisms beyond caspases, including pro-apoptotic members of the B cell lymphoma-2 (Bcl-2) family [5,32,35]. The Bcl-2 family of proteins plays a crucial role in regulating apoptosis. This family is categorized into two main sub-groups: the anti-apoptotic proteins that inhibit cell death and the pro-apoptotic proteins that facilitate apoptosis [38]. Our findings demonstrate that TcdA and TcdB reduce the gene expression of the *bcl-2*, an anti-apoptotic protein, in EGCs, consequently decreasing cell survival. Significantly, the blockade of the TRPV4 receptor with RN-1734 safeguards the cells against this detrimental effect, suggesting the involvement of this receptor in this specific mechanism.

Another important aspect is that this increase in Ca^{2+} levels may play a crucial role in transforming EGCs into a reactive phenotype. It has been established that EGCs form extensive communication networks through a complex array of Ca^{2+} signals, enabling them to integrate information from neurons, glial cells, immune cells, or other cells in the gut microenvironment [39]. Therefore, the excitability exhibited by EGCs is governed by their Ca^{2+} responses, highlighting the importance of these signals in potentially driving the transformation of EGCs in response to pathological conditions. We speculate that the inhibition of TRPV4 might prevent the surge in intracellular Ca^{2+} concentration and its subsequent effects, highlighting a potential therapeutic target in managing the pathological transformation of EGCs.

Furthermore, our results demonstrated a marked increase in TRPV4 expression in the cecum and colon of mice infected with *C. difficile*, with a particular concentration in the submucosa, the myenteric plexus, and within enteric immune cells. While the overexpression of TRPV4 in association with CDI is a novel finding, existing literature has documented TRPV4 expression in the myenteric plexus of the colon in mice experiencing conditions such as visceral hypersensitivity and intestinal dysmotility [16-19]. This observation indicates that TRPV4 may have a role in post-infection dysmotility linked with CDI, a functional disorder documented in the literature [40]. Furthermore, TRPV4 expression has been noted in the myenteric plexus of human colon samples from individuals with inflammatory bowel diseases such as Crohn's disease and ulcerative colitis [41], highlighting its potential relevance in a broader spectrum of gastrointestinal pathologies.

Our research sheds light on the pivotal role of TRPV4 in mediating the inflammatory response triggered by *C. difficile* toxins and its significant role in the pathogenesis of CDI, marking it as a promising therapeutic target, as illustrated in Fig. 7. However, our study has certain limitations. A more thorough investigation into the impacts of TRPV4 receptor inhibition on CDI outcomes *in vivo* is essential to fully understand the receptor's activity and implications. Furthermore, the potential clinical application of TRPV4 antagonists requires extensive research to evaluate their effectiveness and safety for human use. These limitations highlight the imperative for ongoing research to deepen our comprehension of TRPV4's role in CDI and to confirm the feasibility of TRPV4-targeted therapies.

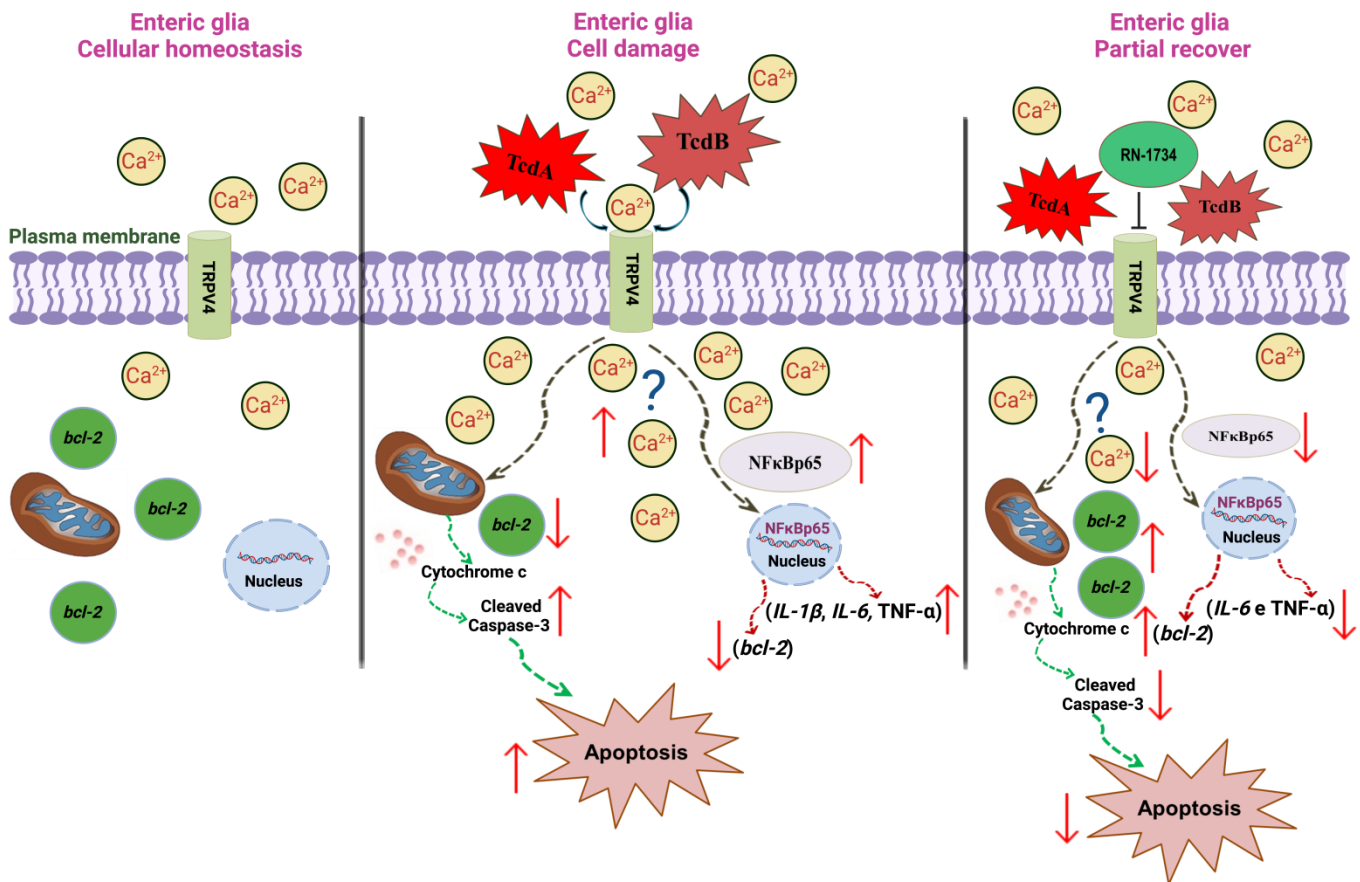


Fig. 7 – Possible mechanism of TRPV4 participation in the action of TcdA and TcdB in enteric glia. Cellular homeostasis – enteric glia under physiological conditions express the TRPV4 receptor on their cell membranes. Cellular damage – TcdA and TcdB activate the TRPV4 receptor leading to an increase in its expression and activity in enteric glia and, consequently, triggering a cascade of intracellular events, such as: increased translocation of the nuclear transcription factor NFκBp65 to the glial cell nucleus, increased pro-inflammatory cytokines (*IL-6*, *IL-1β* and *TNF-α*), decreased *bcl-2* and increased cleaved caspase-3 which results in the death of enteric glia (apoptosis). These results indicate that toxins increase calcium influx, generating these effects on enteric glia. Partial recover – Blocking TRPV4 by its antagonist leads to a decrease in the inflammatory response and cell death caused by toxins in glial cells, thus reestablishing the partial physiological conditions of these cells.

Acknowledgments

We thank the Center for Studies in Microscopy and Image Processing (NEMPI) of the Department of Morphology at the Federal University of Ceará (UFC) for all the histology services and support given to carry out this research.

We also thank the creators of BioRender.com where the illustrations in the paper were produced.

Authors' contributions

DM Pacífico contributed to the overall study design, performed the *in vitro* cellular experiments, data analysis and wrote the paper. MLL Barbosa conducted the *in vitro* cellular experiments. CSM Rebouças conducted part of the *in vitro* cellular experiments. SG Simonato conducted part of the *in vitro* cellular experiments. DVS Costa conducted part of the *in vitro* and *in vivo* cellular experiments. FMS Marques conducted part of the *in vitro* cellular experiments. MLG Santos conducted part of the data analysis. RFC Leitão led the Writing-Review and Editing of the paper. GAC Brito Supervision, Fundraising, Review and Editing of the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

Financing project was supported by PRONEX/FUNCAP/CNPq do Brasil through grant PR2-0101-00060.01.00/15.

Conflict of interest

Authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval

The animal study was reviewed and approved by Committee on the Ethics of Animal Experiments of the University of Virginia (Protocol number: 4096).

References

1. Zhu D, Sorg JA, Sun X (2018). *Clostridioides difficile* Biology: Sporulation, Germination, and Corresponding Therapies for *C. difficile* Infection. *Front Cell Infect Microbiol* 8:29. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00029>
2. Mitchell M, Nguyen SV, Macori G, Bolton D, McMullan G, Drudy D et al (2022). *Clostridioides difficile* as a Potential Pathogen of Importance to One Health: A Review. *Foodborne Pathog Dis* 19 (12): 806-816. <https://doi.org/10.1089/fpd.2022.0037>
3. Pacífico DM, Costa CL, Moura H, Barr JR, Maia GA, Filho VB et al (2021). Exoproteomic analysis of two MLST clade 2 strains of *Clostridioides difficile* from Latin America reveal close similarities. *Sci Rep* 11 (1): 12373. | <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92684-0>
4. Bassotti G, Fruganti A, Maconni G, Marconni P, Fettucciari K (2021). *Clostridioides difficile* Infection in Patients with Inflammatory Bowel Disease May be Favoured by the Effects of Proinflammatory Cytokines on the Enteroglial Network. *J Inflamm Res*: 30 (14): 7443-7453. <https://doi.org/10.2147/JIR.S328628>
5. Fettucciari K, Marguerie F, Fruganti A, Marchegiani A, Spaterna A, Brancorsini S et al (2022). *Clostridioides difficile* toxin B alone and with pro-inflammatory cytokines induces apoptosis in enteric glial cells by activating three different

- signalling pathways mediated by caspases, calpains and cathepsin B. *Cell Mol Life Sci* 79(8): 442. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04459-z>
6. Santos AAQA, Costa DVS, Foschetti DA, Duarte ASG, Martins CS, Soares PMG et al (2022). P2X7 receptor blockade decreases inflammation, apoptosis, and enteric neuron loss during *Clostridioides difficile* toxin A-induced ileitis in mice. *World J Gastroenterol* 28: 4075–4088. <https://dx.doi.org/10.3748/wjg.v28.i30.4075>
 7. Ok MT, Liu J, Bliton RJ, Hinesley CM, San Pedro EET, Breau KA et al (2023). A leaky human colon model reveals uncoupled apical/basal cytotoxicity in early *Clostridioides difficile* toxin exposure. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 324(4):G262-G280. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00251.2022>
 8. Costa DVS, Moura-Neto V, Bolick DT, Guerrant RL, Fawad JA, Shin JH, et al (2021). S100b inhibition attenuates intestinal damage and diarrhea severity during *clostridioides difficile* infection by modulating inflammatory response. *Front Cell Infect Microbiol* 11:739874. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.739874>
 9. Loureiro AV, Moura-Neto LI, Martins CS, Silva PIM, Lopes MBS, Leitão RFC et al (2022). Role of Pannexin-1-P2X7R signaling on cell death and pro-inflammatory mediator expression induced by *Clostridioides difficile* toxins in enteric glia. *Front Immunol.*, 13: 956340. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.956340>
 10. Costa DVS, Shin JH, Goldbeck SM, Bolick DT, Mesquita FS, Loureiro AV et al (2022). Adenosine receptors differentially mediate enteric glial cell death induced by *Clostridioides difficile* Toxins A and B. *Front Immunol* 13: 956326. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.956326>
 11. Seguela L, Gulbransen BD (2021). Enteric glial biology, intercellular signalling and roles in gastrointestinal disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 18: 571–5878. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00423-7>

12. López-Gómez L, Szymaszkiwicz A, Zielinska M, Abalo R(2021). Nutraceuticals and Enteric Glial Cells. *Molecules* 26: 3762. <https://doi.org/10.3390/molecules26123762>
13. Liu C.; Yang J (2022). Enteric Glial Cells in Immunological Disorders of the Gut. *Front Cell Neurosci* 16: 895871. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.895871>
14. Nguyen T.N, Siddiqui G, Veldhuis NA, Poole DP (2021). Diverse Roles of TRPV4 in Macrophages: A Need for Unbiased Profiling. *Front Immunol* 12: 828115. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.828115>
15. Everaets W, Nilius B, Owsianik G (2010). The vanilloid transient receptor potential channel TRPV4: from structure to disease. *Prog Biophys Mol Biol* 63: 2-17. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2009.10.002>
16. Fichna J, Poole DP, Veldhuis N, MacEachern SJ, Saur D, Zakrzewski PK et al (2015). Transient receptor potential vanilloid 4 inhibits mouse colonic motility by activating NO-dependent enteric neurotransmission. *J. Mol. Med* 93: 1297–1309. <https://doi.org/10.1007/s00109-015-1336-5>
17. Yin J, Michalick L, Tang C, Tabuchi A, Goldenberg N, Dan Q et al (2016). Role of Transient Receptor Potential Vanilloid 4 in Neutrophil Activation and Acute Lung Injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 54: 370-83. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2014-0225OC>
18. Luo J, Qian A, Oetjen LK, Yu W, Yang P, Feng J et al (2018). TRPV4 Channel Signaling in Macrophages Promotes Gastrointestinal Motility via Direct Effects on Smooth Muscle Cells. *Immunity* 49: 107–119.e4. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.04.021>

19. Brierley SM, Page AJ, Hughes PA, Adam B, Liebrechts T, Cooper NJ et al (2008). Selective role for TRPV4 ion channels in visceral sensory pathways. *Gastroenterology* 134: 2059-2069. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.01.074>
20. Chen Y, Mu J, Zhu M, Mukherjee A, Zhang H (2020). Transient Receptor Potential Channels and Inflammatory Bowel Disease. *Front Immunol* 11: 180. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00180>
21. Ruhl A, Trotter J, Stremmel W (2001). Isolation of enteric glia and establishment of transformed enteroglial cell lines from the myenteric plexus of adult rat. *Neurogastroenterol Motil* 13: 95–106. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2982.2001.00246.x>
22. Nogueira LT, Costa DVS, Gomes AS, Martins CS, Silva AMHP, Coelho-Aguiar JM et al (2017). The involvement of mast cells in the irinotecan-induced enteric neurons loss and reactive gliosis, *J Neuroinflammation* 1 (79). <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0854-1>
23. Bassotti G, Marchegiani A, Marconi P, Fettucciari K (2020). The cytotoxic synergy between *Clostridioides difficile* toxin B and proinflammatory cytokines: an unholy alliance favoring the onset of *Clostridioides difficile* infection and relapses. *Microbiology* 9: e1061. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1061>
24. Pawolski V, Schmidt MHH. (2021). Neuron-Glia Interaction in the Developing and Adult Enteric Nervous System. *Cell* 10: 47. <https://doi.org/10.3390/cells10010047>
25. López-Gómez L, Szymaszkiwicz A, Zielinska M, Abalo R(2021). Nutraceuticals and Enteric Glial Cells. *Molecules* 26: 3762. <https://doi.org/10.3390/molecules26123762>
26. Progatzyk F, Pachnis V (2022). The role of enteric glia in intestinal immunity. *Curr Opin Immunol* 77: 102183. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2022.102183>

