



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**ARKILA PINHEIRO RODRIGUES DE SOUSA**

**“EFEITO DO BUTIRATO NA RESPOSTA DE CÉLULAS GLIAIS ENTÉRICAS ÀS  
TOXINAS DO *Clostridioides difficile*”.**

**FORTALEZA**

**2024**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**ARKILA PINHEIRO RODRIGUES DE SOUSA**

**“EFEITO DO BUTIRATO NA RESPOSTA  
DE CÉLULAS GLIAIS ENTÉRICAS ÀS TOXINAS DO *Clostridioides difficile*”.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dra Gerly Anne de Castro Brito.

Co-orientadora: Dra Deiziane Viana da Silva Costa

**FORTALEZA**

**2024**

ARKILA PINHEIRO RODRIGUES DE SOUSA

**“EFEITO DO BUTIRATO NA RESPOSTA  
DE CÉLULAS GLIAIS ENTÉRICAS ÀS TOXINAS DO *Clostridioides difficile*”.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra Gerly Anne de Castro Brito.  
Co-orientadora: Dra Deiziane Viana da Silva Costa

APROVADA EM \_\_/\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito**  
**Universidade Federal do Ceará-UFC**

---

**Profa. Dra. Eliane de Oliveira Ferreira**  
**Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ**

---

**Dr. Antonio Vinicius Alves Silva**  
*University of virginia/ EUA*

**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)

---

S696e Sousa, Arkila Pinheiro Rodrigues de.  
Efeito do butirato na resposta de células gliais entéricas às toxinas do *Clostridioides difficile* / Arkila Pinheiro Rodrigues de Sousa. – 2024.  
78 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2024.

Orientação: Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito.

Coorientação: Profa. Dra. Deiziane Viana da Silva Costa.

1. Sistema Nervoso Entérico. 2. *Clostridioides difficile*. 3. butirato. I. Título.

CDD 615.1

---



Á Deus,  
meu amigo de todos os momentos.  
Nossa Senhora de Lourdes,  
que me ensinou a encontrar a paz da  
alma.

Dedico também este trabalho a minha  
família, minha maior rede de apoio e  
amor genuíno.

Á todos os meus pacientes  
acompanhados na Unidade de Terapia  
Intensiva em um hospital do interior da  
região Norte do Ceará, minha maior  
motivação diária nos estudos e  
aprendizado de amor ao próximo.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo, nunca deixar faltar sabedoria e força durante essa jornada, Deus é um amigo verdadeiro e fiel em todos os momentos, principalmente quando achamos que não existe solução. Ele é o Deus do impossível.

Agradeço a minha família, minha mãe por ensinar arduamente que não deve desistir nunca, ser persistente e acreditar nos meus sonhos. Gratidão ao meu pai por toda resiliência, ter paciência, e aos meus irmãos que sempre me ensinaram sobre não ter medo e se tiver medo enfrentar mesmo assim. Aos meus sobrinhos por me ensinar sempre o quanto o sorriso de uma criança pode melhorar seu dia.

Aos meus amigos que foram fundamentais nessa jornada: Rayanne, Vanderlanny, Eveltania, Jene, Bianca, anjos enviados por Deus que sempre me escutaram e acolheram em todos os momentos. Ao Carlos Eduardo e Iderlan, amigos que foram abrigo em todos os sentidos. Vocês foram essenciais. A Fernanda Campos, deixo expresso minha gratidão, minha amiga desde o momento da seleção para ingressar no mestrado, aprendi muito com ela e agradeço por toda sua ajuda nessa jornada.

Aos meus amigos queridos do Hospital Regional Norte. Em especial a equipe multiprofissional (médicos, enfermeiros, fisioterapeutas, nutricionistas, fonoaudiólogos, técnicos em enfermagem) das Unidades de Terapia Intensiva Adulto e pediátrica sempre se mostraram interessados quando eu falava a respeito do *C. difficile*. A Equipe do Serviço de Controle de infecção (SCIH) onde juntos validamos um protocolo para o manejo dos nossos pacientes com quadro sugestivo de infecção por *C. difficile*, com certeza muitos pacientes foram beneficiados, fiquei imensamente feliz. E aos meus amigos farmacêutico(a)s: Johnatã, Carol, Fatinha, Mábila, Carlos Eduardo, Dyulle, obrigada pelo apoio e companheirismo do dia a dia e por todos os cafés que tomamos juntos, sinto muita falta.

Minha amiga Andréa Loureiro, que com muita sabedoria e paciência esteve ao meu lado no laboratório ensinando, abrindo mão dos seus sábados para me ajudar, obrigada por me ensinar sobre pesquisa e muita mais sobre a vida, valores, amizade, empatia, oro e peço a Deus que Ele te conceda muitas bênçãos, você merece muito. Em breve iremos comemorar a finalização da sua etapa do doutorado.

A minha orientadora, a professora Dra. Gerly Anne de Castro Brito que me acolheu e aceitou com muita generosidade me orientar, ela é dona de um coração imenso e acolhedor. Tenho grande admiração pela senhora, por ser um grande exemplo de pessoa e profissional, considerada uma das maiores referências quando o assunto é *C. difficile*.

A minha co-orientadora, a professora Dra. Deiziane Costa por toda sua atenção e paciência em ensinar, lapidar, acompanhando todo meu processo de evolução. Posso afirmar que cresci muito mediante sua mentoria, levarei comigo todos os ensinamentos desse período. Detentora de muitos conhecimentos, ela me ensinou que tudo é possível só temos que nos dedicar, dar o nosso máximo, ser persistente acima de tudo e com certeza dar o melhor de si nos traz resultados incríveis. Agradeço muito a ela pois apesar de toda distância geográfica, sempre esteve muito presente e disponível.

A minha banca de qualificação: Dra. Gislane de Almeida Santos, Dr. Francisco Advane de Paulo Rodrigues e Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão, banca de defesa.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa.

*“É justo que muito o que muito vale”*

**Santa Teresa D’avila**

## EFEITO DO BUTIRATO NA RESPOSTA DE CÉLULAS GLIAIS ENTÉRICAS ÀS TOXINAS DO *Clostridioides difficile*

O *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) é o principal agente causador de diarreia nosocomial em todo o mundo. A célula glial entérica (CGE), um dos principais componentes do sistema nervoso entérico (SNE), é suscetível às toxinas A (TcdA) e B (TcdB) do *C. difficile*. TcdA e TcdB são os principais fatores de virulência relacionados ao dano intestinal e diarreia causados por esse patógeno em animais. A microbiota desempenha um papel importante na suscetibilidade à infecção por *C. difficile* (ICD). Um dos produtos da microbiota é o butirato, que demonstrou ser protetor contra a ICD. Neste estudo, avaliamos se o butirato modula a resposta da CGE às toxinas do *C. difficile*. *In vitro*, linhagem de CGE foi incubada com TcdA ou TcdB isoladamente ou em combinação com butirato de sódio, que foi adicionado uma hora antes do desafio com as toxinas. Após 18h de incubação, a CGE foi coletada para análise de morte celular (usando ensaios de atividade de anexina RealTime-Glo e caspase 3/7) e expressão gênica de *bcl2* (um fator antiapoptótico), *S100B* e *IL-6* pelo ensaio de PCR em tempo real. As toxinas do *C. difficile* (TcdA e TcdB) induziram a morte de CGE, conforme observado pelo aumento da ligação de fosfatidilserina e anexina V, promoveu aumento da atividade de caspase 3/7 e diminuiu a expressão gênica de *bcl2*, bem como aumentou a expressão gênica de mediadores pró-inflamatórios (*S100B* e *IL-6*) em CGEs comparado ao grupo controle. Em alta concentração, o butirato (200  $\mu$ M) potencializou os efeitos das toxinas do *C. difficile* na promoção da morte da CGE (TcdA:  $P= 0,0001$ , TcdB:  $P= 0,01$ ) e atividade de caspase 3 /7 ( $P<0,0001$ ). Enquanto baixa concentração de butirato (0,2  $\mu$ M) diminuiu a morte da CGE (TcdA:  $p = 0,0004$ , TcdB:  $p= 0,02$ ) e atividade de caspase 3/7 ( $P<0,001$ ) induzidas pelas toxinas do *C. difficile*. Além disso, a incubação de CGEs com baixa concentração de butirato (0,2  $\mu$ M) na ausência de TcdA ou TcdB resultou em aumento da expressão de *bcl2* em comparação com as células controle ( $p<0,0001$ ). Em baixas concentrações, butirato (0,2  $\mu$ M) diminuiu parcialmente os efeitos da TcdB na expressão gênica de *bcl2* ( $P<0,02$ ) e *IL-6* ( $P< 0,0002$ ) em CGEs. Além disso, a baixa concentração de butirato (0,2  $\mu$ M) também diminuiu a regulação positiva de *S100B* induzida por TcdA ( $P= 0,04$ ). Nossos achados sugerem que baixas e altas concentrações de butirato podem afetar diferencialmente a suscetibilidade da glia entérica às toxinas do *C. difficile*, sendo a baixa concentração protetora contra os efeitos deletérios das toxinas do *C. difficile*, diminuindo a morte da CGE por reduzir a atividade de caspase 3/7 e aumentar a expressão do mediador antiapoptótico *bcl2*, além de reduzir a resposta pró-inflamatória dessas células. Dessa forma, essas descobertas ajudam a elucidar, em parte, o mecanismo pelo qual os produtos derivados da microbiota podem modular a resposta da CGE às toxinas do *C. difficile*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Sistema Nervoso Entérico, *Clostridioides difficile*, Butirato.

## EFFECT OF BUTYRATE ON ENTERIC GLIAL CELLS RESPONSE TO *Clostridioides difficile* TOXINS

*C. difficile* is the main cause of nosocomial diarrhea worldwide. Enteric glia, a cellular component of the enteric nervous system, are susceptible to *C. difficile* toxins A (TcdA) and B (TcdB), which are the main virulence factors related to the disease. Microbiota play an important role on susceptibility to *C. difficile* infection (CDI). One of the products of the microbiota is butyrate, which has been shown to be protective against CDI. In this study, we evaluated whether butyrate could modulate the response of enteric glia to *C. difficile* toxins. In vitro, rat enteric glia line was incubated with TcdA or TcdB alone or in combination with sodium butyrate 1h prior to toxins challenge. After 18h incubation, enteric glia was collected to analyze cell death (by using a RealTime-Glo annexin and caspase 3/7 activity assays) and levels and expression of *bcl2* (an antiapoptotic factor), *S100B* and *IL-6* by qPCR. *C. difficile* toxins (TcdA and TcdB) induced enteric glia death followed by increased levels of caspase 3/7 and downregulation of *bcl2*, as well as upregulated the expression of pro-inflammatory mediators (*S100B* and *IL-6*). In high concentration, butyrate (200  $\mu$ M) potentialized the effects of *C. difficile* toxins in promoting enteric glia death, as shown by increased levels of phosphatidylserine-annexin V binding (TcdA:  $p = 0.0001$ , TcdB:  $p = 0.01$ ) and caspase 3/7 activity ( $p < 0.0001$ ). Whereas low concentration of butyrate (0.2  $\mu$ M) decreased enteric glia death (TcdA:  $p = 0.0004$ , TcdB:  $p = 0.02$ ) and their caspase 3/7 activity ( $p < 0.001$ ) induced by *C. difficile* toxins. In addition, low concentration of butyrate (0.2  $\mu$ M) by itself upregulated *bcl2* expression compared to control cells ( $p < 0.0001$ ), as well as decreased the downregulation of *bcl2* ( $p < 0.02$ ) and upregulation of *IL-6* ( $p < 0.0002$ ) induced by TcdB. Further, low concentration of butyrate (0.2  $\mu$ M) also diminished *S100B* upregulation induced by TcdA ( $p = 0.04$ ). Our findings suggest that low and high concentration of butyrate can differentially affect the susceptibility of enteric glia to *C. difficile* toxins, being the low concentration protective against the deleterious effects of *C. difficile* toxins, decreasing the enteric glia death by decreasing caspase 3/7 activity and increasing the antiapoptotic mediator (*bcl2*), as well as reducing the proinflammatory response of these cells. Thus, these findings, in part, brought new perspectives on how microbiota-derived products can modulate the response of enteric glia to the *C. difficile* toxins.