27. Esposito G, Capoccia E, Turco F, Palumbo I, Lu J, Steardo A et al (2014). Palmitoylethanolamide improves colon inflammation through an enteric glia/toll like receptor 4-dependent PPAR- α activation. *GUT* 63: 1300-12. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-305005>
28. Berre CL, Naveilhan P, Rolli-Derkinderen M (2023). Enteric glia at center stage of inflammatory bowel disease. *Neuroscience Letters* 809: 137315. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2023.137315>
29. Costa DVC, Bon-Frauches AC, Silva AMHP et al (2019). 5-Fluorouracil Induces Enteric Neuron Death and Glial Activation During Intestinal Mucositis via a S100B-RAGE-NF κ B-Dependent Pathway. *Sci Rep* 24: 665. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36878-z>
30. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun S.C (2017). NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* 2: 17023. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
31. Wolf J, Rose-John S, Garbers C (2014). Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system. *Cytokine* 70: 11-20. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.05.024>
32. Brito GAC, Fujji J, Carneiro-Filho BA, Lima AAM, Obrig T, Guerrant RL (2002). Mechanism of *Clostridium difficile* Toxin A – Induced Apoptosis in T84 Cells. *J Infect Dis* 186: 1438–1447. <https://doi.org/10.1086/344729>
33. Modi N, Gulati N, Solomon K, Monaghan T, Robins A, Sewell HF et al (2011). Differential binding and internalization of *Clostridium difficile* toxin A by human peripheral blood monocytes, neutrophils and lymphocytes. *Scand J Immunol.*, 74: 264-271. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2011.02578.x>
34. Zhang Y, Li Y, Li H, Chen W, Liu W (2018). *Clostridium difficile* toxin B recombinant protein inhibits tumor growth and induces apoptosis through inhibiting

- Bcl-2 expression, triggering inflammatory responses and activating C-erbB-2 and Cox-2 expression in breast cancer mouse model. *Biomed Pharmacother* 101: 391–398. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.045>
35. Fettucciari K, Dini F, Marconi P, Bassotti G (2023). Role of the Alteration in Calcium Homeostasis in Cell Death Induced by *Clostridioides difficile* Toxin A and Toxin B. *Biology* 10: 1117. <https://doi.org/10.3390/biology12081117>
36. Fettucciari K, Marconi P, Marchegiani A, Fruganti A, Spaterna A and Bassotti G (2021). Invisible steps for a global enemy: molecular strategies adopted by *Clostridioides difficile*. *Ther Adv Gastroenterol* 14: 175628482110327. <https://doi.org/10.1177/17562848211032797>
37. Ryskamp DA, Frye AM, Phuong TTT, Yarishkin O, Jo AO, Xu Y et al (2016). TRPV4 regulates calcium homeostasis, cytoskeletal remodeling, conventional outflow and intraocular pressure in the mammalian eye. *Scientific Reports* 6. <https://doi.org/10.1038/srep30583>
38. Brentnall M, Rodriguez-Menocal L, Guevara RLD, Cepero E, Boise LH (2013). Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *Bmc Cell Biology* 14: 14-32. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-14-32>
39. Ochoa-Cortes F, Turco F, Linan-Rico A, Soghomonyan S, Whitaker E, Whener S et al (2016). Enteric Glial Cells: A New Frontier in Neurogastroenterology and Clinical Target for Inflammatory Bowel Diseases. *Inflamm Bowel Dis* 22: 433-449. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000667>
40. Gutiérrez RL, Riddle MS, Porter CK (2015). Increased risk of functional gastrointestinal sequelae after *Clostridium difficile* infection among active duty United States military personnel (1998-2010). *Gastroenterology* 149: 408-14. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.07.059>

41. Wiese JJ, Manna S, Kuhl AA, Fasci A, Elezkurtaj S, Sonnenberg E et al (2024). Myenteric Plexus Immune Cell Infiltrations and Neurotransmitter Expression in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Journal of Crohn's and Colitis* 18 (1): 121-133. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjad122>

Supplementary material

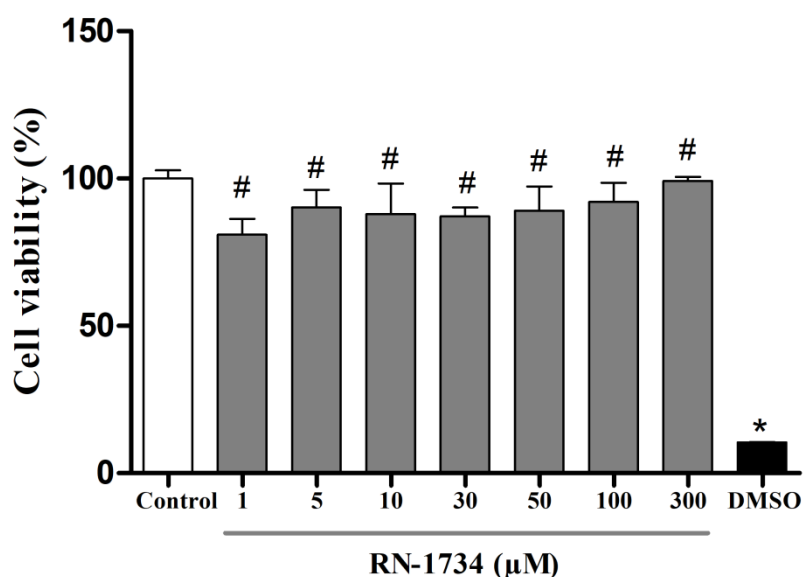


Fig. S1 – Cell viability assay performed on EGCs incubated with RN-1734 (1, 5, 10, 30, 50, 100 and 300μM) or with culture medium alone (control group) for a period of 18 h of incubation. DMSO was used as a killing control. Cell viability was determined using the MTT assay. Data are presented as mean ± SEM. For statistical analysis, the one-way ANOVA test was used followed by the Tukey test. * $p < 0.0001$ versus the control group and # $p < 0.0001$ versus the DMSO group.

Table S1 – Sets of primers used in qPCR.

<i>TRPV4</i>	
Forward	TCAAGTGCTCCCGCCTCTTC
Reverse	ACCTCCCGTCGGATGATGTG
<i>IL-6</i>	
Forward	GCCAGAGTCATTCAGAGCAATA
Reverse	GTTGGATGGTCTTGGTCCTTAG
<i>IL1-β</i>	
Forward	AGCTTCAGGAAGGCAGTGTC
Reverse	CTCCACGGGCAAGACATAGG
<i>bcl-2</i>	
Forward	CAGCATGCGACCTCTGTTTG
Reverse	CAGGTATGCACCCAGAGTGA
<i>GAPDH</i>	
Forward	AGACAGCCGCATCTTCTTGT
Reverse	CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT

Unveiling the Role of TLR4 in *Clostridioides difficile* Infection: Insights from *in vivo* and *in vitro* Studies

Maria Lucianny Lima Barbosa¹, Dvison de Melo Pacífico¹, Conceição da Silva Martins Rebouças¹, Deiziane Viana da Silva Costa², Renata Ferreira de Carvalho Leitão¹, Gerly Anne de Castro Brito¹

¹ Núcleo de Microscopia e Processamento de Imagens (NEMPI), Department of Morphology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil.

² Division of Infectious Diseases and International Health, University of Virginia, Charlottesville, Virginia, VA, United States

* **Correspondence:** Renata Ferreira de Carvalho Leitão

E-mail: renata.carvalho@ufc.br

Abstract

Clostridioides difficile (*C. difficile*) is a Gram-positive anaerobic bacillus capable of inducing a spectrum of intestinal disorders. Toll-like receptors (TLR) constitute a family of pattern-recognition receptors that play a fundamental role in the innate immune system. We aim to elucidate the involvement of TLR4 in *C. difficile* infection and its impact on the responses of enteric glial cells (EGCs) to *C. difficile* toxins. Male C57BL/6 mice were infected with *C. difficile*. Cecum samples were collected three days post-infection to assess TLR4 expression by immunohistochemistry. In *in vitro* experiments, EGCs were challenged with *C. difficile* toxins, both in the presence and absence of the TLR4 inhibitor C34. Evaluation of TLR4 expression was performed by immunocytochemistry, immunofluorescence, qPCR, and Western blotting. We assessed the immunoexpression of NF-κB p65, TNF-α, and IL-6. To investigate cell death, we evaluated the immunoexpression of cleaved caspase-3 and the

binding of phosphatidylserine to annexin-V. The expression of TLR4 was increased in the intestinal tissue of infected mice and in EGCs exposed to *C. difficile* toxins. The TLR4 antagonist, C34, reduced NF-kB p65 nuclear translocation and the immunoexpression of TNF- α . However, it did not affect the upregulation of IL-6 induced by both toxins. C34 exhibited a preventive effect on cell death, indicated by decreased immunostaining of cleaved caspase-3 and phosphatidylserine binding to annexin V. Our data point to a role of TLR4 in the pathogenesis of *C. difficile* infection and highlight the efficacy of the TLR4 inhibitor in reducing inflammatory markers and preventing cell death.

Keywords: *Clostridium difficile*; *Clostridioides difficile*; Toll-like receptors; Enteric glia; Toxin A; Toxin B.

1. Introduction

Clostridioides difficile (formerly *Clostridium difficile*) is a Gram-positive bacterium that forms spores and is widely distributed in the intestinal tract of humans, animals, and the environment [1]. This anaerobic bacterium can cause a range of disorders, from mild diarrhea to severe colitis and life-threatening complications, such as pseudomembranous colitis, toxic megacolon, and bowel perforation [2,3]. *Clostridioides difficile* infection (CDI) is a significant cause of healthcare-associated diarrhea in many countries and is associated with prolonged hospitalization and higher mortality rates [4]. A prior study conducted by our group revealed a 48% infection positivity rate within a Brazilian cancer hospital [5]. Additionally, CDI has a substantial economic impact on healthcare systems and patients, costing over \$1 billion annually in the United States alone[6,7].

The bacterium produces three toxins, the primary virulence factors in CDI. These toxins are known as toxin A (TcdA), toxin B (TcdB), and *C. difficile* transferase (CDT), also referred to as a binary toxin. Clinical symptoms have been linked to these toxins [2]. TcdA

and TcdB function as glucosyltransferases upon expression and secretion within the colon. They bind to host cell receptors, subsequently undergoing endocytosis by host cells. Once intracellular, these toxins inactivate Rho-family GTPases through glucosylation. This inactivation disrupts the host cytoskeleton, leading to the accelerated breakdown of the epithelial barrier function in the colon. Consequently, inflammation, tissue damage, and diarrhea are promoted [8]. Due to their capability to disrupt the intestinal epithelial barrier, *C. difficile* toxins can also affect underlying cells, inducing cytopathic and cytotoxic effects on enteric glial cells (EGCs) [9–11].

The EGCs participate in host-bacteria interactions, as demonstrated in an *in vitro* exposure model to enteroinvasive *Escherichia coli* or *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei* F19. In this model, pathogenic and probiotic bacteria demonstrated distinct capabilities in modulating the expression of Toll-like receptors (TLRs) within these cells [12]. TLRs are established molecular regulators of the immune response, crucial in recognizing and responding to invading pathogens [13]. Among the TLR family, Toll-like receptor 4 (TLR4), holds particular significance. It is a key member of innate immunity, mediating inflammatory responses by recognizing lipopolysaccharide (LPS) and other ligands[14].

Previous studies have provided compelling evidence suggesting a potential association between *C. difficile* and TLRs. Notably, TLR-5 has been identified as capable of recognizing flagellar proteins of *C. difficile* [15], while the TLR4 receptor can identify the surface layer proteins of the bacteria [16]. Additionally, the inhibition of Rho proteins by toxin B has been shown to enhance the expression of cytokines by regulating TLR 2, 3, and 4 in astrocytes [17,18]. However, it is essential to highlight that the precise role of TLR4 in CDI, especially regarding EGC, remains incompletely understood and warrants further investigation.

Understanding the mechanisms through which *C. difficile* toxins operate and the immune system's activity regulated by TLRs can potentially drive advancements in products

and discoveries beneficial to human health [2,13]. Thus, this research aims to elucidate the role of TLR 4 in the CDI and its involvement in the effects of *C. difficile* toxins in EGCs.

2. Materials and Methods

2.1 Mice

Male C57BL/6 mice, 8 weeks old, were obtained from the Jackson Laboratory, Farmington, US. The mice were housed in polypropylene cages lined with wood shavings, with bedding changes occurring twice a week. Throughout the experiments, the animals were maintained in consistent environmental conditions (temperature: 22°C ± 2°C, with air exhaustion, and a 12h light/12h dark cycle). They had unrestricted access to water and standard chow *ad libitum*. The experimental protocol received approval from the Ethics of Animal Experiments Committee at the University of Virginia (Protocol number 4096).

2.2 *C. difficile* infection model

C57BL/6 mice (n = 6 for each group) underwent a three-day antibiotic treatment in their drinking water, employing a previously described [11,19]. Following a one-day antibiotic-free period, an intraperitoneal injection of clindamycin (32 mg per kg) was administered one day before the *C. difficile* challenge. Subsequently, an oral gavage of 10⁵ CFU (in 100 µL of Chopped meat broth, a pre-reduced medium) containing the vegetative *C. difficile* strain VPI10463 (ATCC 43255, tcdA+tcdB+cdtB-) was conducted (**Figure 1**). Control mice received 100 µL of chopped meat broth. animals were euthanized three days post-infection utilizing ketamine and xylazine (180 and 15 mg/kg, i.p.). Segments of cecum were collected and prepared accordingly for histological processing and analysis.

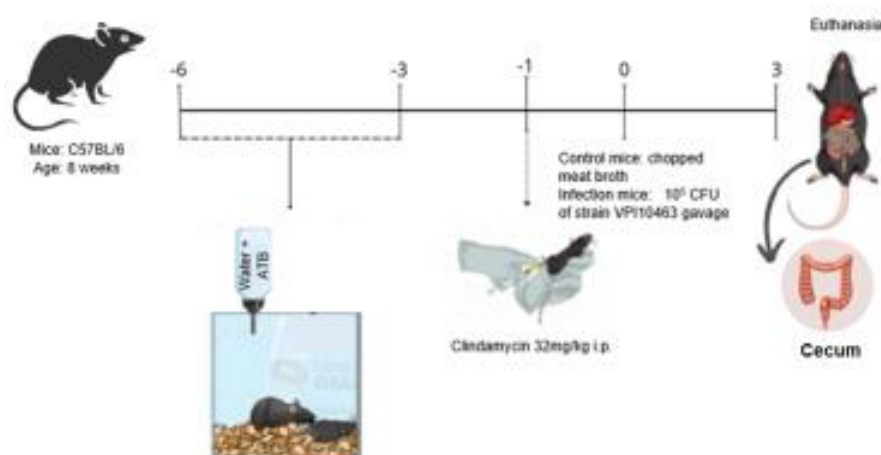


Figure 1: *C. difficile* infection model

2.3 Immunohistochemistry

Sections (4 μ m thick) were prepared from paraffin-embedded mouse intestinal tissues. Following deparaffinization, antigens retrieval was performed by incubating the slides in citrate buffer Target retrieval solution at low pH (K8005, Dako) for 20 min at 95°C in PTLINK (PT10027, Dako). To reduce non-specific binding, endogenous peroxidase was blocked with 3% H₂O₂ for 10 min. The sections were then incubated overnight with an Anti-TLR4 antibody (ab22048, Abcam, 1:400), followed by a 30-minute incubation with polymer HRP (K8000, Dako). The antibody-binding sites were visualized by incubating the samples with diaminobenzidine–H₂O₂ (DAB, Dako) solution. The brown coloration identified positive staining, and the number of immunostaining cells was quantified using the ImageJ Software, counting cells with positive staining in ten different fields per slide (considering 1 slide per animal and four specimens per group). [20].

2.4 Cell culture

The immortalized mouse enteric glial cell (EGC) lineage PK060399egfr (ATCC CRL-2690, VA, United States), a single murine enteric glial cell line available (37), was cultured in Eagle's medium modified by Dulbecco (DMEM, Gibco) supplemented with 10% fetal bovine

serum, 1% antibiotics (100 µg/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin, Gibco) and 1 mM sodium pyruvate (Gibco). The cells were seeded in triplicate and maintained at 37° C in a humidified incubator under 5% CO₂ for no more than 20 passages. EGCs were detached using 0.05% trypsin-EDTA for 5 min.

2.5 Immunocytochemistry conducted on enteric glial cells (EGCs)

Immunocytochemistry for TLR4 was performed, as previously described, by Veras-Tinoco et al. [21]. EGCs at passage 14 were plated 5×10^4 per well in a 24-well plate. After 18 hours of cultivation, cells were incubated with toxins A (TcdA) or B (TcdB). After 24 hours of incubation, cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 15 minutes and washed in 1% PBS. Then, antigenic retrieval was performed with citrate pH 6.0 (DAKO) for 30 minutes and endogenous peroxidase blockade (DAKO) for 20 min. In the next step, the cells were incubated with the primary anti-TLR4 antibody (1:1000 Invitrogen) for 20 minutes and with HRP polymer (DAKO) for 30 minutes, being developed with the DAB chromogen (DAKO) and counter-stained with hematoxylin (DAKO). Coverslips were removed and placed on the slide with faramount (DAKO). The percentage of TLR4 positive cells was determined by counting 100 cells per section from digital images captured from various areas within each section (from four specimens per group), at $\times 400$ magnification using ImageJ software. The number of immunopositive cells was divided by the total number of cells and multiplied by 100 to determine the percentage.

2.6 Immunofluorescence

EGCs at passage 15 were plated in 24-well plates (4×10^4 cells/well). Following plating, C34 (50 µM or 25 µM) was incubated, and after 1 hour, TcdA (50 ng) or TcdB (1 ng) were added for an 18-hour incubation. Subsequently, cells were fixed in 4% paraformaldehyde (500 µL per well) for 15 minutes. Afterward, cells were permeabilized in

PBS with 0.025% Triton X100 (Sigma-Aldrich) and 0.2% bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich) for 15 min. Following permeabilization, cells were blocked with 0.25% Triton X100 (Sigma-Aldrich) and 1% BSA (Sigma-Aldrich) in PBS at room temperature for 1 hour, followed by washing samples with a washing solution. Subsequently, the cells were incubated with anti-TLR4 (482300 1:500), NFκB-p65 (ab16502 1:500), TNF-α (ab6671 1:200) or anti-cleaved caspase-3 (AB3623 1:100) overnight at 4°C. After three washes with washing buffer (0.01% Tween 20 in PBS), cells underwent an overnight incubation with secondary antibody AlexaFluo 594 (1:400) or AlexaFluo 488 (1:400) for two hours at room temperature. Following a PBS wash, cells were mounted with ProLong Gold antifade reagent containing DAPI (Thermo Scientific, P36931). The samples were visualized by fluorescence microscopy (LM10-Confocal Zeiss). The immunofluorescence for TLR4, TNF-α or cleaved caspase 3 was determined from digital images captured within each section (from four specimens per group) at ×400 magnification, using ImageJ software, as previously described [22]. The results are expressed as fluorescence intensity. The percentage of nuclear NFκB-p65 positive cells was determined by counting 100 cells per section from digital images captured from various areas within each section (from four specimens per group), at ×400 magnification using ImageJ software. The number of immunopositive cells was divided by the total number of cells and multiplied by 100 to determine the percentage[23].

2.7 Quantitative real-time PCR (qPCR)

EGCs (6×10^5 cells/well), at passage 15, were cultivated in 6-well plates and treated with either TcdA or TcdB. The control group of cells received no treatment. After incubation, total RNA extraction was performed using a RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden,

Germany) on the QIAcube platform (Qiagen). RNA was quantified using a Nanodrop, and its purity was assessed by the ratios of nucleic acids/proteins (260/280) and nucleic acids/other contaminants (260/230). Subsequently, the RNA underwent reverse transcription using a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's protocol. qPCR amplification of TLR4, IL-6 and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in cell samples was performed using a StepOne apparatus. Gene expression was calculated by the Livak & Schmittgen method ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). The coding sequence of the nucleotides obtained from the NCBI database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and the OligoPerfect Primer Design Software (Thermo Fisher) was utilized for primer design. Primers are listed in Table 1.

Table 1: Primer set used

Forward	Reverse
GAPDH: AGAACATCATCCCTGCATCC	CACATTGGGGGTAGGAACAC
TLR4: GTTGCAGAAAATGCCAGGATG	CAGGGATTCAAGCTTCCTGGT
IL-6: GCCAGAGTCATTCAGAGCAATA	GTTGGATGGTCTTGGTCCTTAG

2.8 Western blotting

EGC (6×10^5 cells/well), at passage 16, were cultured in six-well plates and treated with either TcdA or TcdB. After incubation, the supernatant was removed, and the cells were lysed using RIPA lysis buffer (Thermo Fisher Scientific) containing EDTA and a free phosphatase protease inhibitor. The lysate underwent centrifugation at 13,000 rpm for 17 minutes at four °C, and the supernatant was collected. Protein concentrations were determined using the bicinchoninic acid assay according to the manufacturer's protocol (Thermo Fisher Scientific). Forty micrograms of protein (previously prepared with Laemmil sample buffer

and β -mercaptoethanol) were denatured at 95°C for 5 minutes, separated on a 10% BIS-Tris gel, and transferred to PVDF membranes for 2 hours. After blocking with 5% blocking solution (BioRad) at room temperature for 1 hour, the membranes were incubated overnight with primary antibodies β -actin 1:400 (Sigma-Aldrich) and TLR4 1:100 (Invitrogen, 48-2300). Subsequently, the membranes were incubated with secondary antibodies (anti-rabbit 1:400) for 1 hour and 30 minutes and then washed in Tris-buffered saline containing 0.05% Tween 20 (TSB-T) and incubated with Enhanced Chemiluminescence – ECL (Biorad 1705060). The chemiluminescence signal was detected using a ChemiDoc system (BioRad). Densitometric quantification of the bands was performed using ImageJ software.

2.9 Realtime-glo annexin V apoptosis assay

Cell death was assessed using a live cell real-time assay (Realtime-Glo annexin V apoptosis assay, Promega, JA1000), following the manufacturer's instructions. EGCs (10^4 cells/well), at passage 19, were seeded in white tissue culture-treated 96-well plates (Falcon, solid white bottom) and treated with TcdA or TcdB for 18 h in the presence or absence of C34 (a TLR4 receptor antagonist), added one hour before *C. difficile* toxin challenge. Then, 200 μ L of 2x detection reagent (containing 2 μ L of annexin NanoBit substrate, 2 μ L of CaCl₂, 2 μ L of annexin V-SmBit, and 2 μ L of annexin V-LgBit in 1000 μ L of prewarmed supplemented DMEM) was added to each well. The cells were incubated at 37°C in a humidified incubator under 5% CO₂. Luminescence was recorded using a multi-mode reader (Synergy/HTX, Biotek), and the intrinsic reagent luminescence (no-cell, no-compound background control) was subtracted from the luminescence signals in the sample. The resulting values were then divided by the mean of control cells to obtain the relative luminescent units (RLUs).

2.10. Statistical analysis

The following tests were employed for statistical analysis between groups: the Shapiro-Wilk normality test for parametric data, a one-way ANOVA analysis followed by Tukey's multiple comparison post-test. In cases where the data did not follow a normal distribution, the Kruskal-Wallis test with Dunns post-test was used. The confidence interval was set at 95%. Statistical analysis was performed using GradPad Prism software, version 8.0. All results are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM).

3. Results

3.1. *C. difficile* infection increases TLR4 expression in mouse intestinal tissue.

The *C. difficile* infection significantly increased ($p < 0.0001$) the expression of TLR4 in the mouse cecum tissue detected by immunohistochemistry (**Figure 2**). A more significant number of TLR4-positive cells was observed in the submucosal and myenteric plexus compared to the control group.

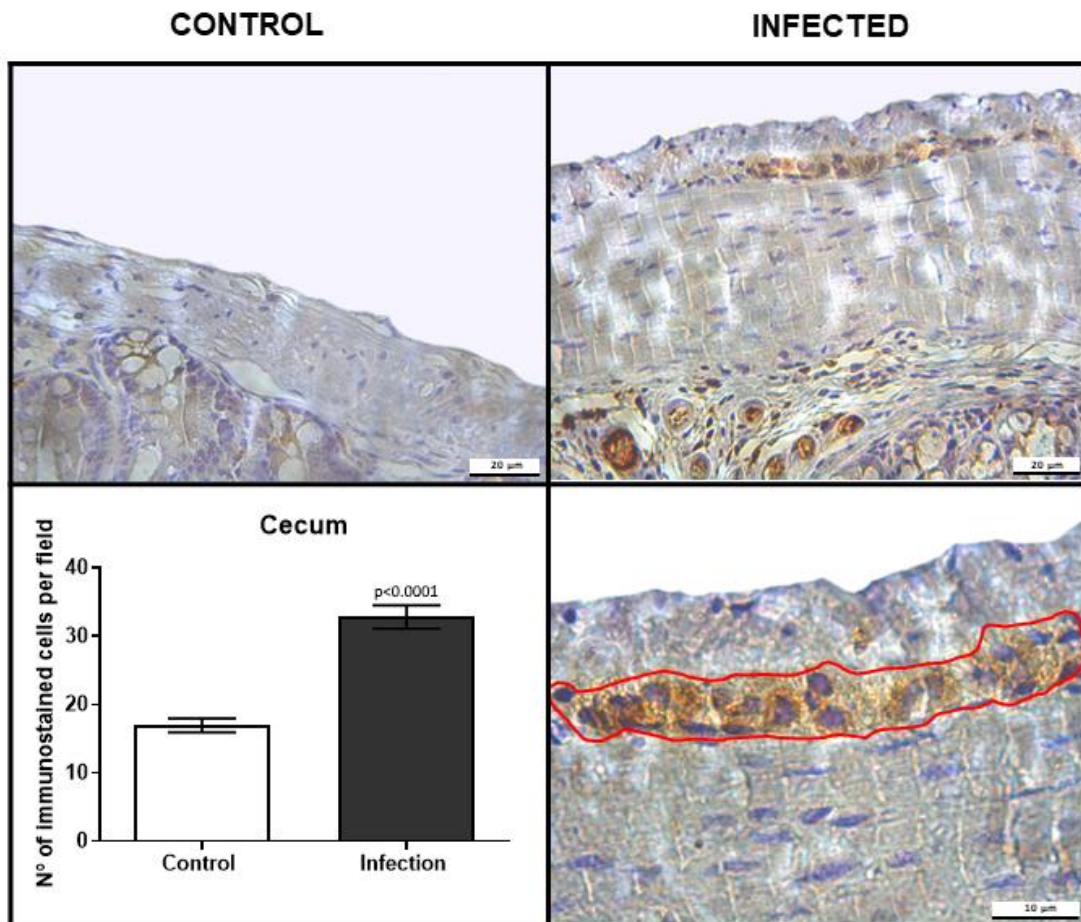


Figure 2: *C. difficile* infection increased the number of TLR4 immunostained cells *in vivo*. Immunohistochemistry photomicrographs illustrating cecum section tissue integrity in the control group (n=6) and the infection group (n=6) displaying immunostained cells in the myenteric plexus (highlighted by the red line)—scale bars: 20 µm in the superior image and ten µm in the inferior image. The quantification of immunostained cells per field was performed in 10 fields for each animal, and the data are presented as mean ± EPM.

3.2. *C. difficile* toxins induce upregulation of TLR4 gene and protein expression in EGC.

EGCs exposed to TcdA or TcdB for 18h displayed a statistically significant increase in TLR4-immunoexpression, visualized through brown stained EGC cells (**Figure 3A**) and higher fluorescence intensity in these cells (**Figure 3B**). Confirming these findings, exposure to *C.*

difficile toxins increased TLR4 gene expression (Figure 3C) and protein expression detected by Western Blot (Figure 3D).

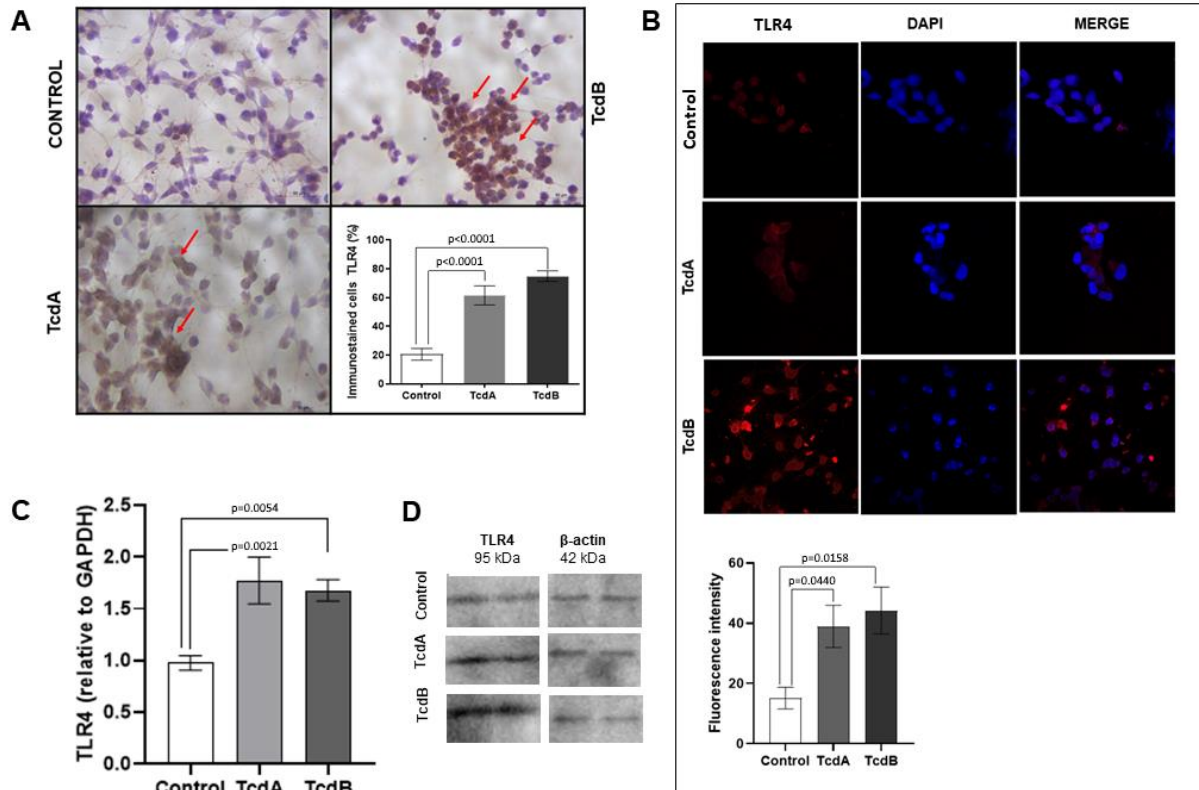


Figure 3: *C. difficile* toxins A (TcdA) and B (TcdB) induce increased TLR4 gene and protein expression in EGCs. **A.** Arrows are pointing to TLR4-immunopositive cells, stained in brown. The control group exhibited few immunostained cells, while EGCs challenged with TcdA or TcdB showed a notable increase in TLR4-immunoexpression. Scale bars: 50 μ m. **B.** Photomicrographs of TLR4 (red) immunostaining and DAPI (blue) nuclear staining in EGCs exposed to TcdA and TcdB for 18h and measurement of TLR4 fluorescence intensity in EGCs using ImageJ software. Merge represents the combined image of TLR-4 fluorescence and nuclear staining. **C.** TcdA and TcdB induced upregulation in relative TLR4 gene expression analyzed by RealTime-PCR assay. **D.** Representative Western Blot images demonstrating the increase in TLR4 protein expression induced by *C. difficile* toxins. β -actin

was used as a housekeeping protein. The data represents the mean \pm SEM. One-way ANOVA followed by the Tukey test was used.