**Keywords:** Enteric Nervous System, *Clostridioides difficile*, Butyrate.

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - *Primers* utilizados no qPCR

35

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Desenvolvimento do Sistema Nervoso Entérico	12
Figura 2 – Representação das camadas intestinais e localização das células gliais entéricas.	14
Figura 3 - <i>Clostridioides difficile</i>	15
Figura 4 - Estágios de infecção por <i>Clostridium difficile</i> após transmissão por via fecal-oral.	17
Figura 5 - Mecanismo de ação das TcdA e TcdB	19
Figura 6 - Estruturas de Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCCs).	23
Figura 7 - O butirato protege o epitélio intestinal dos danos causados pelo <i>C. difficile</i> .	25
Figura 8 - Ensaio de viabilidade celular	32
Figura 9 - Ensaio de ligação fosfatidilserina-anexina V	33
Figura 10 - Ensaio da atividade de Caspase 3/7	34
Figura 11 - Ensaio qPCR	35
Figura 12 - Efeito do butirato na viabilidade de CGEs <i>in vitro</i> .	37
Figura 13 - O efeito do butirato na ligação de fosfatidilserina com anexina V em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB <i>in vitro</i> .	39
Figura 14 - Efeito do butirato na atividade da caspase 3/7 induzidas por toxinas de <i>C. difficile</i> em CGEs	40
Figura 15 - Efeito do butirato na atividade da expressão gênica de <i>Bcl-2</i> em CGEs expostas às toxinas do <i>C. difficile</i>	42
Figura 16 - Efeitos do butirato na expressão gênica de <i>IL-6</i> induzidas por toxinas do <i>C. difficile</i> em CGEs.	43
Figura 17 - Efeitos do butirato na expressão gênica de <i>S100B</i> induzidas por toxinas do <i>C. difficile</i> em CGEs.	44



## LISTA DE UNIDADES, ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus centígrados
μL	Microlitro
μg	Micrograma
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
mL	mililitro
mM	miliMolar
ng/mL	nano gramas por cada mili litro
nm	nano mol
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
ANOVA	Análise de variância
ATP	adenosina-tri-fosfato
BCL-2	Linfoma de células B2
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridioides difficile</i>
Calr+	Células calretinina
CCP	Caldo de carne picada
CDT	Terceira toxina de <i>C. difficile</i>
CDTa	Componente enzimático
CDTb	Componente de ligação
CGE	Célula glial entérica
ChaT+	Colina acetiltransferase
CK	Citocinas TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$ CK
CN	Crista neural
CROPS	domínio de oligopeptídeos repetitivos combinados
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono

DAP	Domínio de autoprocessamento
DGT	Domínio glicosiltransferase
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELISA	Ensaio imunoenzimático
ENCDCs	Células derivadas da crista neural entérica
EPM	Erro padrão da média
EUA	Estados Unidos da América
FFAR2	Receptor de ácidos graxos livres 2
FFAR3	receptor de ácidos graxos livres 3
GAPDH	Enzima glicolítica gliceraldeído-3- fosfato desidrogenase
GDNF	Fator neurotrófico derivado das células gliais
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
GMCSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos
HIF-1F	Fator induzível por hipóxia HIF-1
ICD	Infecção por <i>Clostridioides difficile</i>
IL-6	Interleucina 6
InsP6	Inositol hexaquisfosfato
P2X7R	Receptores P2X7
PANX1	Canais de pannexina-1
PARPPoli	Poli adenosina difosfato-ribose polimerase PARP
qRT-PCR	Cadeia da Polimerase
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di- fenil brometo de tetrazolina)
P2X7R	receptores P2X7
PANX1	Canais de pannexina-1
PARP	Poli adenosina difosfato-ribose polimerase

qRT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
Rac1	Glicosilação de Rho-GTPase
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rpm	rotações por minuto
S100B	proteína B de ligação ao cálcio S100
SNC	Sistema Nervoso Central
SNE	Sistema nervoso entérico
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SNPA	Sistema nervoso periférico autônomo
TcdA	Toxina A de <i>C. difficile</i> .
TcdB	Toxina B de <i>C. difficile</i> .
UFC	Unidades formadoras de colônia
URL	Unidade de luminescência relativa

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Sistema Nervoso Entérico	11
1.2. Célula glial entérica (CGE)	13
1.3. <i>C. difficile</i> : Considerações gerais	15
1.4. Toxinas do <i>C. difficile</i> (A e B)	18
1.5. Efeitos deletérios das toxinas do <i>C. difficile</i> nas CGEs	20
1.6. Ácidos Graxos de Cadeia Curta e sua importância para o trato gastrointestinal	22
2. JUSTIFICATIVA	27
3. OBJETIVOS	29
3.1. Objetivos Geral	29
3.2. Objetivos específicos	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1. Fármacos, reagentes, materiais e soluções utilizados no estudo	30
4.2. Experimentos <i>in vitro</i>	30
4.2.1. Cultura de CGEs	30
4.2.2. Administração de toxinas e butirato em CGEs	30
4.2.3. Parâmetros avaliados no estudo <i>in vitro</i>	31
4.2.3.1. Ensaio de viabilidade celular	31
4.2.3.2. Ensaio de ligação fosfatidilserina-anexina V	32
4.2.3.3. Avaliação da atividade de caspase 3/7	33
4.2.3.4. Ensaio qPCR	34

4.3. Análise estatística	36
5. RESULTADOS	37
5.1. Viabilidade de CGEs expostas ao butirato <i>in vitro</i>	37
5.2. Efeito do butirato na ligação da fosfatidilserina com anexina V em CGEs desafiadas pelas TcdA e TcdB <i>in vitro</i>	38
5.3. Efeito do butirato na atividade de caspase 3/7 induzidas por TcdA e TcdB <i>in vitro</i>	40
5.4. Efeito do butirato na expressão de <i>Bcl-2</i> em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB <i>in vitro</i>	41
5.5. Efeito do butirato na expressão de <i>IL-6</i> e <i>S100B</i> em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB <i>in vitro</i>	43
6. DISCUSSÃO	45
7. CONCLUSÃO	50
8. REFERÊNCIAS	51
APÊNDICE	63
ANEXOS	64

## **1. INTRODUÇÃO**

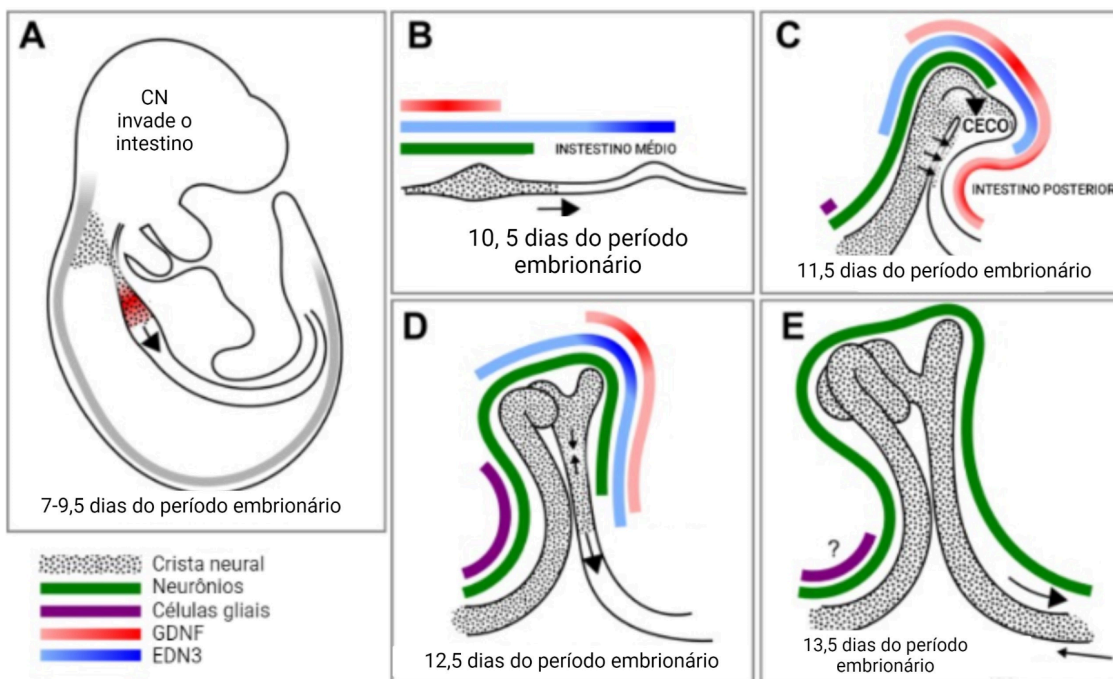
### **1.1. Sistema Nervoso Entérico**

No século XIX, foi explorada a existência dos neurônios entéricos e durante muito tempo o Sistema nervoso entérico (SNE) foi considerado como parte da porção pós-ganglionar. Por meio dos estudos do Professor John Newport Langley, fisiologista/histologista inglês e membro da London Royal Society, foi determinada a divisão desses sistemas. O sistema nervoso periférico autônomo (SNPA) é subdividido em: Simpático, Parassimpático e Entérico de acordo com a sua anatomia e fisiologia. O SNE constitui a maior parte do Sistema Nervoso Periférico (SNP), contando com aproximadamente 200 a 600 milhões de neurônios. Os pesquisadores Bayliss e Starling, realizaram a descoberta da atividade funcional do SNE (BRICKER et al., 2003; ORIÁ; BRITO, 2016).

O SNE é encontrado ao longo de todo trato gastrointestinal e se estende do esôfago ao reto, além de estar presente no pâncreas e na vesícula biliar (ORIÁ; BRITO, 2016; PAWOLSKI; SCHMIDT, 2020). Este sistema se comunica com o Sistema Nervoso Central (SNC) via vagal. A função do SNE é regulada por meio da inervação do SNC, localizado anatomicamente nas posições toracolombar e lombossacral. Apesar do SNE apresentar comunicação com SNC, o controle das funções do trato gastrointestinal pode ocorrer de forma independente, o denominado reflexo peristáltico intestinal (FLEMING et al., 2020; FURNESS, 2012).

O SNE (figura 1) apresenta importantes funções para o trato gastrointestinal, dentre elas está a regulação dos movimentos peristálticos, o controle de secreções intestinais e gástricas, a regulação da absorção dos nutrientes, a modulação do sistema imunológico e endócrino associado ao intestino (COSTA; BROOKES; HENNIG, 2000; LAKE; HEUCKEROTH, 2013).

Figura 1 - Desenvolvimento do Sistema Nervoso Entérico



Fonte: Lake e Heuckeroth (2013). As células derivadas da crista neural entérica - ENCDCs: dão início a formação do trato gastrointestinal. Durante o fechamento do tubo neural CN (pretas) localizadas na região vagal as células migram na corrente ventral para região adjacente ao intestino anterior, que expressa o fator neurotrófico derivado das células gliais (GDNF). B-E: Após essas células derivadas da crista neural entérica começarem a invadir o intestino anterior, elas migram rostrocaudal (parte frontal), proliferam e se diferenciam primeiro em neurônios (verde) e depois em glia (roxo). O intestino se alonga e muda de forma de uma linha reta (B) para um única curva com intestino médio posterior, bem justapostos (C), em sequência o apêndice cecal cresce e todo intestino se alonga ainda mais (D e E). C: Nos dias embrionários 11 e 12, as células derivadas da crista neural entérica invadem o colón atravessando o mesentério e transitam pelo ceco. D: O ceco e parte transmesentérica se fundem para formar o SNE no cólon rostral. E: A parte transmesentérica segue para o cólon terminal à medida que as células da parte sacral menor ECNDC entram no intestino e migram para a cauda. O desenvolvimento humano do SNE, prossegue através de um processo semelhante. GDNF: são secretados pela glia entérica, auxilia na proliferação

O GDNF (fator neurotrófico derivado de células gliais) é essencial no desenvolvimento do SNE, cumprindo a importante função de proliferação e diferenciação das células entéricas, onde o co-receptor RET é o responsável pela via de sinalização desse componente. A sinalização de GDNF ocorre por meio do RET e o receptor- $\alpha$  da família GDNF (GFR $\alpha$ ), promovendo o recrutamento de células progenitoras entéricas derivados da crista neural para o intestino até o ceco (RAO; GERSHON, 2018).

As células da glia entérica (CGEs) são um importante componente do SNE, contribuindo na manutenção da homeostase intestinal. Elas se encontram em maior quantidade que neurônios no SNE, sendo essencial para as funções dos mesmos (LIU; YANG, 2022).

## 1.2. Célula glial entérica (CGE)

No final do século XIX, as CGEs foram descobertas por Dogiel. As CGEs se caracterizam por apresentar semelhanças aos astrócitos do SNC. Até recentemente, acreditava-se que sua função principal era servir de suporte estrutural para os neurônios entéricos. As CGEs, são a maior população formadora do SNE, exercendo atividade mecânica na sustentação dos neurônios; explicando assim a origem do nome grego glia, que significa “cola”, termo aplicado pelo patologista alemão Rudolf Virchow. Recentemente, foi elucidado que essas células têm diversas funções importantes na manutenção e sobrevivência neuronal entérica. Danos à glia entérica pode provocar processos neurodegenerativos, por isso pode-se afirmar que esses danos podem contribuir na disfunção gastrointestinal (GIORGIO et al., 2012; GRUBIŠIĆ; GULBRANSEN, 2017).

Apesar de serem conhecidas desde 1899, algumas funções das CGEs foram recentemente comprovadas cientificamente como as imunológicas, participando assim da homeostase intestinal (LIU; YANG, 2022). A integridade do sistema gastrointestinal depende de vários tipos de células onde as CGEs, perante sua capacidade de manutenção homeostática, fornecem a imunidade e reparo tecidual desse sistema (PROGATZKY et al., 2021).