3.3. TLR4 antagonist prevented NFkB-p65 nuclear translocation induced by *C. difficile* toxins in EGCs.

To explore the role of TLR4 in the inflammatory effects triggered by TcdA and TcdB in EGCs, we pre-treated EGCs with a TLR4-specific antagonist (C34, 50 μ M) before incubating them with TcdA or TcdB. Photomicrographs illustrate the localization of NKFB-p65 (**Figure 4A**), indicating its augmented translocation to the nucleus in response to *C. difficile* toxins. We found that C34 decreased the percentage of NFkB-p65 translocation to the nucleus induced by TcdA ($p < 0.0052$) and TcdB ($p < 0.0026$) in EGCs (**Figure 4B**).

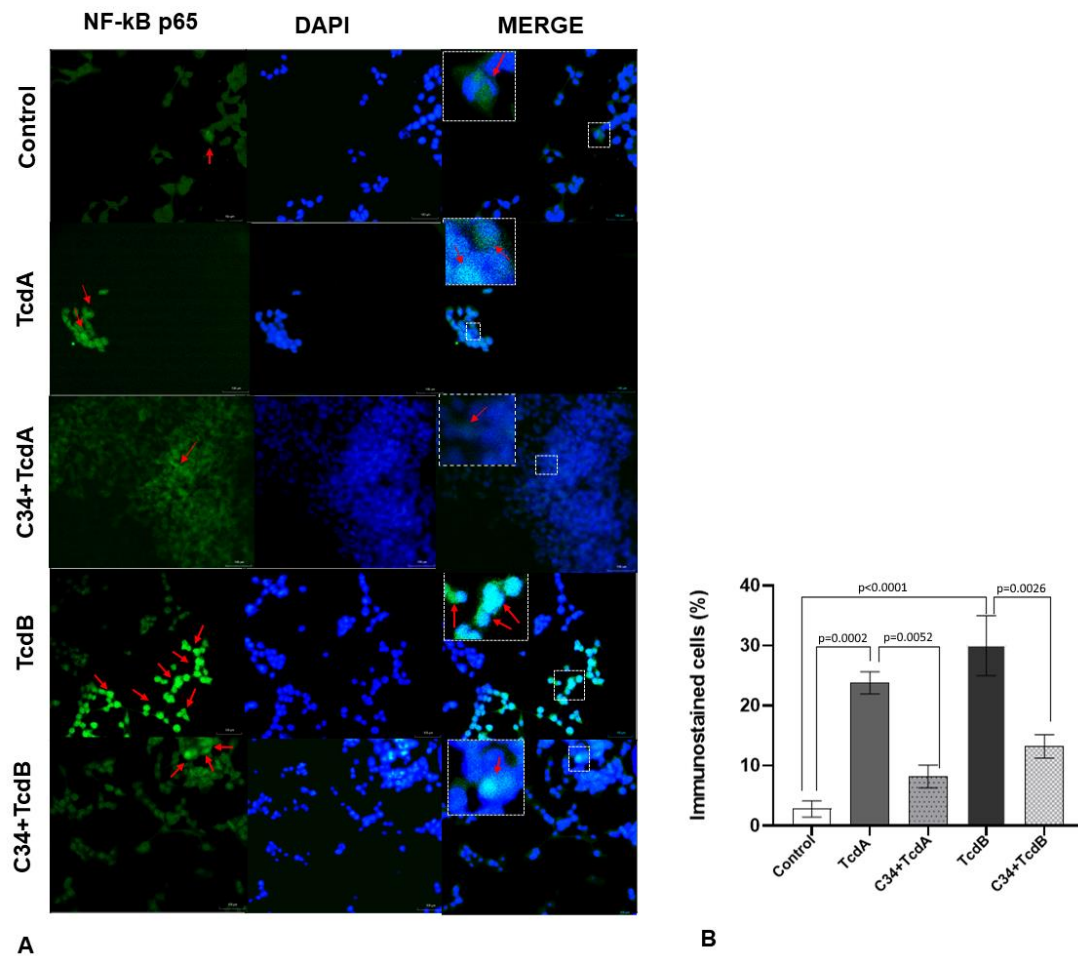


Figure 4: TLR4 antagonist decreases NFkB-p65 nuclear translocation induced by TcdA and TcdB. **A.** Representative photomicrographs illustrating NFkB (green) immunostaining and DAPI (blue) nuclear staining in EGCs exposed to TcdA or TcdB after 18 hours of incubation. The nuclear translocation is indicated (arrows) by the green fluorescence (Alexa fluor 488). Merge represents the combined image of NFkB-p65 fluorescence and nuclear staining. **B.** The percentage of NFkB-p65 positive cells was evaluated for every 100 cells counted (n=5), focusing on the hot areas of each group. The data are presented as the mean \pm SEM. The one-way ANOVA test was followed by the Tukey test; the p-value is represented in the graph.

3.4. TLR4 Antagonist Prevents Increase in TNF- α Protein Expression, but not IL-6 Gene Expression Induced by *C. difficile* Toxins in EGCs.

Our findings suggest that the TLR4 antagonist effectively inhibits the increased TNF- α protein expression induced by both TcdA and TcdB (Figure 5A, 4B). However, C34 does not impede the TcdA and TcdB-induced upregulation of IL-6 gene expression in EGCs (Figure 5C).

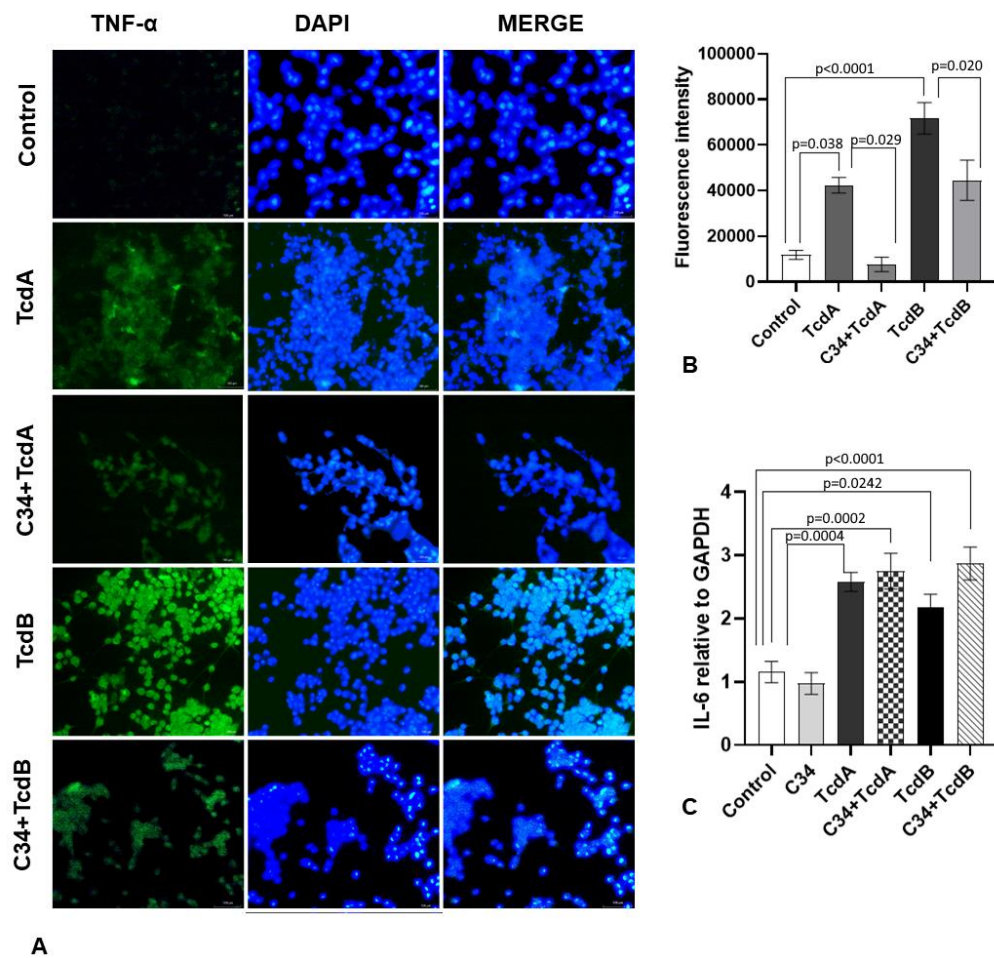


Figure 5: TLR4 antagonist prevents increased TNF- α expression in EGCs induced by TcdA and TcdB. **A.** Representative photomicrographs of TNF- α (green) immunostaining and DAPI (blue) nuclear staining in EGCs exposed to TcdA or TcdB after 18 h of incubation. Merge represents the combined image of TNF- α fluorescence and nuclear staining. **B.** The intensity

of the green fluorescence (Alexa fluor 488) was determined with ImageJ in the hot areas. The data are presented as the mean \pm SEM, and statistical analysis was performed using the one-way ANOVA test followed by the Tukey test. The corresponding p-values are indicated in the graph. **C.** TcdA and TcdB significantly increased relative IL-6 gene expression, as analyzed by RealTime-PCR assay.

3.5. TLR4 antagonist decreases cellular death induced by *C. difficile* toxins.

To investigate the role of the TLR4 receptor in cell death induced by *C. difficile* toxins, we examined the impact of C34, a TLR4 antagonist, on cleaved caspase-3 immunostaining in EGCs and the binding of annexin and phosphatidylserine. Inhibition of TLR4 significantly reduced the immunostaining of cleaved caspase-3 ($p < 0.0001$, **Figure 6A, 6B**). Furthermore, the pre-incubation of EGCs with C34 effectively prevented cell death, as evidenced by the analysis of phosphatidylserine-annexin V binding ($p < 0.0001$, **Figure 6C**).

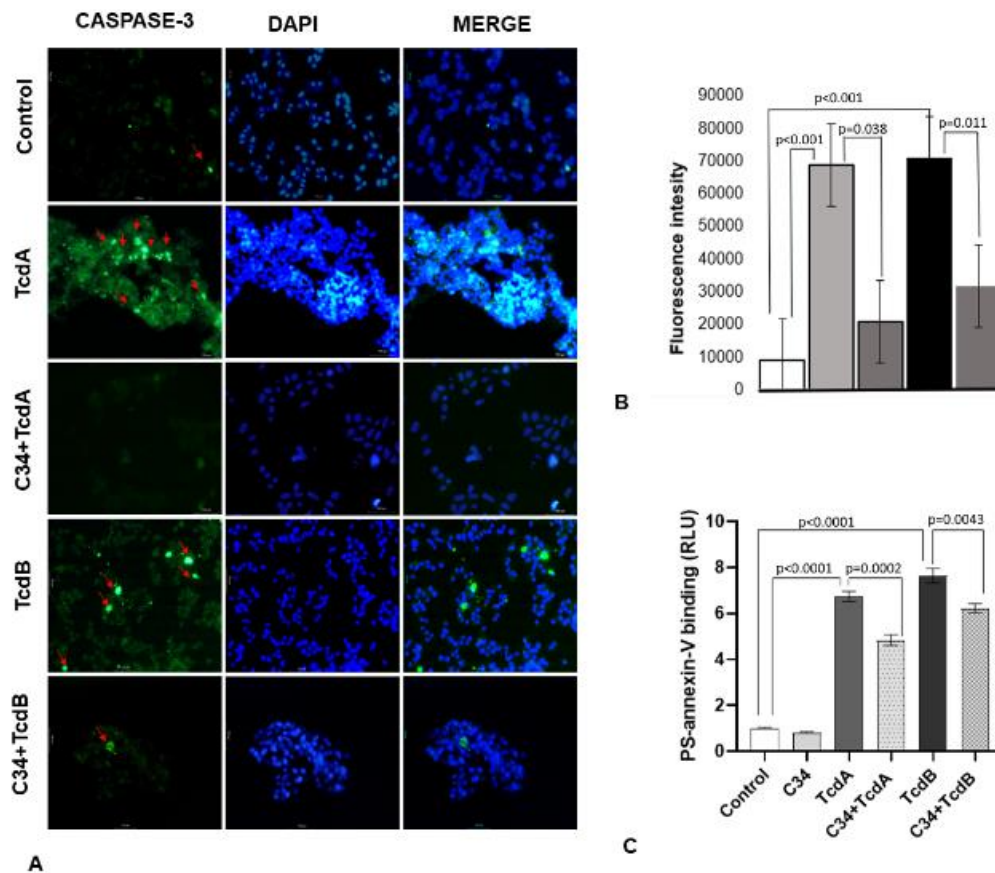


Figure 6: TLR4 antagonist decreases cellular death induced by TcdA and TcdB. **A.** Representative photomicrographs of cleaved caspase-3 (green) immunostaining and DAPI (blue) nuclear staining in EGCs exposed to TcdA and TcdB for 18 h. Merge represents the combined image of cleaved caspase-3 fluorescence and nuclear staining. **B.** The percentage of cleaved caspase-3 immunostained cells was evaluated in 5 fields per group, and 100 cells were counted in the hot areas. **C.** Cell death was analyzed by RealTime-Glo annexin V apoptosis assay in EGCs incubated for 18 h with TcdA, TcdB, a C34 (25 μ M) antagonist was added one hour before toxin challenge. The one-way ANOVA test was used for statistical analysis, followed by the Tukey test; The corresponding p-values are indicated in the graph.

4. Discussion

Our study aimed to uncover the interplay between *C. difficile* and the host's innate immune response, specifically focusing on the involvement of TLR4 and its influence on

enteric glial cells (EGCs). A notable strength of this investigation lies in examining the impact of *C. difficile* toxins on EGCs, an area less explored than the predominant focus on intestinal epithelial and inflammatory cells in existing research. Enteric glial cells are increasingly acknowledged as pivotal regulators of diverse intestinal functions, including motility, secretion, epithelial barrier integrity, and overall gut balance in healthy and diseased conditions. Undergoing a transition into a reactive glial phenotype in response to intestinal inflammation, these cells contribute to enteric gliosis [24]. Our recent studies have highlighted EGC reactivity in *C. difficile* infection [19], emphasizing the impact of *C. difficile* toxins on these cells, thereby amplifying the inflammatory response [22]. However, further investigations into the potential influence of EGCs on CDI outcomes are imperative.

The present study found a significant upregulation of TLR4 expression in cecum tissues from *C. difficile*-infected animals. Additionally, in our *in vitro* experiments, exposure to *C. difficile* toxins increased TLR4 expression in enteric glial cells (EGCs). Moreover, a TLR4 inhibitor caused a downregulation of inflammatory markers and a mitigation of cell death induced by *C. difficile* toxins.

TLR receptors play a crucial role in innate immunity and are vital in gram-positive and gram-negative bacterial infections [25]. Increased TLR4 expression has been linked to several conditions, such as hypoxia-induced damage to intestinal barrier function and bacterial translocation[26], necrotizing enterocolitis[27], systemic inflammation induced by chemotherapy drug doxorubicin [28], and neuroinflammation triggered by LPS[29]. Thus, upregulation of the TLR4 receptor is a recurring phenomenon in inflammatory conditions.

In our study, increased TLR4 expression was detected in the submucosa of the cecum in mice with CDI. Lai et al. [25]also reported increased TLR4 protein expression in mice's large intestine and rectum in *C. difficile* infection.

Histologically, the enteric nervous system is organized as plexuses, consisting of interconnected neurons and glial cells [30]. *C. difficile* toxins disrupt the intestinal epithelial barrier and can affect underlying cells, including enterocytes, colonocytes, enteric neurons, and EGCs[9]. Previous studies from our group have demonstrated the susceptibility of EGCs to TcdA and TcdB [11,19]. However, further investigations are necessary to understand the mechanisms involved in this effect. Based on this, we explored the role of the TLR4 receptor in *C. difficile* infection (CDI), focusing on the enteric nervous system.

The TLR4 signaling pathway is categorized into two pathways: a myeloid differentiation factor 88 (MyD88) -dependent pathway, leading to the activation of nuclear factor kappa beta (NF- κ B) and subsequent induction of inflammatory cytokines, and a TRIF-dependent pathway, responsible for inducing Type I interferon (IFN) along with inflammatory cytokines [31–33].

Here, we demonstrate that TLR4 is low expressed in EGCs under physiologic conditions. However, challenges with TcdA and TcdB resulted in an upregulation of TLR4 expression and subsequent activation, suggesting the involvement of this receptor in the pathogenesis of CDI.

Previous studies have shown that EGCs release nitric oxide through TLR4 upon activation, releasing pro-inflammatory cytokines contributing to exacerbated gut inflammation[12]. With this understanding, we hypothesized that modulating TLR4 could benefit CDI. In the present study, we explored the impact of TLR4 receptor inhibition on the response of EGCs to *C. difficile* toxins. This investigation covered various aspects, including the activation of NF- κ B, the expression of pro-inflammatory cytokines, and cell death.

NF- κ B activation involves the enzymatic degradation of the bound inhibitory protein, leading to the exposure of the nuclear localization signal (NLS) on p50 and p65. This enables the translocation of subunits from the cytoplasm to the nucleus [34]. Our study observed that

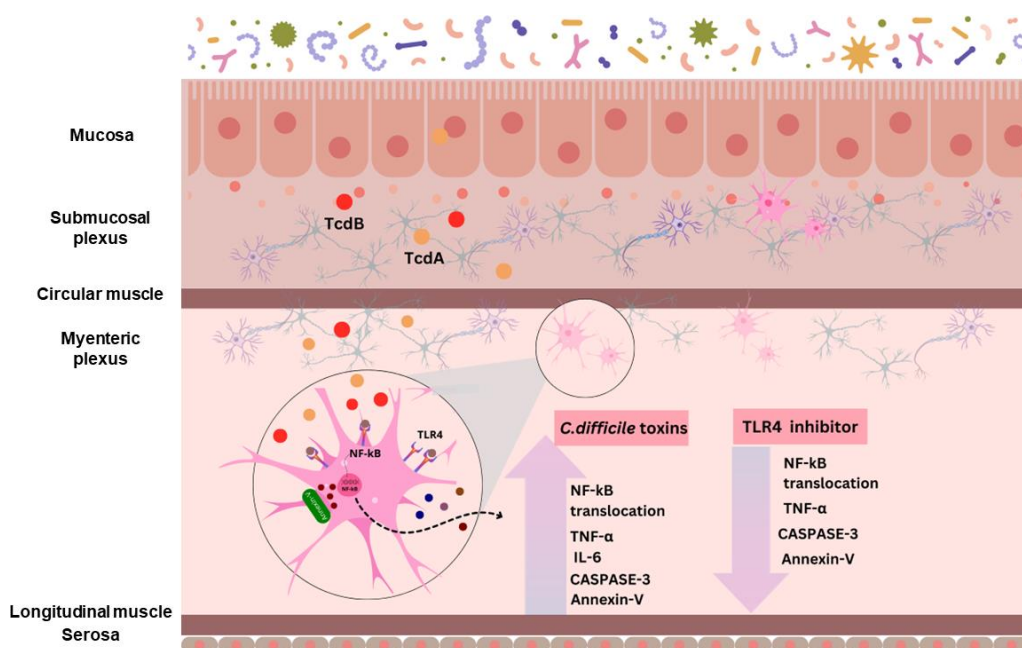
the TLR4 inhibitor decreased NF- κ B activation, as indicated by the reduced translocation of NF- κ B p65 to the nucleus.

CDI induces a systemic inflammatory cascade characterized by elevated levels of IL-6 and TNF- α [35]. Therefore, we aimed to investigate whether the inhibition of TLR4 could prevent the upregulation of these cytokines induced by TcdA and TcdB. Our findings revealed that C34 prevented the *C. difficile*-induced increase in TNF- α protein expression in EGCs but did not impact IL-6 gene expression in these cells. The literature has argued that the magnitude of IL-6 upregulation in CDI is greater than that of TNF- α [35], and IL-6 can be modulated by various factors, including other receptors involved in the pathogenesis of CDI[11,22]. Hence, TLR4 inhibition alone might not be enough to prevent the overregulation induced by *C. difficile* toxins on IL-6. Interestingly, IL-6 is a pleiotropic cytokine with destructive and beneficial potentials and can even inhibit the apoptosis of neuronal cells after injury[36].

On the contrary, a study has demonstrated that EGCs exhibit increased susceptibility to TcdB-induced apoptosis when triggered by TNF- α and IFN- γ [9]. Given that both TNF- α and IFN- γ can be released from the activation of TLR4, our focus shifted to exploring the impact of TLR4 inhibition on cell death. Interestingly, the TLR4 antagonist (C34) notably reduced EGCs' mortality. This reduction was evidenced by diminished PS-annexin V binding and caspase 3 activity. These findings strongly indicate the potential involvement of this receptor in facilitating EGCs' death induced by *C. difficile* toxins. Notably, the role of TLR4 in cell death has been observed in other cell types, such as endothelial cells[37] and in the mouse brain [38]. In EGCs, TcdB demonstrated the ability to trigger three apoptotic pathways[10], among which the caspase pathway stands out. This pathway involves the activation of caspase-3, caspase-7 (effector caspases), caspase-9, and PARP, all associated with increased apoptosis.

Our collected data present compelling evidence of TLR4's substantial involvement in CDI pathogenesis, showcasing its upregulation in the intestines of infected mice and enteric glial cells. Moreover, our study emphasizes the efficacy of the TLR4 inhibitor in reducing inflammatory markers and cell death. These findings have important clinical implications, particularly considering the emerging epidemic and the diminishing efficacy of existing antimicrobial therapies for severe CDI. Relying on immune-based antimicrobial therapies, such as TLRs, could offer a promising new avenue in combatting intestinal infection[25].

While our study provides valuable insights, its reliance on a mouse model may limit the direct applicability of findings to human infections. Nevertheless, our study is pivotal in advancing and perpetuating research on the interplay between TLR4 receptors and *C. difficile* toxins. It encourages the exploration of other components within the TLR4 pathway, including the MyD88-dependent pathway (MyD88/NF- κ B) and the MyD88-independent pathway leading to interferons. Moreover, exploring diverse signaling pathways could benefit further investigation into the TLR4 inhibitor's impact on cell death. Future studies could be designed to delve deeper into this receptor's involvement and its clinical implications in the outcomes of CDI.



Graphic Abstract: Proposed model of the role of TLR4 in the effect of *Clostridioides difficile* in EGCs. TcdA and TcdB activate TLR4 in EGCs, promoting the translocation of NF κ B and TNF- α and IL-6 expression and caspase 3 activation that promotes cell death.

Competing interests

The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

Funding

This work was supported by PRONEX/FUNCAP/CNPq of Brazil through grant PR2-0101-00060.01.00/15.

Authors' contributions

Maria Lucianny Lima Barbosa: Project Administration, Investigation, Data curation, Writing- Original draft preparation. Dvison de Melo Pacífico: Investigation. Conceição da Silva Martins Rebouças: Investigation, Data Curation. Deiziane Viana da Silva Costa: Investigation, Data curation, Writing- Original draft preparation. Renata Ferreira de Carvalho Leitão: Writing- Reviewing and Editing. Gerly Anne de Castro Brito: Supervision, Funding Acquisition, Reviewing and Editing. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

We thank the Nucleus of Study in Microscopy and Image Processing (NEMPI) from Morphology Department of the Federal University of Ceará (UFC) for all histology and digital imaging services.

References

- [1] D.L. Suskind, D. Lee, P. Solan, G. Wahbeh, H. Hayden, M. Brittnacher, M. Nuding, S. Miller, Dietary therapy for clostridium difficile colonization: A case series, *Anaerobe* 57 (2019) 1–3. <https://doi.org/10.1016/J.ANAEROBE.2019.02.016>.
- [2] S.L. Kordus, A.K. Thomas, D.B. Lacy, Clostridioides difficile toxins: mechanisms of action and antitoxin therapeutics, *Nature Reviews Microbiology* 2021 20:5 20 (2021) 285–298. <https://doi.org/10.1038/S41579-021-00660-2>.
- [3] E.J. Kuijper, B. Coignard, P. Tüll, I. Poxton, J. Brazier, B. Duerden, M. Delmée, P. Mastrantonio, P. Gastmeier, F. Barbut, M. Rupnik, C. Suetens, A. Collignon, C. McDonald, D.N. Gerding, I. Tjallie van der Kooi, S. van den Hof, D.W. Notermans, A. Pearson, E. Nagy, A. Colville, M. Wilcox, P. Borriello, H. Pituch, N. Minton, Emergence of Clostridium difficile-associated disease in North America and Europe, *Clinical Microbiology and Infection* 12 (2006) 2–18. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01580.x>.
- [4] Y.P. Hung, J.C. Lee, B.Y. Tsai, J.L. Wu, H.C. Liu, H.C. Liu, H.J. Lin, P.J. Tsai, W.C. Ko, Risk factors of Clostridium difficile-associated diarrhea in hospitalized adults: Vary by hospitalized duration, *J Microbiol Immunol Infect* 54 (2021) 276–283. <https://doi.org/10.1016/J.JMII.2019.07.004>.
- [5] C.L. Costa, C.B. Mano de Carvalho, R.H. González, M.A.C. Gifoni, R. de A. Ribeiro, C. Quesada-Gómez, G.A. de C. Brito, Molecular epidemiology of Clostridium difficile infection in a Brazilian cancer hospital, *Anaerobe* 48 (2017) 232–236. <https://doi.org/10.1016/J.ANAEROBE.2017.10.001>.
- [6] CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States , (2019) 150. <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf> (accessed May 9, 2023).
- [7] A. Gupta, A.N. Ananthkrishnan, Economic burden and cost-effectiveness of therapies for Clostridioides difficile infection: a narrative review, *Therap Adv Gastroenterol* 14 (2021). <https://doi.org/10.1177/17562848211018654>.

- [8] K.E. Orrell, R.A. Melnyk, Large Clostridial Toxins: Mechanisms and Roles in Disease, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 85 (2021). <https://doi.org/10.1128/MMBR.00064-21/ASSET/2050FE72-854D-4978-AB93-02AA9865AB93/ASSETS/IMAGES/LARGE/MMBR.00064-21-F007.JPG>.
- [9] K. Fettucciari, P. Ponsini, D. Gioè, L. Macchioni, C. Palumbo, E. Antonelli, S. Coaccioli, V. Villanacci, L. Corazzi, P. Marconi, G. Bassotti, Enteric glial cells are susceptible to *Clostridium difficile* toxin B, *Cellular and Molecular Life Sciences* 74 (2017) 1527–1551. <https://doi.org/10.1007/S00018-016-2426-4/METRICS>.
- [10] K. Fettucciari, F. Marguerie, A. Fruganti, A. Marchegiani, A. Spaterna, S. Brancorsini, P. Marconi, G. Bassotti, *Clostridioides difficile* toxin B alone and with pro-inflammatory cytokines induces apoptosis in enteric glial cells by activating three different signalling pathways mediated by caspases, calpains and cathepsin B, *Cellular and Molecular Life Sciences* 79 (2022). <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04459-z>.
- [11] A. V. Loureiro, L.I. Moura-Neto, C.S. Martins, P.I.M. Silva, M.B.S. Lopes, R.F.C. Leitão, J.M. Coelho-Aguiar, V. Moura-Neto, C.A. Warren, D.V.S. Costa, G.A.C. Brito, Role of Pannexin-1-P2X7R signaling on cell death and pro-inflammatory mediator expression induced by *Clostridioides difficile* toxins in enteric glia, *Front Immunol* 13 (2022). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.956340/FULL>.
- [12] F. Turco, G. Sarnelli, C. Cirillo, I. Palumbo, F. De Giorgi, A. D’Alessandro, M. Cammarota, M. Giuliano, R. Cuomo, Enteroglia-derived S100B protein integrates bacteria-induced Toll-like receptor signalling in human enteric glial cells, *Gut* 63 (2014) 105–115. <https://doi.org/10.1136/GUTJNL-2012-302090>.
- [13] H. Hug, M.H. Mohajeri, G. La Fata, Toll-Like Receptors: Regulators of the Immune Response in the Human Gut, *Nutrients* 10 (2018). <https://doi.org/10.3390/NU10020203>.
- [14] Y. Zhang, X. Liang, X. Bao, W. Xiao, G. Chen, Toll-like receptor 4 (TLR4) inhibitors: Current research and prospective, *Eur J Med Chem* 235 (2022) 114291. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2022.114291>.

- [15] Y. Yoshino, T. Kitazawa, M. Ikeda, K. Tatsuno, S. Yanagimoto, S. Okugawa, H. Yotsuyanagi, Y. Ota, Clostridium difficile flagellin stimulates toll-like receptor 5, and toxin B promotes flagellin-induced chemokine production via TLR5, *Life Sci* 92 (2013) 211–217.
<https://doi.org/10.1016/J.LFS.2012.11.017>.
- [16] A. Ryan, M. Lynch, S.M. Smith, S. Amu, H.J. Nel, C.E. McCoy, J.K. Dowling, E. Draper, V.O. Reilly, C. McCarthy, J.O. Brien, M.J.O. Connell, B. Keogh, C.O. Morton, T.R. Rogers, P.G. Fallon, A. Luke, O. Neill, D. Kelleher, C.E. Loscher, A Role for TLR4 in Clostridium difficile Infection and the Recognition of Surface Layer Proteins, *7* (2011). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002076>.
- [17] E. Borysiewicz, D. Fil, G.W. Konat, Rho proteins are negative regulators of TLR2, TLR3, and TLR4 signaling in astrocytes, *J Neurosci Res* 87 (2009) 1565–1572. <https://doi.org/10.1002/jnr.21968>.
- [18] G.W. Konat, A. Krasowska-Zoladek, M. Kraszpulski, Statins enhance toll-like receptor 4-mediated cytokine gene expression in astrocytes: Implication of Rho proteins in negative feedback regulation, *J Neurosci Res* 86 (2008) 603–609. <https://doi.org/10.1002/jnr.21509>.
- [19] D.V.S. Costa, V. Moura-Neto, D.T. Bolick, R.L. Guerrant, J.A. Fawad, J.H. Shin, P.H.Q.S. Medeiros, S.E. Ledwaba, G.L. Kolling, C.S. Martins, V. Venkataraman, C.A. Warren, G.A.C. Brito, S100B Inhibition Attenuates Intestinal Damage and Diarrhea Severity During Clostridioides difficile Infection by Modulating Inflammatory Response, *Front Cell Infect Microbiol* 11 (2021).
<https://doi.org/10.3389/FCIMB.2021.739874>.
- [20] L.T. Nogueira, D.V.S. Costa, A.S. Gomes, C.S. Martins, A.M.H.P. Silva, J.M. Coelho-Aguiar, P. Castelucci, R.C.P. Lima-Júnior, R.F.C. Leitão, V. Moura-Neto, G.A.C. Brito, The involvement of mast cells in the irinotecan-induced enteric neurons loss and reactive gliosis, *J Neuroinflammation* 14 (2017). <https://doi.org/10.1186/S12974-017-0854-1>.
- [21] C.M. Tinoco-Veras, A.A.Q.A. Santos, J. Stipursky, M. Meloni, A.P.B. Araujo, D.A. Foschetti, D. López-Ureña, C. Quesada-Gómez, R.F.C. Leitão, F.C.A. Gomes, G.A. de C. Brito, Transforming growth factor

β 1/SMAD signaling pathway activation protects the intestinal epithelium from *Clostridium difficile* toxin A-induced damage, *Infect Immun* 85 (2017). https://doi.org/10.1128/IAI.00430-17/SUPPL_FILE/ZII999092181S1.PDF.