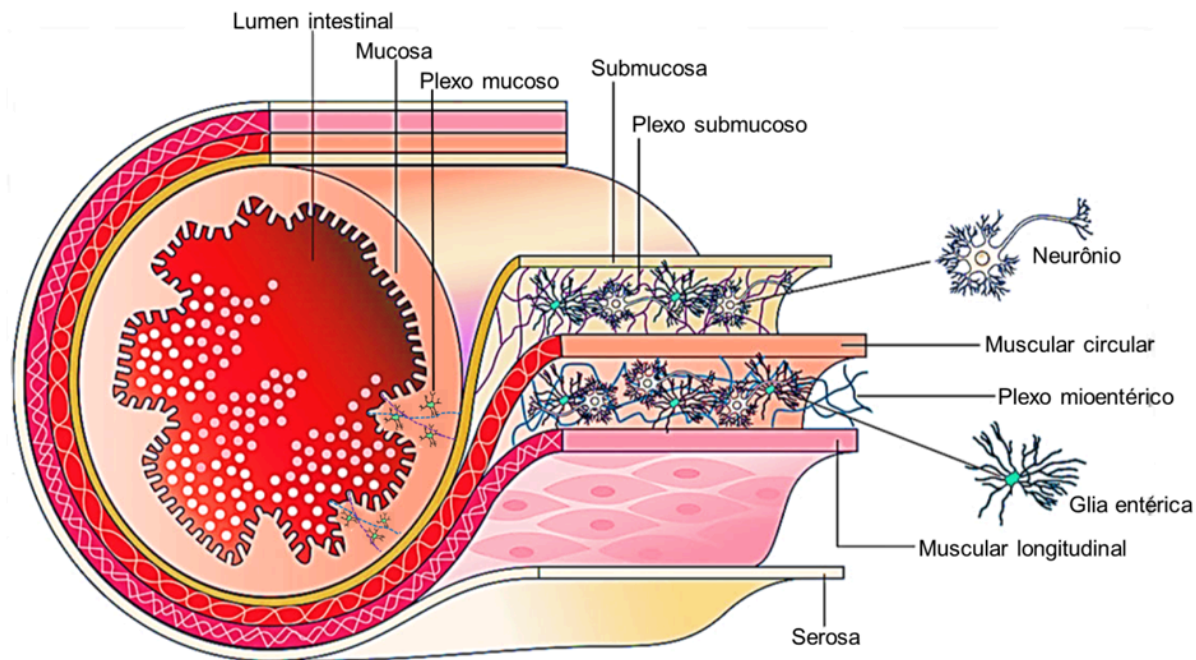
Diferente dos neurônios, cujas funções fisiológicas e patológicas já estão bem estabelecidas, as CGEs não geram potencial de ação. As mesmas atuam formando diversas redes de comunicação, gerando sinais de  $Ca^{2+}$  e integrando informações que são transmitidas pelos neurônios, células gliais, células imunes, entre outras, modulando a atividade e motilidade do circuito neural. Por tanto, elas são consideradas como um tipo de cérebro no intestino (LIU; YANG, 2022; OCHOA-CORTES et al., 2016).

O SNE é composto por dois tipos diferentes de plexos classificados como ganglionares e aganglionares, as CGEs podem ser encontradas nesses plexos (figura 2). O plexo ganglionar é formado pelo plexo mioentérico (plexo de Auerbach) e plexo submucoso (plexo de Meissner). Eles são distribuídos ao longo do trato digestivo. O plexo mioentérico fica localizado entre as camadas de músculo liso circular e longitudinal. Já o plexo submucoso, está subdividido em três plexos: plexo submucoso interno, plexo submucoso externo e plexo intermediário. O plexo aganglionar, também conhecido como plexo mucoso, não apresenta neurônios e está localizado na camada mucosa, sendo constituído por CGEs e



por axônios dos plexos ganglionares (PAWOLSKI; SCHMIDT, 2020; SCHEMANN; NEUNLIST, 2004).

Figura 2 – Representação das camadas intestinais e localização das células glias entéricas.



Fonte: Adaptado de Grubisic e Gulbransen (2019). A parede gastrointestinal é composta pela camada mucosa, submucosa, muscular (muscular circular e muscular longitudinal) e serosa. O sistema nervoso entérico é constituído pelos plexos mucoso, submucoso e mioentérico. O plexo mucoso, está localizado na camada mucosa, é constituído por células glias entéricas (CGEs) e terminações nervosas. O plexo submucoso pode ser encontrado na camada submucosa próxima à camada muscular circular interna. Enquanto o plexo mioentérico encontra-se entre a camada muscular circular interna e a longitudinal externa. Os plexos, submucoso e mioentérico, são constituídos por CGEs e neurônios.

Podemos classificar as CGEs em quatro grupos, do I ao IV, apresentando sua morfologia e localização de acordo com a classificação de Hanani. As células do tipo I são caracterizadas por apresentar aspectos semelhantes aos astrócitos do SNC, já as do tipo II possuem prolongamentos que se conectam com fibras neurais, podendo fazer analogia ao revestimento das fibras periféricas pelas células de Schwann. As CGEs tipo III, denominadas também como mucosa, caracterizadas pelos processos alongados e diversas ramificações, e finalmente as de tipo IV com morfologia bipolar, característica que estava localizada dentro das camadas de músculo liso circular e longitudinal ao longo das fibras nervosas (BAGHDADI et al., 2022; BOESMANS et al., 2015).

As CGEs cumprem papel importante na integridade da barreira epitelial intestinal. Atuam regulando a função dos neurônios via secreção de neuromoduladores. Atualmente, as CGEs são exploradas como um alvo terapêutico no manejo de doenças gastrointestinais,

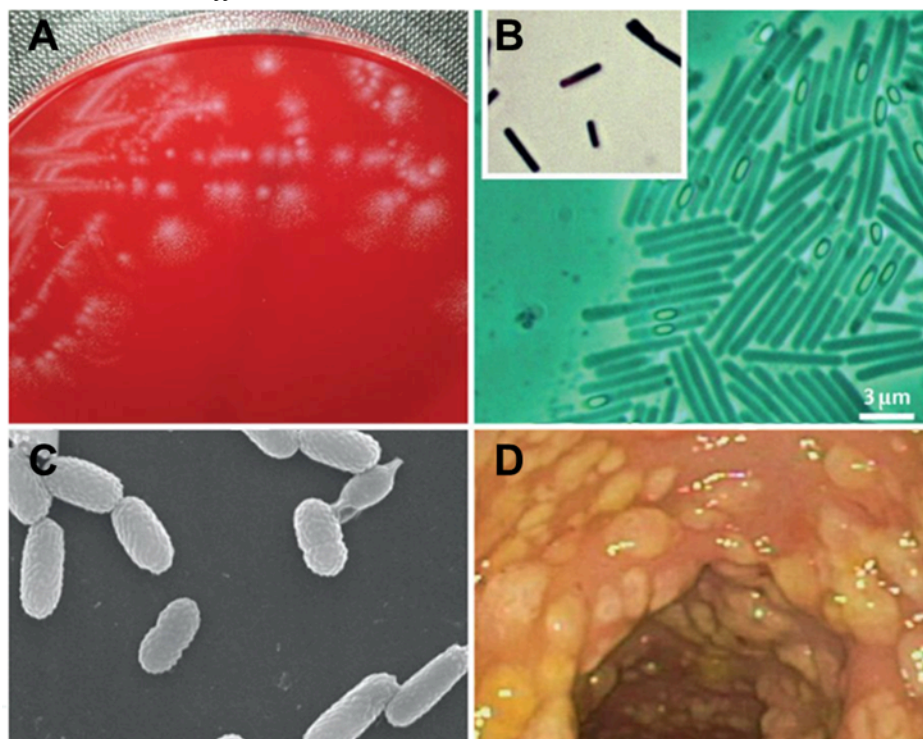
sendo cada vez mais estudado seu papel na fisiologia gastrointestinal (SEGUELLA; GULBRANSEN, 2021). Recentemente, foi identificado que a CGE tem função crucial no desenvolvimento da infecção por *C. difficile* (ICD) (COSTA et al., 2021).

Um estudo *in vitro*, onde foi avaliado os efeitos do *C. difficile* em CGEs, mostrou que as CGEs são suscetíveis aos efeitos citotóxicos das toxinas do *C. difficile*, as quais induziu morte celular e causou alterações na funcionalidade dessas células, mostrando assim suas implicações relevantes na patogênese da ICD (FETTUCCIARI et al., 2017; MACCHIONI et al., 2017).

### 1.3. *C. difficile*: Considerações gerais

O *Clostridioides difficile* (*C. difficile*), denominado anteriormente como *Clostridium difficile*, trata-se de um bacilo gram-positivo, anaeróbio, capaz de formar esporos resistentes e produzir toxinas (figura 3). Foi descrito pela primeira vez por Hall e O'toole em 1935, na microbiota intestinal de recém nascidos saudáveis. Inicialmente foi apenas conhecida como parte da microbiota intestinal de humanos recém-nascidos saudáveis, no entanto a partir de então foi identificada sua capacidade patogênica, causando doenças que no futuro foram associadas as exotoxinas solúveis (CHANDRASEKARAN; LACY, 2017; MARTÍNEZ-MELÉNDEZ et al., 2022).

Figura 3 - *Clostridioides difficile*.



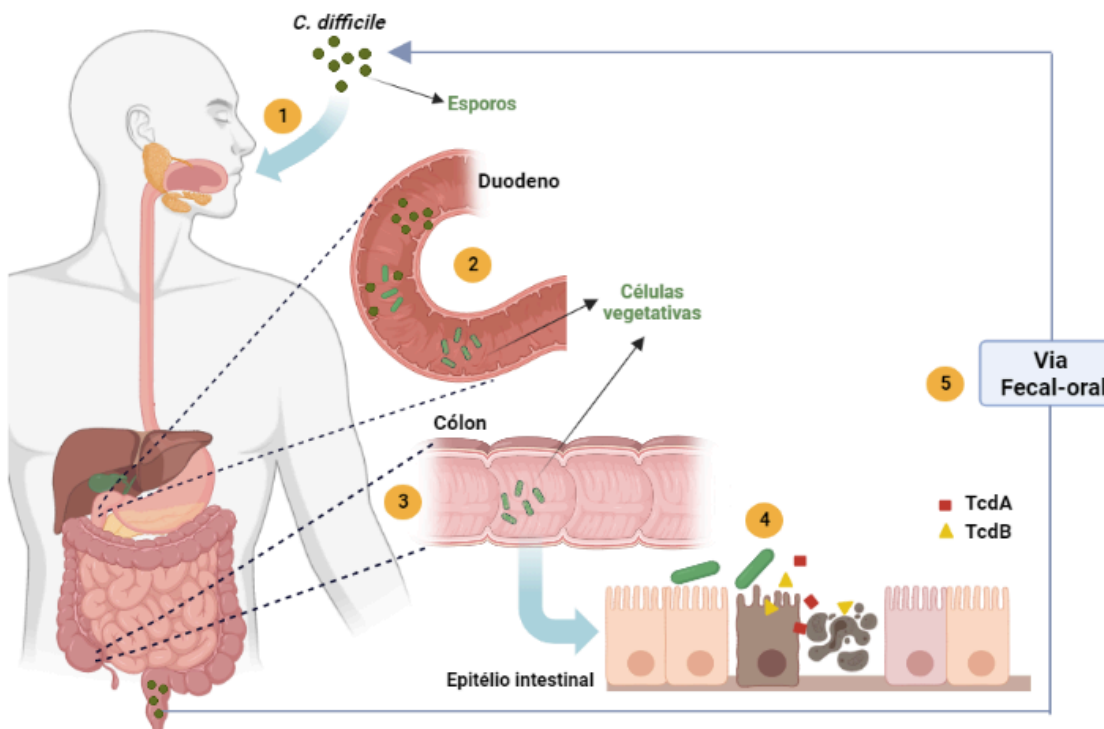
Fonte: Smits et al. (2016). (A) Placa de ágar sangue com colônias de *C. difficile* (B) Imagens de microscopia de contraste de fase de uma cultura de *C. difficile* mostrando a forma vegetativa da bactéria (forma de bastão alongado), esporos que na fase escura (destaque a esquerda - pontos escuros na porção subterminal dos bastões) e na fase brilhante (elipsóides brilhantes). (C) Microscopia eletrônica de varredura de esporos do *C. difficile*. (D) Imagem de colonoscopia em paciente com colite pseudomembranosa, mostrando pseudomembranas (estruturas amareladas) causada pelo *C. difficile*.

Nos Estados Unidos (EUA), o número de casos aumentou acentuadamente nos anos de 2000 até 2011. Recentemente, em um estudo epidemiológico foi relatado que o número de casos de infecção por *C. difficile*, foi estimado em 476.400 casos no ano de 2011, e de 462.100 casos em 2017 nos EUA. Esse declínio foi associado aos cuidados de saúde. No entanto, as infecções por *C. difficile* causam grande sofrimento e morte em milhares de americanos a cada ano, sendo considerada a décima causa de reinternação em hospitais e a quinta causa de morte por doenças gastrintestinais nos EUA (GUH et al., 2020; PEERY et al., 2019). Em um estudo realizado em um hospital da China com pacientes internados, relatou uma incidência taxa de 3,57% entre 140 pacientes diagnosticados com *C. difficile* (JIN et al., 2010).