- [22] D.V.S. Costa, J.H. Shin, S.M. Goldbeck, D.T. Bolick, F.S. Mesquita, A. V. Loureiro, M.J. Rodrigues-Jesus, G.A.C. Brito, C.A. Warren, Adenosine receptors differentially mediate enteric glial cell death induced by *Clostridioides difficile* Toxins A and B, *Front Immunol* 13 (2023) 956326. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.956326/BIBTEX>.
- [23] L.M. Rocha-Ramírez, U. Hernández-Chiñas, D. Baños-Rojas, J. Xicohtencatl-Cortés, M.E. Chávez-Berrocal, G. Rico-Rosillo, R. Kretschmer, C.A. Eslava, Pet serine protease from enteroaggregative *Escherichia coli* stimulates the inflammatory response activating human macrophages, *BMC Microbiol* 16 (2016). <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0775-7>.
- [24] A. Linan-Rico, F. Ochoa-Cortes, R. Schneider, F.L. Christofi, Mini-review: Enteric glial cell reactions to inflammation and potential therapeutic implications for GI diseases, motility disorders, and abdominal pain, *Neurosci Lett* 812 (2023) 137395. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2023.137395>.
- [25] Y.H. Lai, B.Y. Tsai, C.Y. Hsu, Y.H. Chen, P.H. Chou, Y.L. Chen, H.C. Liu, W.C. Ko, P.J. Tsai, Y.P. Hung, The Role of Toll-Like Receptor-2 in *Clostridioides difficile* Infection: Evidence From a Mouse Model and Clinical Patients, *Front Immunol* 12 (2021) 691039. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.691039/BIBTEX>.
- [26] H. Luo, P. Guo, Q. Zhou, Role of TLR4/NF-kB in Damage to Intestinal Mucosa Barrier Function and Bacterial Translocation in Rats Exposed to Hypoxia, (2012). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046291>.
- [27] A. Soliman, K.S. Michelsen, H. Karahashi, J. Lu, F.J. Meng, X. Qu, T.R. Crother, S. Rabizadeh, S. Chen, M.S. Caplan, M. Arditi, T. Jilling, Platelet-Activating Factor Induces TLR4 Expression in Intestinal

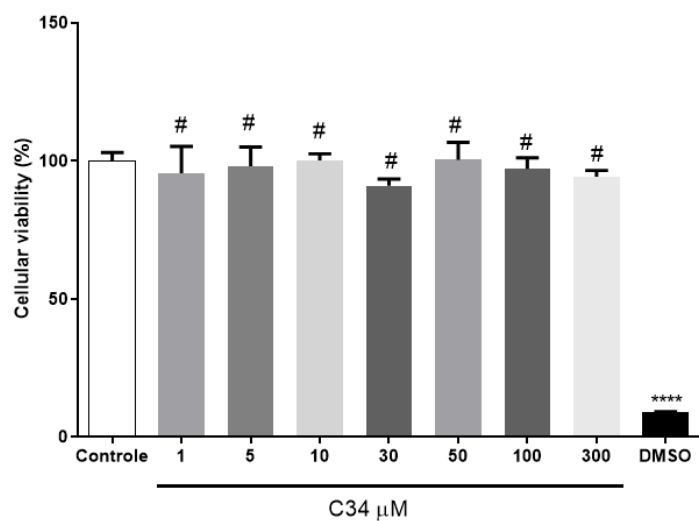
Epithelial Cells: Implication for the Pathogenesis of Necrotizing Enterocolitis, *PLoS One* 5 (2010) 15044. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0015044>.

- [28] L. Wang, Q. Chen, H. Qi, C. Wang, C. Wang, J. Zhang, L. Dong, Doxorubicin-induced systemic inflammation is driven by upregulation of toll-like receptor TLR4 and endotoxin leakage, *Cancer Res* 76 (2016) 6631–6642. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-3034/652248/AM/DOXORUBICIN-INDUCED-SYSTEMIC-INFLAMMATION-IS>.
- [29] Y. Mo, L. Wang, M. Ren, W. Xie, X. Ye, B. Zhou, A. Zhang, Q. Dai, J. Wang, Electroacupuncture prevents LPS- induced neuroinflammation via upregulation of PICK-TLR4 complexes in the microglia of hippocampus, *Brain Res Bull* 177 (2021) 295–304. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESBULL.2021.10.010>.
- [30] Tortora, Derrickson: Principles of Anatomy and Physiology, 13th Edition - Student Companion Site, (n.d.). <https://bcs.wiley.com/he-bcs/Books%20?action=index&bcsId=6205&itemId=0470565101> (accessed October 24, 2023).
- [31] Y. Lu, X. Li, S. Liu, Y. Zhang, D. Zhang, Toll-like receptors and inflammatory bowel disease, *Front Immunol* 9 (2018) 326971. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.00072/BIBTEX>.
- [32] K. Takeda, S. Akira, Toll-Like Receptors, *Curr Protoc Immunol* 109 (2015) 14.12.1-14.12.10. <https://doi.org/10.1002/0471142735.IM1412S109>.
- [33] N.N. Kuzmich, K. V. Sivak, V.N. Chubarev, Y.B. Porozov, T.N. Savateeva-Lyubimova, F. Peri, TLR4 Signaling Pathway Modulators as Potential Therapeutics in Inflammation and Sepsis, *Vaccines (Basel)* 5 (2017). <https://doi.org/10.3390/VACCINES5040034>.
- [34] M. Herkenham, P. Rathore, P. Brown, S.J. Listwak, Cautionary notes on the use of NF- κ B p65 and p50 antibodies for CNS studies, *J Neuroinflammation* 8 (2011) 1–14. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-141/FIGURES/6>.

- [35] H. Yu, K. Chen, Y. Sun, M. Carter, K.W. Garey, T.C. Savidge, S. Devaraj, M.E. Tessier, E.C. Von Rosenvinge, C.P. Kelly, M.F. Pasetti, H. Feng, Cytokines are markers of the *Clostridium difficile*-induced inflammatory response and predict disease severity, *Clinical and Vaccine Immunology* 24 (2017). <https://doi.org/10.1128/CVI.00037-17>.
- [36] K.K. Kummer, M. Zeidler, T. Kalpachidou, M. Kress, Role of IL-6 in the regulation of neuronal development, survival and function, *Cytokine* 144 (2021) 155582. <https://doi.org/10.1016/J.CYTO.2021.155582>.
- [37] W. Li, G. Feng, J.M. Gauthier, I. Lokshina, R. Higashikubo, S. Evans, X. Liu, A. Hassan, S. Tanaka, M. Cicka, H.M. Hsiao, D. Ruiz-Perez, A. Bredemeyer, R.W. Gross, D.L. Mann, Y.Y. Tyurina, A.E. Gelman, V.E. Kagan, A. Linkermann, K.J. Lavine, D. Kreisel, Ferroptotic cell death and TLR4/Trif signaling initiate neutrophil recruitment after heart transplantation, *J Clin Invest* 129 (2019) 2293–2304. <https://doi.org/10.1172/JCI126428>.
- [38] T. Muhammad, M. Ikram, R. Ullah, S. Ur Rehman, M. Ok Kim, nutrients Hesperetin, a Citrus Flavonoid, Attenuates LPS-Induced Neuroinflammation, Apoptosis and Memory Impairments by Modulating TLR4/NF- κ B Signaling, (2019). <https://doi.org/10.3390/nu11030648>.

Supplementary data

Figure S1



The viability of CGEs was assessed by the MTT assay after 18h of incubation with C34. DMSO was used as a killing control. Data were presented as mean \pm e.p.m. **** p <0.0001 versus control group and # p <0.0001 versus DMSO group. One-way ANOVA followed by Tukey's test.

Molecular epidemiology and antimicrobial resistance in *Clostridioides difficile* strains isolated from children and adolescents in a tertiary referral pediatric hospital in Fortaleza, Brazil

Hildenia Baltasar Ribeiro Nogueira^{a,b,c}, Cecília Leite Costa^{b,d}, Carlos Quesada-Gómez^e, Dvison de Melo Pacífico^b, Eliane de Oliveira Ferreira^f, Renata Ferreira de Carvalho Leitão^{b##}, Gerly Anne de Castro Brito^{b#}.

These authors contributed equally to this work and shared the last authorship

^aAlbert Sabin Children's Hospital, Fortaleza, Ceará, Brazil. R. Tertuliano Sales, 544 - Vila União, Fortaleza - CE, Brazil, 60410-794. hildenia@unifor.br

^bNúcleo de Microscopia e Processamento de Imagens (NEMPI), Department of Morphology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil. R. Delmiro de Faria s/n, Rodolfo Teófilo, Fortaleza -CE, Brazil, 60430-160. renata.carvalho@ufc.br; ceciliacosta@hotmail.com; gerlybrito@hotmail.com; dvisonpacifico@gmail.com

^cUniversity of Fortaleza, Av. Washington Soares, 1321 - Edson Queiroz, Fortaleza - CE, Brazil, 60811-905. hildenia@unifor.br

^dChristus University Center, R. João Adolfo Gurgel, 133 - Cocó, Fortaleza - CE, Brazil, 60190-180. ceciliacosta@hotmail.com

^eFacultad de Microbiología and Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, Universidad de Costa Rica. Sede Rodrigo Facio. 2060-1000 San José, Costa Rica. carlos.quesada@ucr.ac.cr

^fFederal University of Rio de Janeiro, Institute of Microbiology Paulo de Góes, Laboratory of Biology of Anaerobes, Bloco I - Centro de Ciências da Saúde - Cidade Universitária da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro - RJ, 21941-902, Brazil. eliane_ferreirarj@micro.ufrj.br

*Correspondence: Renata Ferreira de Carvalho Leitão, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará. Department of Morphology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil. R. Delmiro de Faria s/n, Rodolfo Teófilo, Fortaleza -CE, Brazil, 60430-160. renata.carvalho@ufc.br

Abstract

Background: *C. difficile* has been increasingly reported as a cause of gastrointestinal disease in children, ranging from mild self-limiting diarrhea to severe conditions such as pseudomembranous colitis and toxic megacolon. Only two pediatric research groups reported the presence of *C. difficile* infection in Brazilian children, but no previous research has examined *C. difficile* infection among children in northeastern Brazil. This prospective cross-sectional study investigated the molecular epidemiology and antimicrobial resistance of *C. difficile* strains isolated from children and adolescents with diarrhea referred to a tertiary pediatric hospital in Brazil while exploring the associated risk factors. **Results:** Toxin positivity or *C. difficile* isolation was found in 30.4% (17/56) samples. *C. difficile* was isolated from 35% (6/17) samples. Four toxigenic strains were identified (*tpi* +, *tcdA* +, *tcdB* +, *cdtB* -, without *tcdC* deletions) belonging to PCR ribotypes and PFGE-pulsotypes: 046 (new pulsotype 1174), 106 (NAP11), 002 (new pulsotype 1274), 012 (new pulsotype NML-1235). Two of the six isolates belonging to ribotypes 143 and 133 were non-toxigenic. All toxigenic strains were sensitive to metronidazole and vancomycin. Regarding the clinical manifestation, diarrhea lasted for an average of 11 days, ranging from 3 to 50 days and was often associated with mucus and/or blood. All six patients from whom the *C. difficile* was isolated had a chronic disease diagnosis, with these comorbidities as the main risk factors. **Conclusion:** Our research sheds light on the evolving epidemiology of *Clostridioides difficile*-associated diarrhea (CDI) in children in northeastern Brazil, revealing a substantial CDI frequency of 30.4%, with toxigenic strains detected in 76.4% of cases, highlighting a higher prevalence compared to earlier Brazilian studies. In the globalized world, an understanding of disease-generating strains, the associated risk factors, clinical manifestation, and antimicrobial sensitivity has fundamental epidemiological importance and draws attention to preventive measures, allowing for more decisive action.

Keywords: *Clostridioides difficile* infection; *C. difficile*-associated diarrhea; Children; Pediatric diarrhea.

Introduction

Clostridioides difficile, a Gram-positive, spore-forming, anaerobic bacterium, is the foremost cause of healthcare-associated diarrhea worldwide. While it remains the primary contributor to healthcare-related diarrhea among adults in the United States, it is also increasingly acknowledged as a significant pathogen impacting children.¹

The carriage rate of non-toxigenic *C. difficile* is notably high among newborns, implying a commensal status for this bacterium within this specific population segment.^{1,2} Colonization rates tend to decrease with increasing age, with children older than two years exhibiting rates similar to those observed in adults.² Nevertheless, toxigenic strains may also colonize asymptomatic infants during hospitalization and within the community.² For reasons still unknown, these babies colonized with toxigenic *C. difficile* rarely develop clinical symptoms, unlike older children and adults who are susceptible to severe diarrhea and colitis.

In recent decades, a significant increase in the incidence of CDI has been reported, even in populations previously considered low-risk, such as children. Despite the rising number of CDI cases in children, along with an increase in morbidity related to frequent recurrences,³ and evidence that infection in hospitalized children has a similar economic impact to that observed in adults,⁴ research on pediatric CDI remains considerably limited when compared to study in adults. Moreover, there has been a noteworthy rise in the prevalence rates of both healthcare-associated (HA-CDI) and community-associated (CA-CDI) CDI among pediatric populations.^{5,6,7}

Given the limited information and diagnosis of *C. difficile* infection in Brazilian hospitals, especially in the Northeast region, and the global spread of this infection, our study aimed to conduct a local epidemiological investigation. Specifically, this study sought to identify comorbidities and risk factors associated with CDI in pediatric patients and investigate molecular epidemiology and antimicrobial resistance.

Methods

Fecal samples

Fifty-six fecal samples were collected between January 2015 and December 2017 from inpatients admitted to a tertiary referral pediatric hospital in Fortaleza, Brazil.

The study included children over 18 months and under 18 years old admitted to the ward or a specialized outpatient clinic with diarrhea, defined as the presence of three liquid stools over 24 hours were considered for inclusion.

Stool samples were collected from nosocomial or community-acquired diarrhea patients. Only two infants younger than 18 months were included in this study: one for having Hirschsprung's disease, a possible risk factor for developing severe *C. difficile* infections' and the other for sharing a ward with two children diagnosed with CDI. This infant was included based on literature showing that *C. difficile* spores can persist for long periods in healthcare environments and are resistant to most disinfectants and cleaning agents.

***C. difficile* toxin detection**

All samples were collected during episodes of active diarrhea, and each sample was subsequently tested for toxins A/B using the ProSpecT *C. difficile* Toxin A/B Microplate (Remel®), following the manufacturer's instructions.

***C. difficile* isolation**

Stool samples were also cultured using the standardized process of isolation and identification [8]. Briefly, alcohol shock was performed on the stool sample, followed by culture on cefoxitin and cycloserine and fructose agar (CCFA, Oxoid®) and fastidious anaerobe broth (FAB) for 5 and 15 days, respectively, incubated under anaerobic conditions (anaerobic jar 90% N₂, 10% CO₂). Then, the FAB was inoculated onto another CCFA. Characteristic *C. difficile* colonies on CCFA appeared yellowish, with a ground-glass appearance; they were circular with slightly filamentous edges and flat to low with a rounded elevation. The colonies were lipase- and lecithinase-negative using an egg-yolk agar (EYA). These colonies were inoculated onto Brucella agar with 5% lysed sheep blood and vitamin K (5 mg/ml) for identification and molecular tests. Identification was confirmed through testing with the RapID ANA II system (Remel®) and by amplifying the *tpi* gene by PCR.

The toxigenic profile of the isolates

Genomic DNA from each strain was obtained from overnight cultures in Brain Heart Infusion broth (BHI; Oxoid®) using the InstaGene™ reagent (BioRad®). Fragments of *tcdA*, *tcdB*, *cdtB*, and *tcdC* were amplified by PCR, utilizing established primers and conditions.⁸

PCR-ribotyping

Intergenic spacer regions were amplified for ribotyping using Bidet primers as described previously.⁹ PCR-ribotypes were determined by submitting data to the web database WEBRIBO (<http://webribo.ages.at>).

PCR ribotyping was analyzed by the Laboratory of Biology of Anaerobes of the Medical Microbiology Department - IMPG at the Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ).

PFGE typing

The PFGE procedure employed in this study was adapted from established protocols.⁸ Subsequently, the obtained images were analyzed using BioNumerics software (version 5.1, Applied Maths), and the resulting macrorestriction patterns were compared to those stored in the databases of the National Microbiology Laboratory of the Public Health Agency of Canada, located in Winnipeg, Canada and the University of Costa Rica.