As infecções por *C. difficile* vem aumentando em gravidade e incidência durante a última década. No Brasil, foi realizado um estudo com dados epidemiológicos referentes a Hospitais Oncológicos; no estado de Pernambuco durante o período de novembro de 2017 a agosto de 2019, onde isolados de fezes possivelmente contaminadas por *C. difficile* de 156 pacientes foram incluídos na pesquisa utilizando a técnica laboratorial de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR) para diagnóstico. Destes, 7,05% dos pacientes estudados foram isolados toxinas A e B. Esses dados são importantes na promoção e prevenção da disseminação da doença (TENÓRIO et al., 2021).

Após a contaminação, por via fecal-oral, ocorre uma disbiose e os esporos são ativados no trato gastrointestinal. Assim, células contaminadas passam pelo trato gastrointestinal e normalmente germinam em células vegetativas no duodeno. Esse processo é influenciado por diversos fatores, como os níveis de ácidos biliares, microbiota e resposta imune do hospedeiro. Após isso, as células vegetativas atingem o cólon onde a produção da toxina é iniciada e a infecção se desenvolve. Após a expulsão dos esporos nas fezes, o ciclo pode recomeçar, conforme ilustrado na figura 4 (CHANDRASEKARAN; LACY, 2017; KHURANA et al., 2020; MARTÍNEZ-MELÉNDEZ et al., 2022; NIBBERING et al., 2021).

Figura 4 - Estágios de infecção por *Clostridioides difficile* após transmissão por via fecal-oral.



Fonte: Elaborado pela autora (2023). 1: Os esporos do *C. difficile* são transmitidos por via fecal-oral. 2: O material passa pelo trato gastrointestinal e devido a diversos fatores (níveis de ácido biliar, redução da microbiota e resposta imune) os esporos germinam em células vegetativas no duodeno. 3: Ao chegar no cólon, as células vegetativas iniciam o processo de infecção. 4: As toxinas produzidas (TcdA e TcdB) são liberadas e causam a ruptura do epitélio intestinal juntamente com o processo de inflamação e resposta de células do sistema imune. 5: Os esporos que são eliminados nas fezes que ao entrar em contato com animais, alimentos e água promovem a continuação do ciclo pela contaminação por via fecal-oral. TcdA: Toxina A de *C. difficile*. TcdB: Toxina B de *C. difficile*.

Alguns fatores de risco para o desenvolvimento de infecções são longas internações hospitalares, idosos ( $\geq 65$ ), uso de antibióticos de amplo espectro e tempo prolongado de tratamento, casos de imunossupressão, pacientes transplantados e pacientes com câncer que fazem quimioterapia. As infecções causadas pelo *C. difficile* causam sintomas heterogêneos variando de diarreia leve a casos graves de colite pseudomembranosa, perfuração intestinal, choque séptico e morte, sendo considerada uma das infecções mais comuns a nível mundial (CHANDRASEKARAN; LACY, 2017; KHURANA et al., 2020; MARTÍNEZ-MELÉNDEZ et al., 2022). Durante a infecção aumenta-se o número de neutrófilos e surgem pseudomembranas no lúmen intestinal (RAEISI et al., 2022).

Devido à importância epidemiológica e impacto econômico na saúde, existe um avanço constante das pesquisas em diagnóstico e tratamento de infecções do *C. difficile*

(KHURANA et al., 2020). Além disso, novas cepas de maior virulência surgem constantemente, necessitando investimento e pesquisas em novos métodos terapêuticos.

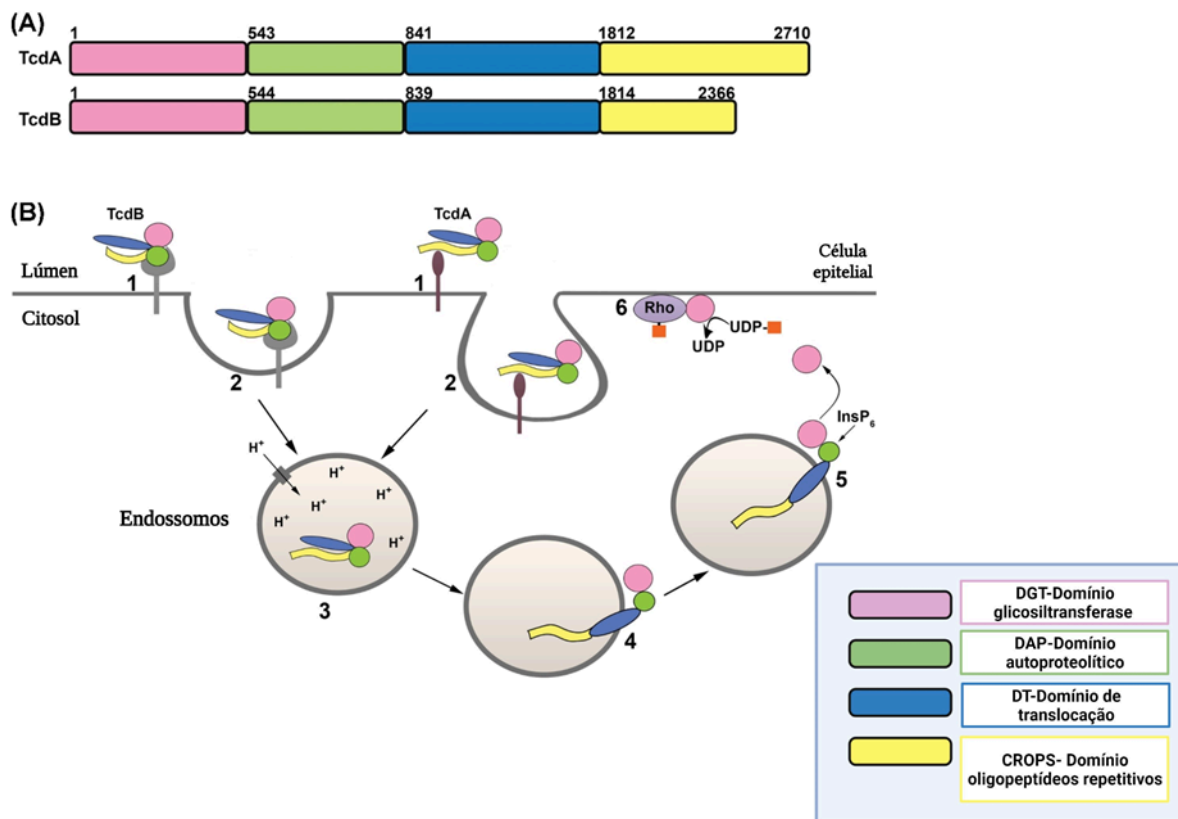
#### **1.4. Toxinas do *C. difficile* (A e B)**

Existem duas toxinas bastante importantes que são produzidas por *C. difficile*, a toxina A (TcdA) e a toxina B (TcdB). As mesmas são homólogas em 47% mas com funções diferentes, onde acontece a infecção (MARTÍNEZ-MELÉNDEZ et al., 2022; SMITS et al., 2016). Apesar de diversos fatores contribuírem para a adesão e colonização por *C. difficile*, são essas duas toxinas as principais responsáveis pelos sintomas durante a infecção (CHANDRASEKARAN; LACY, 2017; DEL PRETE et al., 2019).

Nos anos 90 acreditava-se que todas as cepas patogênicas produziam tanto a toxina A quanto a B. Com o surgimento de tecnologias mais inovadoras, identificou-se que a maioria, mas não todas as cepas patogênicas de *C. difficile*, produz ambas as toxinas (LIN et al., 2020). Essas toxinas são proteínas (TcdA – proteína de 308 kDa) e a toxina B (TcdB – proteína de 270 kDa), que pertencem à família das grandes toxinas clostridiais (CHANDRASEKARAN; LACY, 2017).

Assim, o nível da infecção e dos sintomas estão relacionados ao potencial de virulências das toxinas. Isso pode ser explicado porque ambas as toxinas são potentes monoglicosiltransferases, ativas em pequenas proteínas que são envolvidas na regulação ou formação da actina do citoesqueleto no epitélio intestinal. É importante salientar que algumas cepas de *C. difficile* conseguem produzir uma terceira toxina (CDT), sendo essa composta por um componente enzimático (CDTa) e um componente de ligação (CDTb) (DEL PRETE et al., 2019).

Figura 5 - Mecanismo de ação das TcdA e TcdB.



Fonte: Chandrasekaran e Lacy (2017). Estrutura representando o mecanismo de ação de TcdA e TcdB. (A) As toxinas A e B são organizadas em quatro domínios funcionais: o domínio glicosiltransferase (DGT) ilustrado na cor rosa, o domínio de autoprocessamento (DAP) ilustrado na cor verde, o domínio de entrega ou formação de poros ilustrado na cor azul e o domínio de oligopeptídeos repetitivos combinados que é o CROPS na cor amarelo. (B) Os quatro domínios funcionais contribuem para um mecanismo de intoxicação em diferentes etapas. TcdA e TcdB se ligam a diferentes proteínas da superfície celular ou açúcares no epitélio colônico (etapa 1) e são internalizados por vias endocíticas distintas (etapa 2). As toxinas atingem os endossomos acidificados (etapa 3) e o baixo pH desencadeia uma alteração conformacional no domínio de entrega da toxina, resultando na formação de poros e translocação do DGT (e provavelmente do DAP) para o citosol (etapa 4). Inositol hexaquisfosfato ( $\text{InsP}_6$ ) se liga e ativa o DAP, resultando na clivagem e liberação do DGT (etapa 5). O DGT inativa as proteínas da família Rho transferindo a porção de glicose (quadrados na cor laranja) da UDP-glicose para a região switch I da GTPase (etapa 6). A glicosilação interrompe a sinalização da GTPase e leva a efeitos citopáticos de "arredondamento" e morte celular apoptótica.

O mecanismo dessas toxinas (figura 5) se dá por meio de uma complexa cascata de respostas celulares do hospedeiro e assim conseguem provocar diarreia, inflamação e necrose tecidual. Nesse sentido, é importante tanto a nível clínico quanto epidemiológico, entender o

mecanismo e detectar as toxinas durante o diagnóstico. Quando as toxinas TcdA e TcdB são secretadas, as mesmas se ligam e entram no epitélio do cólon para assim causar a produção de quimiocinas e citocinas inflamatórias. Após isso ocorre um influxo de neutrófilos, ruptura de junções apertadas, secreção de fluido e morte de células epiteliais (SMITS et al., 2016).

### **1.5. Efeitos deletérios das toxinas do *C. difficile* nas CGEs**

O primeiro estudo evidenciando alterações nas CGEs durante a ICD em humanos mostrou aumento de proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e o fator neurotrófico derivado de glia (GDNF), ambos expressos especificamente por essas células no intestino, no cólon inflamado de pacientes (VON BOYEN et al., 2011).

Em estudo posterior *in vitro* mostrou que a TcdB apresenta efeitos deletérios diretos em CGEs: efeitos citopáticos seguidos de efeitos citotóxicos com a indução de arredondamento celular precoce com glicosilação de Rac1 (*glicosilação de Rho-GTPase*); interrupção precoce do ciclo celular na fase G2/M *pela* regulação negativa do complexo ciclina B1/Cdc2, essenciais para a entrada das células na mitose; e apoptose *por uma via dependente de caspase* (FETTUCCIARI et al., 2017). Os estudos sugerem um importante papel *in vivo* das CGEs na patogênese da infecção por *C. difficile*, devido à alta suscetibilidade a TcdB *in vitro*, o aumento da sensibilidade a citocinas pró-inflamatórias relacionadas à apoptose e a persistência de funções alteradas prejudiciais nas células sobreviventes. No entanto, o aumento da produção de GDNF sugere mecanismos de auto salvamento.

Recentemente, Belkind-Gerson et al. (2017) encontraram que a ICD aumentou a população de células expressando HU e SOX2 de forma concomitante em amostras de biópsias de cólon de pacientes. Essas células são importantes para a reposição de neurônios após o dano tecidual, indicando um processo de neuroplasticidade pós-infecção.

Macchioni et al. (2017), por sua vez, evidenciaram que a ação da TcdB desencadeou a ativação do eixo NADPH oxidase/ROS/JNK/caspase-3 e culminou na fragmentação do DNA de CGEs, com um aumento significativo de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas 2 horas iniciais de tratamento das células com TcdB. Ademais, observaram que a agressividade da TcdB, embora não afete profundamente a funcionalidade mitocondrial, é restrita principalmente ao compartimento citosólico.



Fettucciari et al. (2018) mostraram que as CGEs são mais suscetíveis a TcdB, onde essa toxina pode induzir a senescência nessas células, causando alterações importantes no ciclo celular, mudanças metabólicas, morfologia, dessa forma contribuindo para inflamação.

Os resultados de um estudo sobre mecanismo de sinalização envolvido na toxicidade em CGEs, demonstraram que a expressão de NOX4, uma enzima que faz parte do complexo de NADPH oxidase, foi significativamente aumentada nas CGEs após exposição a TcdB. A inibição da NOX4 foi capaz de atenuar a toxicidade da TcdB (JIANG et al., 2019).

Outro estudo recente mostrou que a sinalização S100B/RAGE/PI3K/NFκB e S100B/STAT3 contribuíram, respectivamente, para a expressão de *IL-6* e morte celular induzidos por TcdA e TcdB em CGEs (COSTA, 2019; COSTA et al., 2021).