Antimicrobial susceptibility testing

Minimum inhibitory concentrations (MIC) for clindamycin, levofloxacin, moxifloxacin, rifampicin, metronidazole, and vancomycin were determined using E-test® (bioMérieux®).¹⁰ Resistance breakpoints were established following the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines (M11-A9) as follows: clindamycin ≥ 8 mg/ml; moxifloxacin ≥ 4 mg/ml; rifampin ≥ 32 mg/ml, metronidazole ≥ 32 mg/ml and vancomycin > 2 mg/ml.

We used the moxifloxacin breakpoint for both ciprofloxacin and levofloxacin. In the case of vancomycin, we adhered to the guidelines provided by EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), accessible at http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/. As for rifampicin, we utilized the breakpoint established by O'Conner et al.¹¹

Statistical analyses

The data are presented as means \pm standard error (SEM) or as medians when applicable. Descriptive analysis of patient characteristics was conducted using univariate analysis and the Chi-square test. P values of <0.05 were considered statistically significant. All analyses were carried out using IBM SPSS® Statistics 20 software.

Results

A total of 56 specimens were evaluated. Diarrheic stool samples were collected from 49 children; five patients contributed with more than one sample, collected at different points during their hospitalization.

It was observed that 57.1% (32/56) of the individuals were from state capital, 50% female and 50% male. The average age was 10.5 (± 5.14) years. The children ranged in age from 15 months to 18 years. There are no significant differences in age, gender, or geographical origin between the positive and negative sampling (Chi-square. $P < 0.05$).

In this study, the frequency of *C. difficile* positivity (toxins and/or isolation) was 30.4% (17/56). Initially, *C. difficile* toxins were detected in 13 of 17 samples through toxin A/B rapid immunoassay (76.4%), among which two isolates were obtained. Four isolates were obtained from the toxin-negative samples, of which two were subsequently tested as toxigenic through PCR. Consequently, the percentage of *C. difficile* isolated in culture was 35% (6/17). None of the children presented more than one positive sample (Figure 1).

Flow
the
and

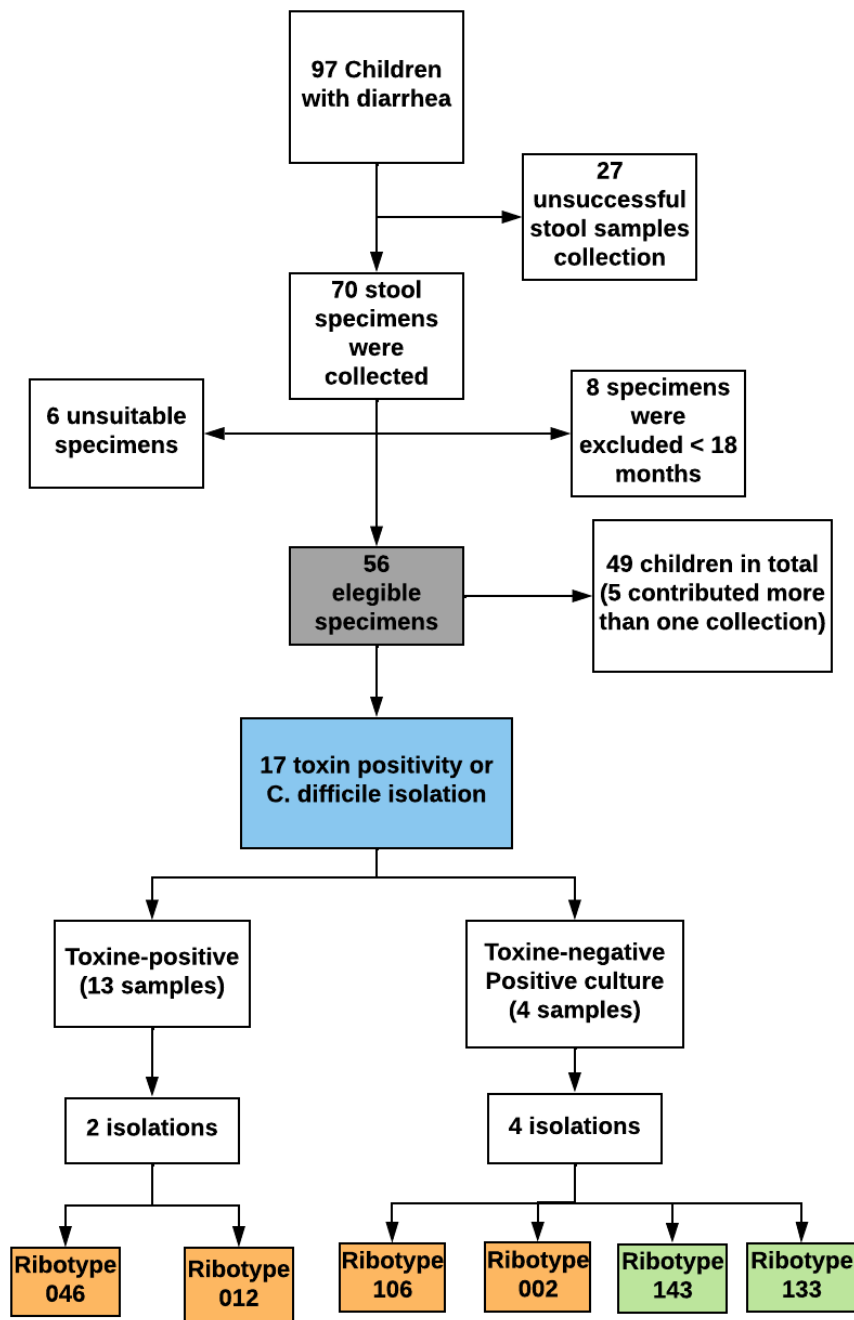


Figure 1 -
Chart
indicating
recruitment
isolation of

Clostridioides difficile in children with diarrhea at a tertiary hospital in Fortaleza, Brazil, between 2015 and 2017. Toxigenic ribotypes are highlighted in orange, while non-toxigenic ribotypes are highlighted in green.

According to the Laboratory of Biology of Anaerobes at UFRJ, the isolates of *C. difficile* belonged to six different ribotypes: 046, 106, 002, 143, 133, and 012 (Table 1).

Toxin and *tpi* gene fragments (definitive identification) were performed on all the isolated strains. PCR targeting *tpi*, *tcdA*, and *tcdB* genes were found in Medical Record Number (MRN)-1 (RT046), MRN 15 (RT106), MRN-54 (RT002), and MRN-58 (RT012) samples, but no deletion of the *tcdC* gene was found in these samples. The samples MRN-55 (RT143) and MRN-56 (RT133) exhibited non-toxic characteristics, and therefore genotyping by PFGE was not performed. The binding gene of the binary toxin was not detected in any of the samples (Table 1).

Table 1 - Characterization of the *C. difficile* strains isolated from patients hospitalized in Tertiary Pediatric Hospital, Fortaleza, Brazil (2015 – 2017)

STRAINS	RIBOTYPE	PCR	PULSOTYPE	MICs (ug/ml)					
				MET	VAN	CLI	LEV	MXF	RIM
MRN-01	046	<i>tpi+</i> , <i>tcdA+</i> , <i>tcdB+</i> , w/o deletions <i>tcdC</i> , <i>cdtB-</i>	New pulsotype 1174	0.38	1.5	1	4	1	<0.002
				MRN-15	106	<i>tpi+</i> , <i>tcdA+</i> , <i>tcdB+</i> , w/o deletions <i>tcdC</i> , <i>cdtB-</i>	NAP11 0499	0.5	2
MRN-54	002	<i>tpi+</i> , <i>tcdA+</i> , <i>tcdB+</i> , w/o deletions <i>tcdC</i> , <i>cdtB-</i>	New pulsotype NML-1234	0.125	0,5	4	1	0.75	<0.002
MRN-55	143	<i>tpi+</i> , <i>tcdA-</i> , <i>tcdB-</i> , w/o deletions <i>tcdC</i> , <i>cdtB-</i>	Non-Tox Strain						
MRN-56	133	<i>tpi+</i> , <i>tcdA-</i> , <i>tcdB-</i> , w/o deletions <i>tcdC</i> , <i>cdtB-</i>	Non-Tox Strain						

MRN-58	<i>tpi+</i> , <i>tcdA+</i> , <i>tcdB+</i> , w/o deletions <i>tcdC</i> , <i>cdtB-</i>	New pulsotype						
012		NML-1235	0.125	0.75	2	1	0,5	<0.002

Toxigenic profile – *tcdA* (TcdA gene), *tcdB* (TcdB gene), *cdtB* (gene for the binding domain of the binary toxin) e *tcdC* (negative regulator gene that controls the production of TcdA and TcdB). MICs – Minimum inhibitory concentrations; MET- metronidazole; VAN- vancomycin; CLI- clindamycin; LEV- levofloxacin; MXF- moxifloxacin; RIM- rifampicin; MRN- Medical Record Number. Breakpoints: levofloxacin ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$; clindamycin ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$; moxifloxacin ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$; rifampin ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$, metronidazole ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$ and vancomycin > 2 $\mu\text{g/ml}$.

The analysis of the PFGE profile by digestion with *SmaI* revealed new pulsotypes in three isolates (RT046, RT002, and RT012). In addition, RT106 exhibited NAP11-0499. The analysis of the identified number was standardized according to the database of the University of Costa Rica and NML-Canada (Table 1).

In terms of antimicrobial susceptibility, all strains were susceptible to metronidazole and vancomycin, commonly used for treating CDI. The children with CDI, including those six patients whose stool samples tested positive for *C. difficile*, were treated with metronidazole and evolved with diarrhea remission during the follow-up period. All strains were susceptible to the tested antimicrobials except two that showed levofloxacin resistance (MRN-1 and MRN-15), as shown in Table 1.

Regarding clinical manifestations, diarrhea in children with CDI persisted for an average of 11 days, ranging from 3 to 50 days. Most affected children experienced acute diarrhea, typically lasting up to 14 days. However, it's worth noting that three patients experienced persistent diarrhea lasting between 14 and 30 days, while two children had chronic diarrhea lasting more than 30 days. In addition to diarrhea, other associated symptoms were observed, including vomiting in 52.9% (9/17) of cases, fever in 41.1% (7/17), pain in 82.3% (14/17), and abdominal distension in 17.6% (3/17) of cases. Nausea was significantly

associated ($p=0.035$) with patients who tested positive for CDI compared to those with a negative test for *C. difficile* infection.

When evaluating risk factors for CDI, which include recent hospitalization (within the last 30 days), antibiotic or proton pump inhibitor usage, and the presence of comorbidities or chronic diseases, it was observed that 88.2% (15/17) of patients with positive samples had underlying conditions. Importantly, each of these 15 children presented one or more risk factors. Only two children with positivity to *C. difficile*, constituting 11.7% (2/17), exhibited no risk factors (Table 2). Hospitalization within the last 30 days was noted in 41.1% (7/17) of patients with positivity to *C. difficile*, with no significant difference compared to those with negative *C. difficile* test ($p=0.206$). Antibiotics had been previously prescribed to 47% (8/17) of children with CDI, and proton pump inhibitors had also been once used by 47% (8/17) of these children (Table 2).

Table 2 - Clinical correlations of patients with *C. difficile* isolation in a Tertiary Pediatric Hospital, Fortaleza, Ceará (2015 – 2017).

Characteristics	Patients					
	MRN-01	MRN-15	MRN-54	MRN-55	MRN-56	MRN-58
Ribotype	046	106	002	143	133	012
Sex	F	M	M	M	F	M
Age	2y5m	1y5m	1y1m	13y	4y	2y5m
Diagnostic	bile duct atresia/transplant	congenital megacolon	hemolytic uremic syndrome	inflammatory bowel disease	chronic kidney disease	chronic kidney disease
Risk factors						
Comorbidities	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Use of antibiotics	No	Yes	Yes	No	No	Yes
Use of PPI	No	Yes	Yes	No	Yes	No
Hospitalization in the last 30 days	No	Yes	No	No	Yes	Yes

Clinical condition						
Fever	No	Yes	Yes	No	No	No
Blood in the stool	Yes	No	No	No	Yes	No
Nausea/Vomit	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Abdominal pain	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes

F= female; M= male; PPI = proton pump inhibitors

While comorbidities emerged as the most prevalent risk factor, affecting 76.5% (13/17) of CDI patients, no statistical differences were found between patients with and without the infection ($p=0.758$). These comorbidities included inflammatory bowel disease (35.3%; 6/17), chronic kidney disease (23.5%; 4/17), neurologic disease (11.8%; 2/17), and hepatopathies (11.8%; 1/17), as shown in Table 2. However, it is crucial to emphasize that all six patients infected with *C. difficile*, from whom fecal isolates were obtained, had previously been diagnosed with a chronic disease.

Discussion

In recent years, the incidence of gastrointestinal diseases caused by *C. difficile* in children has been on the rise, along with its association with extended hospitalization periods, increased costs, and unfavorable outcomes. This indicates that the epidemiology of this disease is evolving in childhood.^{12,13,14,15,16,17,18,19}

The present study investigated the molecular epidemiology and antimicrobial resistance in *C. difficile* strains isolated from children and adolescents in a tertiary referral pediatric hospital in Fortaleza, Brazil, and the associated risk factors. As far as we know, no previous research has examined *C. difficile* infection among children in northeastern Brazil. Studies on *C. difficile*-associated diarrhea in Brazil have been limited. In the last two decades, only two pediatric research groups reported the presence of *C. difficile* infection in Brazilian children: a study carried out in Rio de Janeiro with hospitalized and non-hospitalized

patients²⁰ and a study conducted in São Paulo between June 2000 and July 2001.²¹ In these studies, *C. difficile* was isolated from 6.7% and 5.5% of diarrheal stool samples, respectively. In this current study, the frequency of *C. difficile* positivity stood notably much higher at 30.4% (17/56), with the rate of toxigenic *C. difficile* reaching 88.2%, detected by toxin A/B rapid immunoassay and PCR, accounting for 15 out of 17 cases.

Meanwhile, there has been a significant rise in the prevalence of CDI in the United States, especially among children aged 1 to 5 years, with rates reaching as high as 85%.²¹ Further epidemiological studies are needed to confirm whether pediatric CDI has increased in Brazil, but our data, compared with studies from Brazilian hospitals in the 2000s, point in that direction. This hypothesis aligns with studies by other research groups in different countries,

A recent study conducted in Kenya between 2015 and 2018 involving children under five years of age experiencing diarrhea revealed that *C. difficile* is more prevalent than rotavirus and *Cryptosporidium*, two of the primary causes of childhood diarrhea.²³

This difference between the Brazilian studies conducted in the 2000s and our study can be attributed to a combination of factors. During this time gap, changes in health conditions, hygiene practices, antibiotic use, emergence of new strains, and other factors that affect the prevalence of *C. difficile* and other intestinal pathogens may have occurred. Furthermore, in Brazil's case, it's crucial to consider the vast continental proportions of the country, which are geopolitically divided into five regions. For instance, Fortaleza is the capital of the state of Ceará, situated in the northeastern region, while Rio de Janeiro and São Paulo are in southeastern Brazil's wealthiest region. Each region should conduct epidemiological studies considering local nuances to generate relevant and region-specific data. This approach will enable the development of a more accurate understanding of the epidemiology of *Clostridioides difficile*-associated diarrhea within each region, thereby

facilitating the implementation of customized preventive measures and effective treatment strategies to mitigate the impact of this infection in the pediatric population. In this context, our study stands out as a significant contribution, as it provides insights into the local epidemiological landscape of CDI among children in northeastern Brazil for the first time.