Costa et al. (2021) investigaram o papel de *S100B* (proteína B de ligação ao cálcio S100) na ICD e avaliaram as vias de sinalização ativadas na resposta inflamatória em CGEs induzidas pelas TcdA e TcdB em testes *in vivo*. Como resultados, o aumento de *S100B* foi encontrado em biópsias de cólon de pacientes com ICD e tecidos de cólon de camundongos infectados. Em CGEs, as toxinas aumentaram a expressão de *IL-6* mediada por *S100B* pela via de sinalização RAGE/PI3K/NFκB. A inibição de *S100B* pela pentamidina reduziu a síntese de IL-1β, IL-18, IL-6, fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), TNF-α, IL-17, IL-23 e IL-2, aumentou a transcrição de mediadores protetores de regulação negativa (SOCS2, IL-22 e *Bcl-2*), reduziu o recrutamento de neutrófilos e melhorou o dano intestinal. Portanto, a inibição da atividade do *S100B* atenua a lesão intestinal e a diarreia causada pelas toxinas do *C. difficile*.

Em sua pesquisa recente, Loureiro et al. (2022) avaliaram o efeito da ICD na expressão de canais de pannexina-1 (PANX1) e receptores P2X7 (P2X7R) em tecidos intestinais de camundongos *in vitro* e *in vivo*, bem como seu papel na morte celular e na expressão de *IL-6* induzida por TcdA e TcdB em CGEs. No teste pré-clínico, a análise imuno-histoquímica revelou aumento de Panx1, proteína canal que permite a passagem de ATP, que por sua vez ativam os P2X7R que regulam a inflamação e a morte celular nas doenças inflamatórias intestinais, no ceco e cólon dos camundongos infectados, juntamente com ruptura das células epiteliais, infiltrado de células inflamatórias e edema da submucosa. Os autores observaram que tanto TcdA como a TcdB regulam positivamente a expressão gênica de Panx1 em EGCs, com aumento dos seus níveis na mucosa intestinal e na camada submucosa. Nos ensaios *in vitro*, o uso de inibidor de Panx1 diminuiu os níveis de ATP



extracelular, apresentando um papel importante nos efeitos das toxinas de *C. difficile* em CGEs, participando da morte celular induzida por ambas as toxinas ao promover a ativação da caspase-3/7 via P2X7R, que também está envolvida na expressão de *IL-6*.

No estudo de Santos et al. (2022) foi realizada caracterização de população específica de neurônios mioentéricos afetados pela TcdA, bem como investigado o papel do P2X7R na inflamação, morte celular e as mudanças no sistema nervoso entérico no íleo de camundongos. Os grupos avaliados foram testados apenas com a TcdA e em associação com um antagonista inespecífico e competitivo do P2X7R. Como resultados, TcdA aumentou a expressão do gene do P2X7R nos tecidos ileais, induziu ruptura epitelial completa, edema extenso e intensa infiltração de neutrófilos no íleo, enquanto o bloqueio do receptor diminuiu o dano intestinal, a liberação de citocinas *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *IL-8* e *TNF- $\alpha$* , morte celular, síntese de *SI00B* e perda de neurônios entéricos, especificamente de células calretinina (Calr+) e colina acetiltransferase (ChaT+).

Fettucciari et al. (2022) avaliaram as vias de sinalização apoptótica envolvidas na apoptose induzida por TcdB e TcdB + citocinas *TNF- $\alpha$*  e *IFN- $\gamma$*  (CK) em testes *in vitro* em CGEs utilizando inibidores de caspases. Como resultados, a TcdB induziu a apoptose de CGEs dependentes de caspase e independentes de mitocôndrias, que é intensificada pelas citocinas pró-inflamatórias *TNF- $\alpha$*  e *IFN- $\gamma$*  aumentando a ativação de caspase-3/7/9 e poli adenosina difosfato-ribose polimerase (PARP). TcdB e TcdB+CKs induziram apoptose através de três vias de sinalização ativadas por calpaínas, caspases e catepsinas, todas envolvidas na indução e na execução da sinalização apoptótica em ambas as condições, mas em graus diferentes em TcdB e TcdB+CKs. Em conclusão, a capacidade do TcdB de ativar pelo menos três vias de sinalização apoptótica em CGEs, também potencializada pelas citocinas, duas ativadas por calpaínas e caspases de maneira caspase-dependente e independente, e uma ativada pela catepsina B em uma caspase-3- e caspase-7-maneira independente, representa uma importante estratégia do *C. difficile* para superar a resistência contra sua atividade citotóxica.

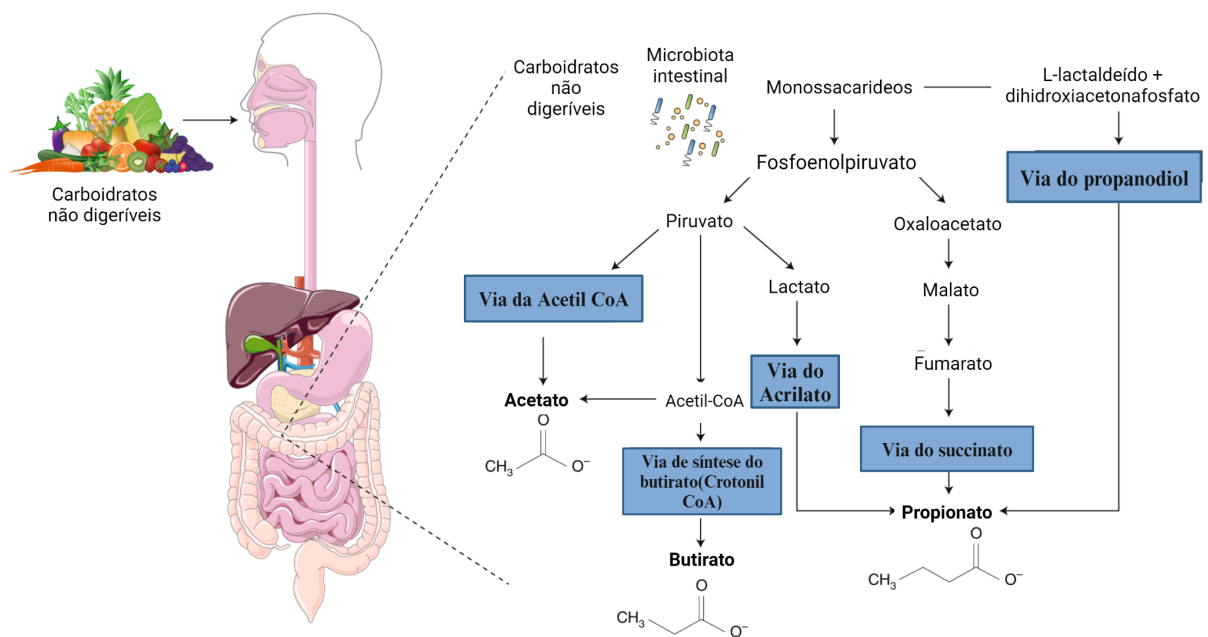
## **1.6. Ácidos Graxos de Cadeia Curta e sua importância para o trato gastrointestinal**

Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), são os principais metabólitos produzidos pela fermentação bacteriana de fibras alimentares no intestino. Os mesmos são produzidos por bactérias intestinais durante a fermentação de polissacarídeos, parcialmente e não digeríveis, desempenhando uma função relevante na regulação da fisiologia do cólon,

influenciando na transdução de sinal do intestino (CARRETTA et al., 2021; CONG; ZHOU; ZHANG, 2022).

Os AGCCs (Figura 6) também atuam na modulação de diferentes processos, apresentando funções específicas e possuem propriedades anti-inflamatórias e efeitos imunomoduladores (HE et al., 2020). Entre os principais destaca-se o acetato, propionato e butirato. Após sua produção, os AGCCs podem ser absorvidos por difusão passiva ou podem ser transportados para dentro da célula por transportadores de substrato, e quando absorvidos pelos colonócitos, os que entram no ciclo do ácido cítrico nas mitocôndrias gerando energia. Já no fígado, os AGCCs servem como substratos energéticos para os hepatócitos. Assim, eles mediam diversas funções fisiológicas e fisiopatológicas no intestino e tecidos adjacentes (CARRETTA et al., 2021).

Figura 6- Estruturas de Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCCs).



Visão geral das principais vias metabólicas envolvidas na produção de AGCC pela microbiota intestinal. Os carboidratos não digeríveis entram no intestino distal, onde são hidrolisados pela microbiota residente em monossacarídeos. Esses monossacarídeos sofrem fermentação bacteriana por meio de vários processos metabólicos, gerando assim os principais AGCCs: acetato, propionato e butirato (FRAMPTON, et al, 2020).

A produção de AGCCs é influenciada pelo tipo da dieta, diversidade e número de microrganismos que compõe a microbiota intestinal do hospedeiro, tempo de passagem de

nutrientes pelo intestino e presença de doenças metabólicas (MA et al., 2022; MARKOWIAK-KOPEĆ; ŚLIŻEWSKA, 2020).

Os AGCCs causam efeitos benéficos contra a inflamação intestinal, protegendo contra a integridade epitelial intestinal. Recentemente vem sendo apontado que os efeitos protetores ocorrem devido aos receptores de ácidos graxos livres, que são FFA2 e FFA3. A perda desses receptores em modelos experimentais de distúrbios inflamatórios intestinais, é fortemente associada a respostas inflamatórias desreguladas (PRIYADARSHINI et al., 2018).

Os AGCCs melhoram a saúde intestinal por diferentes meios, promovendo também a manutenção da integridade da barreira intestinal, produção de muco, prevenção da inflamação e redução do risco de câncer colorretal. Inclusive, eles podem atuar na regulação da função mitocondrial do fígado, na manutenção da homeostase da energia corporal, no controle do apetite, na regulação da inflamação e no metabolismo da glicose e lipídios. Indiretamente, atuam retardando o esvaziamento gástrico e o trânsito intestinal, auxiliando não somente na absorção de energia, mas também aumentando a liberação de insulina dependente de glicose e atuando na liberação de serotonina induzida pelos AGCCs (HE et al., 2020; PORTINCASA et al., 2022).

Apesar de muitas funções já terem sido identificadas, muitos mecanismos ainda não estão esclarecidos (HE et al., 2020). Alguns estudos relacionados aos efeitos dos AGCCs, e suas propriedades funcionais em células intestinais, preservando a barreira intestinal na defesa contra patógenos. As pesquisas relacionadas a esses efeitos apresentadas por May et al. (1994) identificaram em um estudo *in vitro* um modelo animal suíno sobre o efeito da fonte de fibra na produção de AGCCs relacionado com toxinas do *C. difficile*. Assim foi mostrado que as fibras servem como fonte de energia para o crescimento das bactérias gastrointestinais. Resultando em aumento da concentração dos AGCCs e diminuição do pH, contribuindo com a diminuição do crescimento de patógenos.

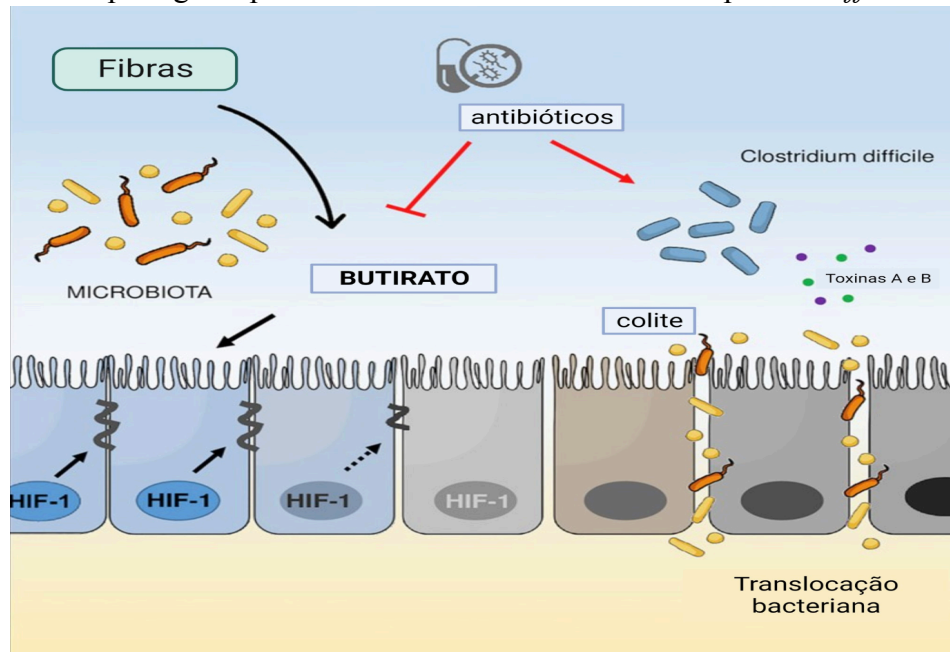
Em outro estudo foi mostrado que os AGCCs apresentam efeitos em diferentes células envolvidas nas respostas inflamatórias e imunes. Os AGCCs afetam a função dos leucócitos (por exemplo, produção de mediadores inflamatórios e capacidade de migração dos leucócitos), mas também podem induzir apoptose em linfócitos, macrófagos e neutrófilos. Este último efeito pode ser relevante para o desfecho do processo inflamatório e da resposta imune às bactérias produtoras desses ácidos graxos (VINOLO et al., 2011).

Fachi et al. (2020) analisaram o efeito dos AGCCs no modelo de ICD em camundongos. Nesse estudo, os autores mostraram que a administração dos AGCCs beneficia na melhora da doença, constatado pelo aumento das respostas imunes inatas através do mecanismo, devido à ação dos neutrófilos pelo receptor de ácidos graxos livres 2 (FFAR2). Além disso, foi observado uma melhora na resistência do tratamento ao hospedeiro do *C. difficile*, ao invés de interferir na replicação bacteriana.

Um estudo pré-clínico em camundongos mostrou que os AGCCs reduzem a perda neuronal e glial entérica, induzido pelo tratamento com antibióticos (ampicilina, vancomicina e metronidazol). No entanto, sua suplementação não foi suficiente para normalizar a maioria das funções fisiológicas alteradas pelo tratamento com antibióticos (VICENTINI et al., 2021). Embora diferentes estudos evidenciassem a relação entre os AGCCs e a proteção da integridade da barreira intestinal, até o melhor do nosso conhecimento, nenhum deles identificou qual o papel real dos AGCCs na modulação das CGEs (DEFRIES; BELTRAN, 2020).

Em humanos, os AGCCs exercem um papel benéfico na homeostase intestinal e no metabolismo, resultando em modificações na microbiota humana que podem contribuir na fisiopatologia de algumas doenças. Recentemente, foi mostrado que os AGCCs atuam e contribuem na integridade da barreira intestinal, e na regulação de apetite. Deleu et al. (2021) encontraram efeitos promissores do butirato, molécula que pode ser utilizada como possível tratamento probiótico, no manejo de doenças inflamatórias intestinais e ainda, atuando na restauração da disbiose (figura 7) (DELEU et al., 2021; HEE; WELLS, 2021).

Figura 7 - O butirato protege o epitélio intestinal dos danos causados pelo *C. difficile*.



Fonte: Fachi et al. (2019). O butirato mostrou efetividade na proteção do epitélio intestinal causados pelo *C. difficile* através da estabilidade do fator induzível por hipóxia (HIF-1-1), aumentando as junções celulares, reduzindo assim a permeabilidade epitelial intestinal e translocação bacteriana.

Mediante o estudo de um modelo animal, Pensinger et al. (2023) verificaram que o butirato influencia o crescimento em diferentes tipos isolados de *C. difficile* quando ele é suplementado em concentrações de 0, 6,25, 12,5, 25 ou 50 mM em equivalência com cloreto de sódio. Assim, essas descobertas fornecem uma base para trabalhos futuros para investigar se o butirato interfere diretamente no *C. difficile*, para o desenvolvimento de diversas abordagens de antibióticos ou transplante fecal, como intervenções dietéticas para mitigar a ICD em populações humanas vulneráveis.

## 2. JUSTIFICATIVA

As ICD podem ser apontadas como uma “ameaça urgente” para a saúde global, apresentando mais de 220.000 casos e 13.000 mortes por ano somente nos Estados Unidos sendo considerada a décima causa de readmissões no período de 30 dias por doenças do trato gastrointestinal, apresentando um custo estimado de US\$4 bilhões por ano nos EUA (PEERY et al., 2019). Em um hospital da China foi realizado um estudo com pacientes internados, relatou uma taxa de incidência de 3,57% entre 140 pacientes diagnosticados com *C. difficile* (JIN et al., 2010).

Em um estudo foi identificado cerca de sete casos para cada 10.000 pacientes infectados por *C. difficile* em 482 hospitais em 20 países europeus, um custo de aproximadamente \$6.000 por cada caso de ICD (DAVIES et al., 2014). No Brasil foi realizado um estudo prospectivo, multicêntrico e observacional, em cinco hospitais localizados em três capitais estaduais (Fortaleza, São Paulo e Curitiba) de diferentes regiões. Esses pacientes foram selecionados possíveis casos de infecção por *C. difficile*, qual é assim que foi constatada a prevalência de ICD de 15% (GIRÃO et al., 2020). Dessa forma, nota-se que ICD tem se tornado um desafio no tratamento de casos graves.

Da mesma forma, as CGEs desempenham um papel fundamental na manutenção das funções gastrointestinais que podem sofrer danos através das toxinas do *C. difficile* (FETTUCCIARI et al., 2017; GRUBIŠIĆ; GULBRANSEN, 2017; MACCHIONI et al., 2017). Estudos visando a redução da infecção e danos as CGEs podem revelar alvos terapêuticos e profiláticos voltados para as ICD. Dentre os possíveis alvos terapêuticos, alguns estudos relacionados aos efeitos AGCCs, tem revelado suas propriedades funcionais em células intestinais, preservando a barreira intestinal na defesa contra patógenos. Porém nenhum estudo, até o momento, identificou qual papel real dos AGCCs, incluindo o butirato na modulação das CGEs (DEFRIES; BELTRAN, 2020).

Embora o butirato já tenha se mostrado eficiente contra a ICD, os mecanismos na resposta das CGEs às toxinas do *C. difficile* ainda não foram evidenciados. Por tanto, investigações de terapias capazes de contribuir na prevenção de danos promovidos pelas toxinas do *C. difficile* em células gliais. Desse modo, esse projeto se propõe a investigar como o butirato contribui na resposta das CGEs diante ao desafio com as toxinas A e B do *C. difficile*.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivos Geral**

Investigar o papel do butirato na resposta das CGEs às toxinas frente ao *C. difficile*.

#### **3.2. Objetivo específicos**

- Avaliar se o butirato previne a morte de CGEs induzidas pelas toxinas do *C. difficile*.
- Avaliar se o butirato modula a resposta pró-inflamatória induzida pelas toxinas do *C. difficile* em CGEs.

## 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 neste estudo encontram-se detalhados no apêndice.

### 4.2. Experimentos *in vitro*

#### 4.2.1. Cultura de CGEs

O estudo *in vitro* foi realizado com a linhagem de CGEs imortalizadas obtidas da ATCC (PK060399egfr, CRL 2690). Essas células são aderentes e foram isoladas do plexo mioentérico do jejuno de rato (*Rattus norvegicus*) adulto. As CGEs foram cultivadas em meio Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de antibiótico (100 µg/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina) e piruvato de sódio (na concentração final de 1 mM), sendo mantidas em incubadora a 37°C e 5% CO<sup>2</sup>. As células que foram utilizadas para a avaliação dos parâmetros deste estudo encontravam-se entre as passagens 10 a 18. Para todos os experimentos, as células foram liberadas dos frascos de cultura por meio da incubação com 0,05% tripsina-EDTA por 5 minutos.

#### 4.2.2. Administração de toxinas e butirato em CGEs

As seguintes concentrações de 50 ng/mL de TcdA e 1 ng/mL de TcdB, foram utilizadas, baseadas em estudos anteriores *in vivo e in vitro* do nosso grupo de pesquisa (COSTA, et al, 2021; COSTA, et al, 2023; LOUREIRO, et al, 2022).

A cepa de *C. difficile* VPI10463 (ATCC 43255) foi obtida da empresa ATCC (Coleção de Tipos de Culturas Americano). 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 logarítmica, a amostra foi incubada por 18 horas 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). Para obter 10<sup>5</sup> unidades formadoras de colônia (UFC)



de *C. difficile* VPI10463/100 $\mu$ L, realizou-se uma diluição de 1:100 (bactéria em suspensão: CCP). A leitura de densidade óptica de 1,0 foi considerada equivalente a 10<sup>8</sup> UFC/ml.

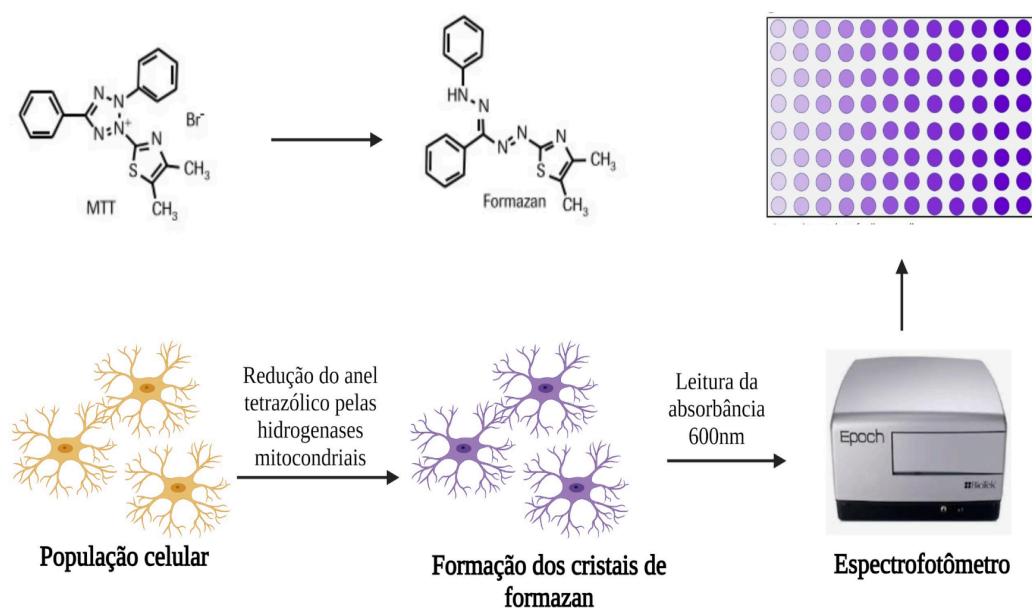
Para o melhor entendimento se o butirato exerce alguma função direta na morte celular e na resposta inflamatória de CGEs desafiadas pelas toxinas do *C. difficile* (50ng/mL TcdA e 1 ng/mL TcdB), essas células foram incubadas com butirato em diferentes concentrações (0,2, 2, 20, 200, 400, 2000, 2 x 10<sup>4</sup>, 4x 10<sup>3</sup>, 2x 10<sup>4</sup>, 10<sup>6</sup>  $\mu$ M) uma hora antes do desafio com as toxinas. Após 18 horas de incubação com as toxinas, as células foram coletadas para análise dos parâmetros deste estudo. As concentrações do butirato foram baseadas nos valores encontrados no ensaio de viabilidade.

#### **4.2.3. Parâmetros avaliados no estudo *in vitro***

##### **4.2.3.1. Ensaio de viabilidade celular**

Para definir se as concentrações de butirato são capazes de não afetar a viabilidade de CGEs em 18 horas de incubação, realizou-se o ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio (MTT). As CGEs (5x10<sup>3</sup> células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços e após 18 horas foram incubadas com butirato (200, 2000, 2x10<sup>4</sup>, 10<sup>6</sup>  $\mu$ M) por 18 horas de incubação. Para a escolha das concentrações citadas anteriormente foi realizada uma revisão de literatura acerca da concentração e efeito do butirato em diferentes células (KAISAR et al., 2017; WEBER; KERR, 2006; SEGAIN et al., 2000; PENG et al., 2007; YANG et al., 2020; DYER et al., 2005). Em seguida, as células foram incubadas com MTT (0,5 mg/mL reconstituído em DMEM suplementado) por 2 horas a 37 °C em incubadora sob condição de 5% de CO<sup>2</sup>. Após a remoção da solução de MTT, 150  $\mu$ l de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados a cada poço para ressuspender os cristais de formazan. As placas foram agitadas durante dois minutos em temperatura ambiente e a absorbância da reação foi mensurada a 570 nm utilizando um leitor de ELISA. Um grupo controle de morte, no qual CGEs foram incubadas com dimetilsulfóxido (DMSO), foi adicionado ao experimento. Uma breve ilustração do método encontra-se apresentada na figura 8.

Figura 8 - Ensaio de viabilidade celular

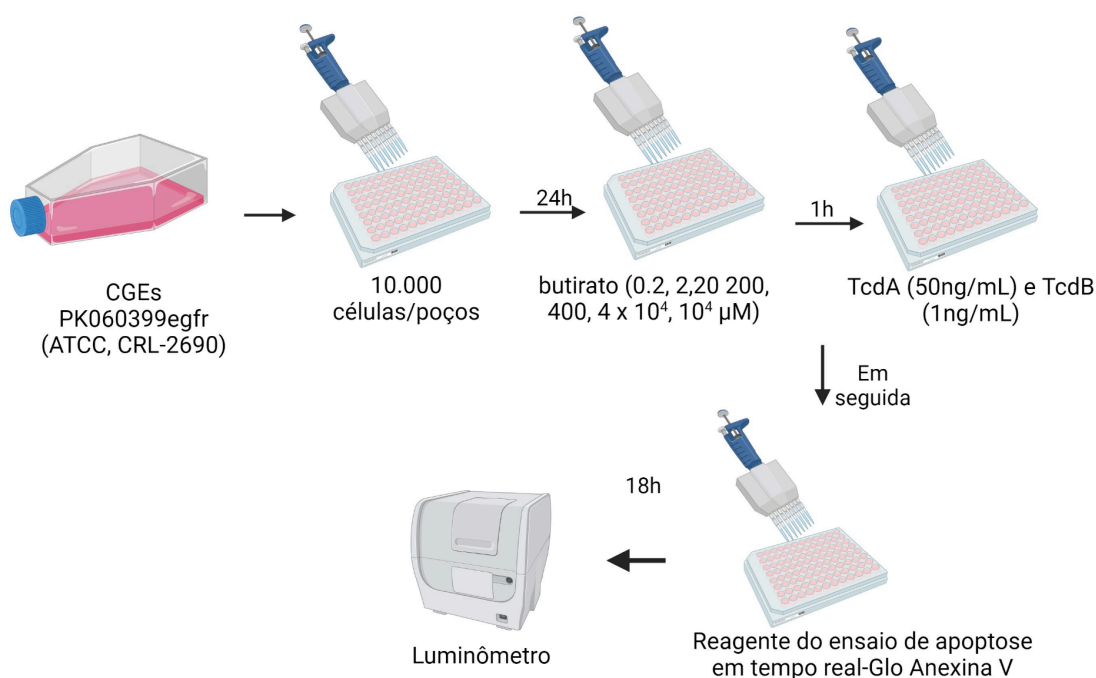


Fonte: Elaborada pela autora. MTT= Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio.