We should also consider the age group differences among these Brazilian studies as a variable that may affect the results: Rio de Janeiro (3 months-7 years), São Paulo (0-5 years), and Fortaleza (18 months-18 years). In this study, we excluded children under 18 months old due to elevated asymptomatic carriage rates among infants and young children. This significantly complicates diagnosing *C. difficile*-associated disease in this group, leading to challenges in defining infection and determining the necessity of treatment.²³ However, we made exceptions for two infants under 18 months. One infant had Hirschsprung's disease, which is considered a potential risk factor for severe CDI. The other infant shared a ward with two children already diagnosed with CDI, increasing the likelihood of infection transmission. The literature highlights that *C. difficile* spores can persist in healthcare environments for extended periods and are primarily transmitted to patients through contact with contaminated surfaces or objects by healthcare staff.²⁴ In our study, both infants were infected with non-toxigenic *C. difficile* strains (ribotypes 106 and 002).

We also examined commonly reported CDI risk factors, which include hospitalization, previous antibiotics exposure, previous use of proton pump inhibitors (PPIs), and comorbidities. Overall, 88.2% (15/17) of the children infected with *C. difficile* were identified as having at least one of these risk factors. Comorbidity was the most prevalent risk factor 76.5% (13/17), followed by previous use of antibiotics 47% (8/17) and PPIs 47% (8/17). However, it's important to note that none of these risk factors were found to predispose to CDI in the present study.

Although the above-listed factors have been commonly described for CDI in adults, it has been argued that not all CDI risk factors act equally in pediatric and adult patients.^{25,26}

A case-control study to identify potential risk factors for CDI at a pediatric quaternary care hospital in the USA reported that recent antibiotic exposure and certain comorbid conditions (solid organ transplant, presence of a gastrostomy, or jejunostomy tube) were associated with CDI.²⁷ One of the toxigenic strains identified in the present study (ribotype 046 with a new pulsotype 1174) came from a child with a history of hospitalization, antibiotic administration, hepatic transplantation, and immunosuppressive medication therapy.

In addition to ribotype 046, we identified five more *C. difficile* ribotypes (106, 002, 143, 133, 012). Among these, three new pulsotypes were detected (1174, NML-1234, NML-1235) and NAP 11 – 0499.

The heterogeneity found in the PCR-ribotyping of *C. difficile* strains performed in the present study does not suggest an outbreak. In a study conducted in eight US states to examine the association between strain type and disease outcomes in adults, NAP11 was previously identified as the third most common strain type (9.1%).²⁷ A study conducted in Chicago, USA, with pediatric patients diagnosed with CDI reported the evolution and transmission of a multi-drug resistant DH/NAP11/106 *C. difficile* clone.²⁸ In accordance, NAP11/RT106, isolated in our study, was resistant to levofloxacin. Fluoroquinolone resistance in a BI/NAP1/027 strain has been implicated as a significant contributor to its pathogenesis and global spread.^{29,30} All *C. difficile* strains isolated in the present study were sensitive to metronidazole and vancomycin, the most used antibiotics to treat CDI in Brazil. Therefore, all children responded well to metronidazole treatment.

Our study obtained four isolates from samples that initially tested negative for toxins. Based on a careful evaluation of the clinical features and associated risk factors, we decided

to treat these four patients with metronidazole, as there were strong indications that they might be infected with *C. difficile*. Subsequently, two toxigenic strains were isolated from this group, emphasizing the need to revise existing clinical protocols for diagnosing and treating CDI, especially in the pediatric population. These adjustments ensure that all patients receive the necessary diagnosis and treatment, ultimately benefiting individual and public health.

One limitation of this study is its relatively small sample size. This was a single-center study conducted at a tertiary pediatric hospital in Brazil, which limited the number of patients included in the analysis. It is essential to conduct more extensive studies in various healthcare settings to obtain a more comprehensive understanding of the epidemiology of *C. difficile*-associated diarrhea in childhood in Brazil over time.

Conclusions

Our research sheds light on the evolving epidemiology of *Clostridioides difficile*-associated diarrhea (CDI) in children in northeastern Brazil, revealing a substantial CDI frequency of 30.4%, with toxigenic strains detected in 76.4% of cases, highlighting a higher prevalence compared to earlier Brazilian studies. While our study provides valuable insights, it is essential to acknowledge its limitations, notably the small sample size and restriction to a single pediatric hospital. These constraints underline the necessity for more extensive, multicenter studies across diverse healthcare settings in Brazil.

Abbreviations

C. difficile: *Clostridioides difficile*; CDI: *C. difficile* infection; PaLoc: pathogenicity locus; PPI: proton pump inhibitor; PCR: polymerase chain reaction; MIC: minimum inhibitory concentration; EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Declarations**Ethics approval and consent to participate.**

This study received approval from the Research Ethics Committee (REC) of Albert Sabin Children's Hospital (protocol number 861363). Written informed consent was obtained from all patients. The REC's primary responsibility is safeguarding the dignity, rights, safety, and well-being of individuals participating in biomedical research. It also upholds public accountability by publishing its decisions. All institutions involved in this research provided their consent to participate.

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and materials

The data generated and analyzed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Competing interests

The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

Funding

This work was supported by PRONEX/FUNCAP/CNPq of Brazil through grant PR2-0101-00060.01.00/15.

Authors' contributions

All authors contributed to the study conception, design, and experiment. GACB and RFCL contributed equally to this work. HBRB, CLC, EOF, and DMP prepared material and collected data. HBRB, GACB, RFCL, and CQG analyzed the data; HBRB, CLC, RFCL, EOF, and GACB wrote the first draft of the manuscript. CLC, RFCL, and GACB did the final review. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

We are grateful to the Nucleus of Study in Microscopy and Image Processing (NEMPI) from Morphology Department of the Federal University of Ceará (UFC) for all histology and digital imaging services.

References

1. Shirley DA, Tornel W, Warren CA, Moonah S. Clostridioides difficile Infection in Children: Recent Updates on Epidemiology, Diagnosis, Therapy. *Pediatrics* (2023);152(3).

URLs:<https://publications.aap.org/pediatrics/article/152/3/e2023062307/193288/Clostridioides-difficile-Infection-in-Children>

2. Perumalsamy S, Riley TV. Molecular epidemiology of Clostridioides difficile infections in children. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society* (2021);10:S34-40

URLs: https://academic.oup.com/jpids/article/10/Supplement_3/S34/6430233

3. Davidovics ZH, Michail S, Nicholson MR, Kociolek LK, Pai N, Hansen R, Schwerd T, Maspons A, Shamir R, Szajewska H, Thapar N. FMT Special Interest Group of the North American Society of Pediatric Gastroenterology Hepatology, Nutrition, the European Society for Pediatric Gastroenterology Hepatology, Nutrition. Fecal microbiota transplantation for recurrent Clostridium difficile infection and other conditions in children: a joint position paper from the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition and the European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* (2019);68(1):130-43.

URLs:https://journals.lww.com/jpgn/fulltext/2019/01000/fecal_microbiota_transplantation_for_recurrent.25.aspx

4. Mehrotra P, Jang J, Gidengil C, Sandora TJ. Attributable cost of Clostridium difficile infection in pediatric patients. *infection control & hospital epidemiology* (2017);38(12):1472-7.

URLs: <https://www.cambridge.org/core/journals/infection-control-and-hospital-epidemiology/article/abs/attributable-cost-of-clostridium-difficile-infection-in-pediatric-patients/86D73BB39E7F3DCBDEDB48468287C351>

5. Maccioni A, Cerda J, Terrazas C, Abarca K. Clinic and epidemiologic description of Clostridium difficile infection in a pediatric population. *Revista Chilena de Infectologia: Organo Oficial de la Sociedad Chilena de Infectologia* (2015);32(5):523-9.

URLs: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182015000600005&lng=en&nrm=iso&tlng=en

6. Duleba K, Pawłowska M, Wietlicka-Piszcz M. Clostridium difficile infection in children hospitalized due to diarrhea. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* (2014); 33:201-209.

URLs: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10096-013-1946-1>

7. Khanna S, Baddour LM, Huskins WC, Kammer PP, Faubion WA, Zinsmeister AR, Harmsen WS, Pardi DS. The epidemiology of Clostridium difficile infection in children: a population-based study. *Clinical infectious diseases* (2013);56(10):1401-6.

URLs: <https://academic.oup.com/cid/article/56/10/1401/406090?login=false>

8. Murray R, Boyd D, Levett PN, Mulvey MR, Alfa MJ. Truncation in the tcdC region of the Clostridium difficile PathLoc of clinical isolates does not predict increased biological activity of Toxin B or Toxin A. *BMC infectious diseases* (2009);9(1):1-1.

URLs: <https://academic.oup.com/cid/article/43/7/807/369121?login=false>

9. Bidet P, Barbut F, Lalande V, Burghoffer B, Petit JC. Development of a new PCR-ribotyping method for Clostridium difficile based on ribosomal RNA gene sequencing. *FEMS microbiology letters* (1999);175(2):261-6.

URLs: <https://academic.oup.com/femsle/article/175/2/261/470918?login=false>

10. Letournel-Glomaud C, Houssaye S, Milhaiha L, Ghnassia JC. E-test antibiotics susceptibility of strict anaerobic bacteria. *Anaerobe* (2003);9(6):281-4.

URLs:<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1075996403000672?via%3Dihub>

11. O'Connor JR, Galang MA, Sambol SP, Hecht DW, Vedantam G, Gerding DN, Johnson S. Rifampin and rifaximin resistance in clinical isolates of *Clostridium difficile*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* (2008);52(8):2813-7.

URLs:<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1075996403000672?via%3Dihub>

12. Klein EJ, Boster DR, Stapp JR, Wells JG, Qin X, Clausen CR, Swerdlow DL, Braden CR, Tarr PI. Diarrhea etiology in a children's hospital emergency department: a prospective cohort study. *Clinical Infectious Diseases* (2006);43(7):807-13.

URLs: <https://academic.oup.com/cid/article/43/7/807/369121?login=false>

13. Benson L, Song X, Campos J, Singh N. Changing epidemiology of *Clostridium difficile*-associated disease in children. *Infection Control & Hospital Epidemiology* (2007);28(11):1233-5.

URLs: <https://www.cambridge.org/core/journals/infection-control-and-hospital-epidemiology/article/abs/changing-epidemiology-of-clostridium-difficile-associated-disease-in-children/21A2E377A726F6258BD8AC28BF5AB6FA>

14. Kim J, Smathers SA, Prasad P, Leckerman KH, Coffin S, Zaoutis T. Epidemiological features of *Clostridium difficile*-associated disease among inpatients at children's hospitals in the United States, 2001–2006. *Pediatrics* (2008);122(6):1266-70.

URLs:<https://publications.aap.org/pediatrics/article-abstract/122/6/1266/68793/Epidemiological-Features-of-Clostridium-difficile?redirectedFrom=fulltext>

15. Zilberberg MD, Shorr AF, Kollef MH. Increase in *Clostridium difficile*-related hospitalizations among infants in the United States, 2000–2005. *The Pediatric infectious disease journal* (2008);27(12):1111-3.

URLs:https://journals.lww.com/pidj/fulltext/2008/12000/increase_in_clostridium_difficile_related.15.aspx

16. Zilberberg MD, Tillotson GS, McDonald LC. *Clostridium difficile* infections among hospitalized children, United States, 1997–2006. *Emerging infectious diseases* (2010);16(4):604.

URLs: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/16/4/09-0680_article

17. Khanna S, Baddour LM, Huskins WC, Kammer PP, Faubion WA, Zinsmeister AR, Harmsen WS, Pardi DS. The epidemiology of *Clostridium difficile* infection in children: a population-based study. *Clinical infectious diseases* (2013);56(10):1401-6.

URLs: <https://academic.oup.com/cid/article/56/10/1401/406090?login=false>

18. Borali E, De Giacomo C. *Clostridium difficile* infection in children: a review. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* (2016);63(6):e130-40.

URLs: https://journals.lww.com/jpgn/fulltext/2016/12000/clostridium_difficile_infection_in_children_a.25.aspx

19. Wendt JM, Cohen JA, Mu Y, Dumyati GK, Dunn JR, Holzbauer SM, Winston LG, Johnston HL, Meek JI, Farley MM, Wilson LE. *Clostridium difficile* infection among children across diverse US geographic locations. *Pediatrics* (2014);133(4):651-8.

URLs: <https://publications.aap.org/pediatrics/article-abstract/133/4/651/32776/Clostridium-difficile-Infection-Among-Children?redirectedFrom=fulltext>

20. Pinto LJ, Alcides AP, Ferreira EO, Avelar KE, Sabra A, Domingues RM, Ferreira MC. Incidence and importance of *Clostridium difficile* in paediatric diarrhoea in Brazil. *Journal of medical microbiology*. (2003);52(12):1095-9.

URLs: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.05308-0>

21. Ferreira CE, Nakano V, Durigon EL, Avila-Campos MJ. Prevalence of *Clostridium* spp. and *Clostridium difficile* in children with acute diarrhea in Sao Paulo city, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* (2003);98:451-4.

URLs: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/JBN6XzjmyVkmFhdNp89gtSQ/?lang=en>

22. Khalaf N, Crews J, DuPont HL, Koo HL. *Clostridium difficile*: an emerging pathogen in children. *Discovery medicine* (2012);14(75):105.

URLs: <https://www.discoverymedicine.com/Natalia-Khalaf/2012/08/24/clostridium-difficile-an-emerging-pathogen-in-children/>

23. Plants-Paris K, Bishoff D, Oyaro MO, Mwinyi B, Chappell C, Kituyi A, Nyangao J, Mbatha D, Darkoh C. Prevalence of *Clostridium difficile* infections among Kenyan children with diarrhea. *International Journal of Infectious Diseases*. (2019);81:66-72.

URLs: [https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712\(19\)30035-9/fulltext](https://www.ijidonline.com/article/S1201-9712(19)30035-9/fulltext)

24. Miller AC, Polgreen LA, Cavanaugh JE, Polgreen PM. Hospital Clostridium difficile infection (CDI) incidence as a risk factor for hospital-associated CDI. American journal of infection control (2016);44(7):825-9.

URLs: [https://www.ajicjournal.org/article/S0196-6553\(16\)00044-4/fulltext](https://www.ajicjournal.org/article/S0196-6553(16)00044-4/fulltext)

25. Migriauli I, Meunargia V, Chkhaidze I, Sabakhtarishvili G, Gujabidze K, Butashvili M, Kamkamidze G. Factors affecting development of Clostridium difficile infection in hospitalized pediatric patients in the country Georgia. BMC Research Notes (2018);11(1):1-5.

URLs: <https://bmcresearchnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13104-018-3517-0>

26. McFarland LV, Ozen M, Dinleyici EC, Goh S. Comparison of pediatric and adult antibiotic-associated diarrhea and Clostridium difficile infections. World journal of gastroenterology (2016);22(11):3078.

URLs: <https://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v22/i11/3078.htm>

27. Sandora TJ, Fung M, Flaherty K, Helsing L, Scanlon P, Potter-Bynoe G, Gidengil CA, Lee GM. Epidemiology and risk factors for Clostridium difficile infection in children. The Pediatric infectious disease journal (2011);30(7):580-4.

URLs: https://journals.lww.com/pidj/abstract/2011/07000/epidemiology_and_risk_factors_for_clostridium.10.aspx

28. Kociulek LK, Ozer EA, Gerding DN, Hecht DW, Patel SJ, Hauser AR. Whole-genome analysis reveals the evolution and transmission of an MDR DH/NAP11/106 Clostridium difficile clone in a paediatric hospital. Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2018);73(5):1222-9.

URLs: <https://academic.oup.com/jac/article/73/5/1222/4803217?login=false>

29. See I, Mu Y, Cohen J, Beldavs ZG, Winston LG, Dumyati G, Holzbauer S, Dunn J, Farley MM, Lyons C, Johnston H. NAP1 strain type predicts outcomes from Clostridium difficile infection. Clinical infectious diseases. (2014);58(10):1394-400.

URLs: <https://academic.oup.com/cid/article/58/10/1394/2895896?login=false>

30. He M, Miyajima F, Roberts P, Ellison L, Pickard DJ, Martin MJ, Connor TR, Harris SR, Fairley D, Bamford KB, D'Arc S. Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated *Clostridium difficile*. *Nature genetics* (2013);45(1):109-13.

URLs: <https://www.nature.com/articles/ng.2478>