#### 4.2.3.2. Ensaio de ligação fosfatidilserina-anexina V

Para avaliar apoptose em CGEs incubadas com TcdA e TcdB, realizou-se um ensaio de ligação fosfatidilserina (FS)-anexina V em tempo real em células vivas conforme descrito pelo fabricante (ensaio em tempo real Glo-anexina V apoptose, Promega, JA1011). Primeiramente, CGEs ( $10^4$  células/poço) foram cultivadas e plaqueadas em placas brancas e opacas de 96 poços (Falcon). Após 24h, as células foram tratadas com butirato (0,2,2,20,400,  $4 \times 10^4$ ,  $10^4$   $\mu\text{M}$ ) ou meio. Após 1h de incubação, as toxinas TcdA (50 ng/mL) ou TcdB (1 ng/mL) foram adicionadas. Em seguida, adicionaram-se 100  $\mu\text{L}$  de reagente de detecção 2x (2  $\mu\text{L}$  do substrato de anexina NanoBit, 2  $\mu\text{L}$   $\text{CaCl}_2$ , 2  $\mu\text{L}$  anexina V-SmBit e 2  $\mu\text{L}$  anexina V-LgBit em 1000  $\mu\text{L}$  de DMEM suplementado pré-aquecido a 37 °C) a cada poço, sendo incubadas a 37 °C numa incubadora umidificada sob 5%  $\text{CO}_2$  condição por 18 horas. A luminescência foi mensurada por meio de um luminômetro (Biotek Epoch, PROMEGA). Para a obtenção da unidade de luminescência relativa (URL), o sinal de luminescência de todas as amostras foi subtraído pela luminescência intrínseca do reagente de detecção (poço apenas com DMEM suplementado sem células) e normalizado com o grupo controle (células expostas apenas ao meio de cultivo suplementado). Abaixo é apresentado uma ilustração do método ensaio de ligação fosfatidilserina-anexina V figura 9.

Figura 9 - Ensaio de ligação fosfatidilserina-anexina V



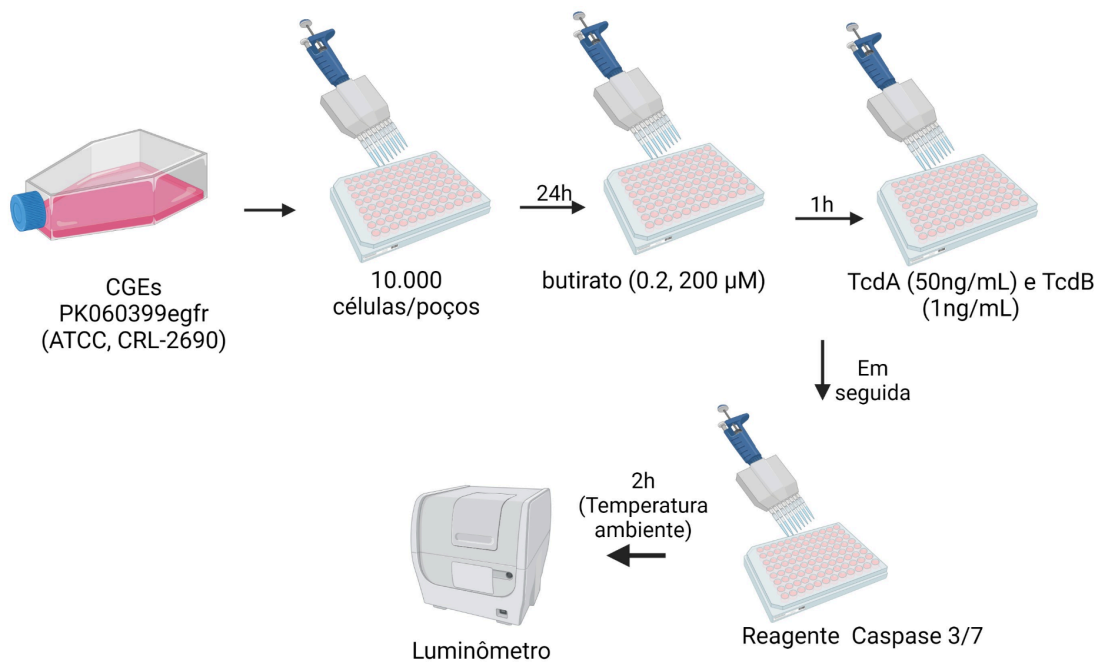
Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.2.3.3. Avaliação da atividade de caspase 3/7

Para avaliar a ativação de caspase-3 e 7 em CGEs incubadas com TcdA ou TcdB, realizou-se um ensaio de atividade de caspase 3/7 conforme descrito pelo fabricante (caspase-Glo 3/7, Promega, G8090).

Primeiramente, CGEs ( $10^4$  células/ poço) foram plaqueadas em placas brancas e opacas de 96 poços (Falcon). Após 24 horas, as células foram tratadas com butirato ou meio. Após 1 hora de incubação, a TcdA (50 ng/mL) ou TcdB (1 ng/mL) foram adicionadas. Após 18 horas de desafio com as toxinas do *C. difficile*, adicionaram-se 100 µL de reagente de caspase-Glo 3/7 (substrato de caspase-Glo 3/7 reconstituído em tampão de caspase-Glo 3/7, equilibrado em temperatura ambiente antes do uso) a cada poço, agitou-se a placa num agitador de placas por 30s em 500 rpm e incubou-se por 2 horas em temperatura ambiente protegido da luz. A luminescência foi mensurada por meio de um luminômetro (Biotek Epoch, PROMEGA). Para a obtenção da unidade de luminescência relativa (ULR), o sinal de luminescência de todas as amostras foi subtraído pela luminescência intrínseca do reagente de caspase-Glo 3/7 (poço incubado apenas com DMEM suplementado e reagente de caspase-Glo 3/7 sem células). Uma breve ilustração do ensaio encontra-se apresentada na figura 10.

Figura 10 - Ensaio da atividade de Caspase 3/7



Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.2.3.4. Ensaio qPCR

Para avaliar a expressão gênica de *Bcl-2*, *S100B* e *IL-6* em CGEs expostas à TcdA e TcdB, realizou-se qPCR. CGEs ( $6 \times 10^6$  células/ poço) foram distribuídas em placas de 6 poços e tratadas com TcdA ou TcdB e moduladores farmacológicos por 18 horas. Após a incubação, o RNA total foi extraído usando o kit RNeasy® Mini Handbook por meio do QIAcube (Qiagen). O RNA foi mensurado, tratado com Dnase e convertido em cDNA.

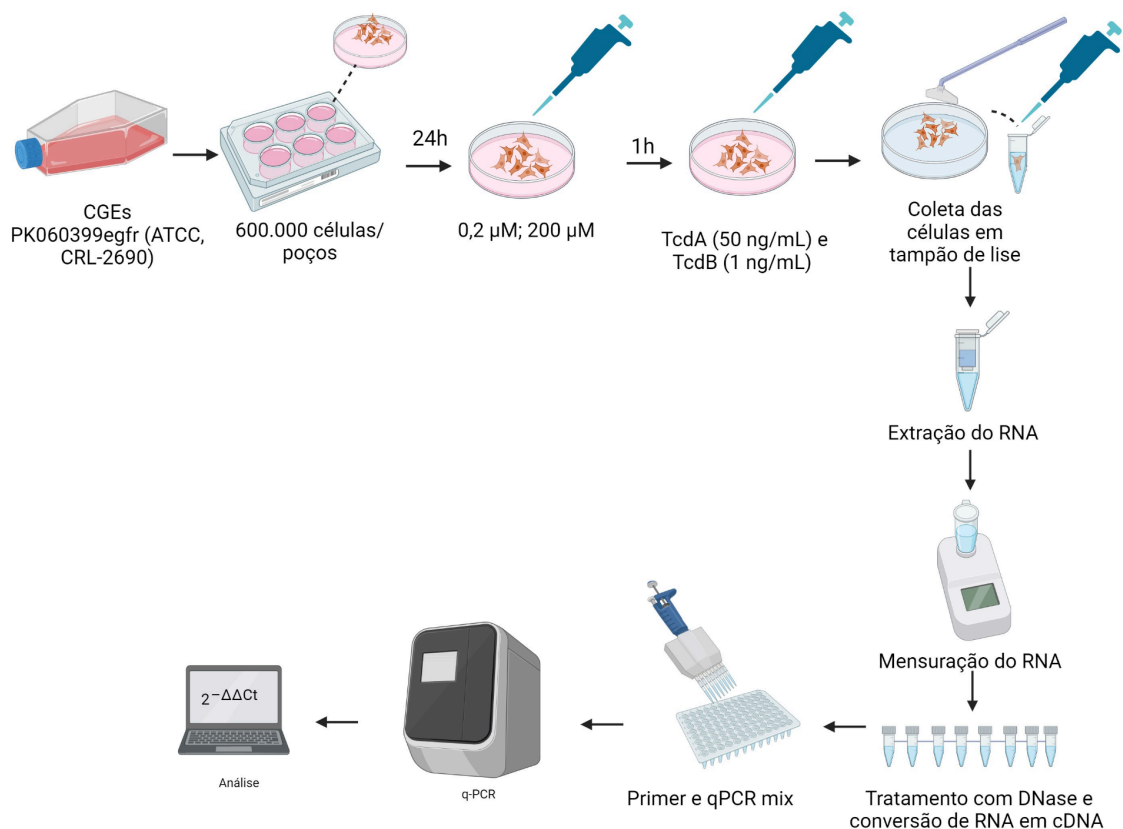
Para a síntese do cDNA, 1000 ng de RNA foi então transcrito reversamente usando o kit de síntese de cDNA iScript (BioRad) após remoção da contaminação do DNA genômico por meio do tratamento das amostras com DNase I (Invitrogen). A amplificação de *Bcl-2*, *S100B*, *IL-6* e GAPDH por qPCR foi realizada por meio do sistema CFX Connect (BioRad) com as seguintes condições 95 °C por 30 segundos seguido por 40 ciclos a 95 °C por 5 segundos e 60 °C por 30 segundos. Todas as reações foram realizadas com supermix iTaq universal Syber (BioRad). Os conjuntos de *primers* utilizados foram listados no quadro 1. A expressão relativa de cada gene de interesse foi mensurada pelo método  $\Delta\Delta C_t$  (RAO et al., 2013). As sequências dos primers foram apresentadas no quadro 1 e uma breve ilustração do método é apresentada na figura 11.

Quadro 1 - *Primers* utilizados no qPCR.

<p><b><i>IL-6</i></b>            Forward GCCAGAGTCATTCAGAGCAATA            Reverse GTTGGATGGTCTTGGTCCTTAG</p>
<p><b><i>GAPDH</i></b>            Forward AGACAGCCGCATCTTCTTGT            Reverse CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT</p>
<p><b><i>S100B</i></b>            Forward TTCAGGGAGAGAGGGTGACAA            Reverse CTTCTGCTCTTTGATTTCCTCC</p>
<p><b><i>BCL-2</i></b>            Forward: CAGCATGCGACCTCTGTTTG            Reverse: CAGGTATGCACCCAGAGTGA</p>

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 11 - Ensaio qPCR.



Fonte: Elaborada pela autora.

### **4.3. Análise estatística**

Todos os resultados quantitativos foram expressos como média aritmética  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A análise estatística dos dados foi realizada por meio do software GraphPad Prism, versão 9,0. Para a realização da análise estatística entre os grupos foram utilizados os seguintes testes: Teste T de Student não pareado para a comparação de dois grupos; teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey para comparar mais de dois grupos. O nível de significância adotado foi de 0,05 ( $\alpha = 5\%$ ) e níveis descritivos (p) inferiores a esse valor foram considerados significantes.

## 5. RESULTADOS

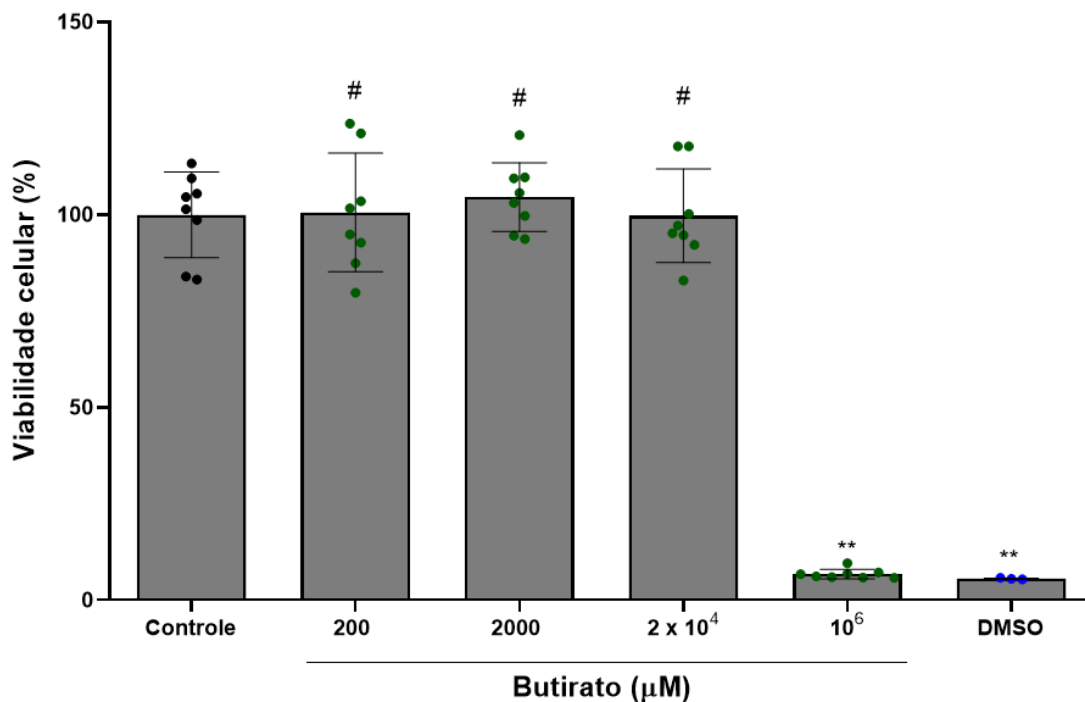
### 5.1. Viabilidade de CGEs expostas ao butirato *in vitro*

Para identificar as melhores concentrações de butirato, foi avaliada a viabilidade de CGEs expostas a diferentes concentrações desse AGCC (200, 2000,  $2 \times 10^4$ ,  $10^6$   $\mu\text{M}$ ) por 24h de incubação por meio do ensaio de MTT.

A partir do ensaio de MTT constatou-se que o butirato nas concentrações de 200, 2000,  $2 \times 10^4$   $\mu\text{M}$  não alteram a viabilidade da CGE. Enquanto que o butirato na concentração de  $10^6$   $\mu\text{M}$ , que apresenta viabilidade semelhante ao grupo DMSO, diminui drasticamente a viabilidade das CGEs comparado ao grupo controle ( $P < 0,0001$ , Figura 12).

Posteriormente foram utilizadas concentrações iguais e inferiores a  $2 \times 10^4$   $\mu\text{M}$  (a saber, 0,2, 2, 20, 400,  $4 \times 10^3$ ,  $10^4$   $\mu\text{M}$ ) para os ensaios seguintes do presente estudo.

Figura 12 - Efeito do butirato na viabilidade de CGEs *in vitro*.



Ensaio de viabilidade celular realizado em CGEs incubadas com butirato (200, 2000,  $2 \times 10^4$ ,  $10^6$   $\mu\text{M}$ ), apenas com meio (grupo controle) ou com DMSO (grupo controle de morte) por 24h. 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. Onde \*\*  $P < 0,0001$ , versus grupo controle e #  $P < 0,0001$ , versus grupo DMSO.

## 5.2. Efeito do butirato na ligação da fosfatidilserina com anexina V em CGEs desafiadas pelas TcdA e TcdB *in vitro*

O ensaio de FS-anexina V foi utilizado para avaliar se o butirato previne a morte de CGEs induzidas pelas toxinas do *C. difficile*.

Na figura 13A, observou-se que altas concentrações de butirato ( $4 \times 10^3 \mu\text{M}$  e  $10^3 \mu\text{M}$ ) promovem morte de CGEs conforme observado pelo aumento da ligação de FS-anexina V quando comparado ao grupo controle ( $P < 0,0001$ ). Enquanto que o butirato em concentrações menores que  $400 \mu\text{M}$  são semelhantes ao grupo controle.

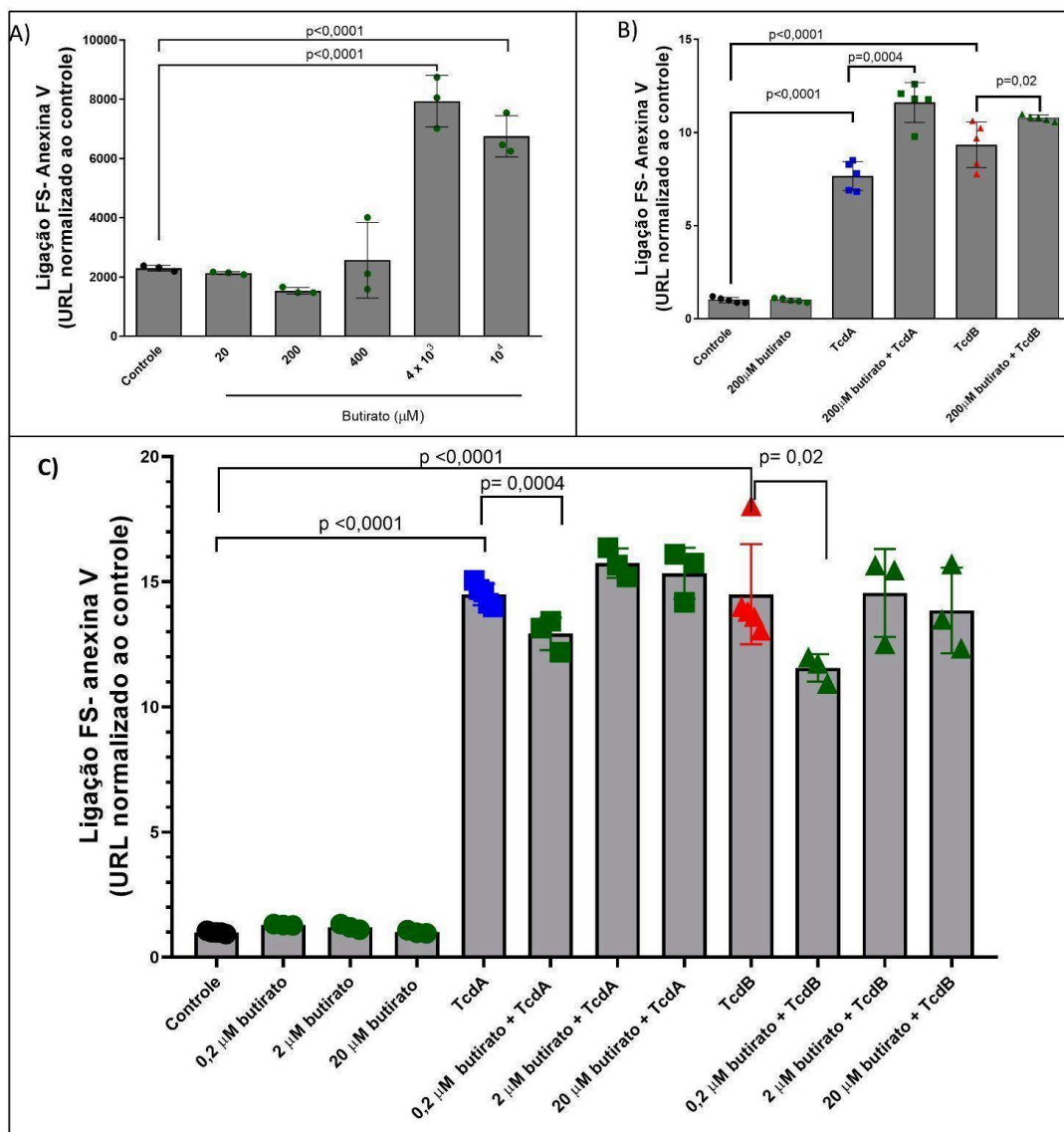
Conforme observado na figura 13B, as toxinas do *C. difficile* aumentaram a ligação de FS-anexina V em CGEs comparado ao grupo controle, sugerindo aumento de morte celular ( $P < 0,0001$ ). Enquanto que o butirato na concentração de  $200 \mu\text{M}$  potencializou o efeito apoptótico das toxinas do *C. difficile* em CGEs ( TcdA:  $p = 0,0001$ , TcdB:  $p = 0,01$ , figura 13B).

Ao verificar outras concentrações de butirato, observou-se que apenas a concentração de  $0,2 \mu\text{M}$  de butirato reduziu parcialmente a morte de CGEs induzidas pelas toxinas do *C. difficile* (TcdA:  $p = 0,0004$ , TcdB:  $p = 0,02$ , figura 13C).

Esses dados em conjunto mostram que o butirato, a depender da concentração, diminui a morte de CGEs induzidas pelas toxinas do *C. difficile*.



Figura 13 - O efeito do butirato na ligação de fosfatidilserina com anexina V em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB *in vitro*.



(A,B,C) A ligação de fosfatidilserina (FS)-anexina V, um marcador de morte celular, foi avaliada por meio do ensaio de ligação FS-anexina V em tempo real em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB, previamente incubadas ou não com butirato, por 18h. O grupo controle são CGEs incubadas apenas com meio de cultivo. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM ( $n=5$ ). A unidade relativa de luminescência (URL) é proporcional à quantidade de ligação FS-anexina V. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Tukey, onde o valor de  $p$  encontra-se representado no gráfico.

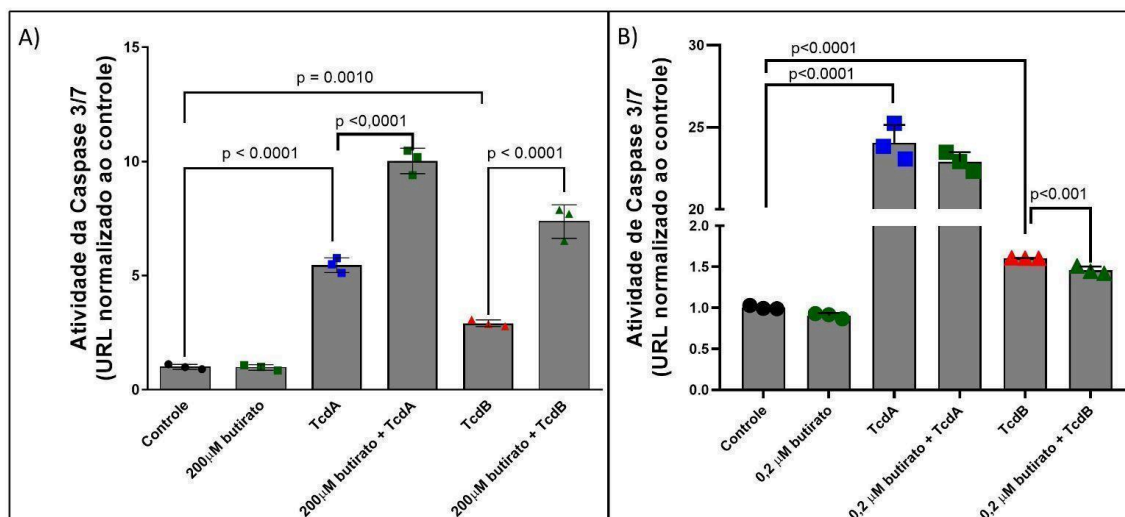
### 5.3. Efeito do butirato na atividade de caspase 3/7 induzidas por TcdA e TcdB *in vitro*

Caspases 3/7 são enzimas que possuem estruturas semelhantes e são utilizadas amplamente como marcadores apoptóticos por fazerem parte do grupo de caspases efetoras (LAKHANI et al., 2006). Com o objetivo de verificar se butirato reduz a morte de CGEs induzidas pelas toxinas do *C. difficile* via caspase 3/7, avaliou-se a atividade destas caspases.

As toxinas do *C. difficile* aumentam a atividade de caspase 3/7 quando comparado ao grupo controle (Figura 14A,  $P < 0.0001$ ). Enquanto o butirato na concentração de 200  $\mu\text{M}$  aumentou a atividade da caspase 3/7 induzida pelas TcdA e TcdB (Figura 14A,  $P < 0.0001$ ).

Ao verificar a concentração de butirato 0,2  $\mu\text{M}$  que diminuiu a morte de CGEs induzidas pelas toxinas do *C. difficile*, observou-se que CGEs expostas a TcdB, mas não TcdA, e pré-tratadas com butirato na concentração de 0,2  $\mu\text{M}$  apresentaram níveis de atividade de caspase 3/7 inferior às CGEs não pré-tratadas e expostas às toxinas do *C. difficile* (Figura 14B,  $P < 0.001$ ).

Figura 14 - Efeito do butirato na atividade da caspase 3/7 induzidas por toxinas de *C. difficile* em CGEs.



(A e B) A atividade de caspase 3/7 em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB, previamente incubadas ou não com butirato, por 18h. O grupo controle são CGEs incubadas apenas com meio de cultivo. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Tukey, onde o valor de  $p$  encontra-se representado no gráfico.

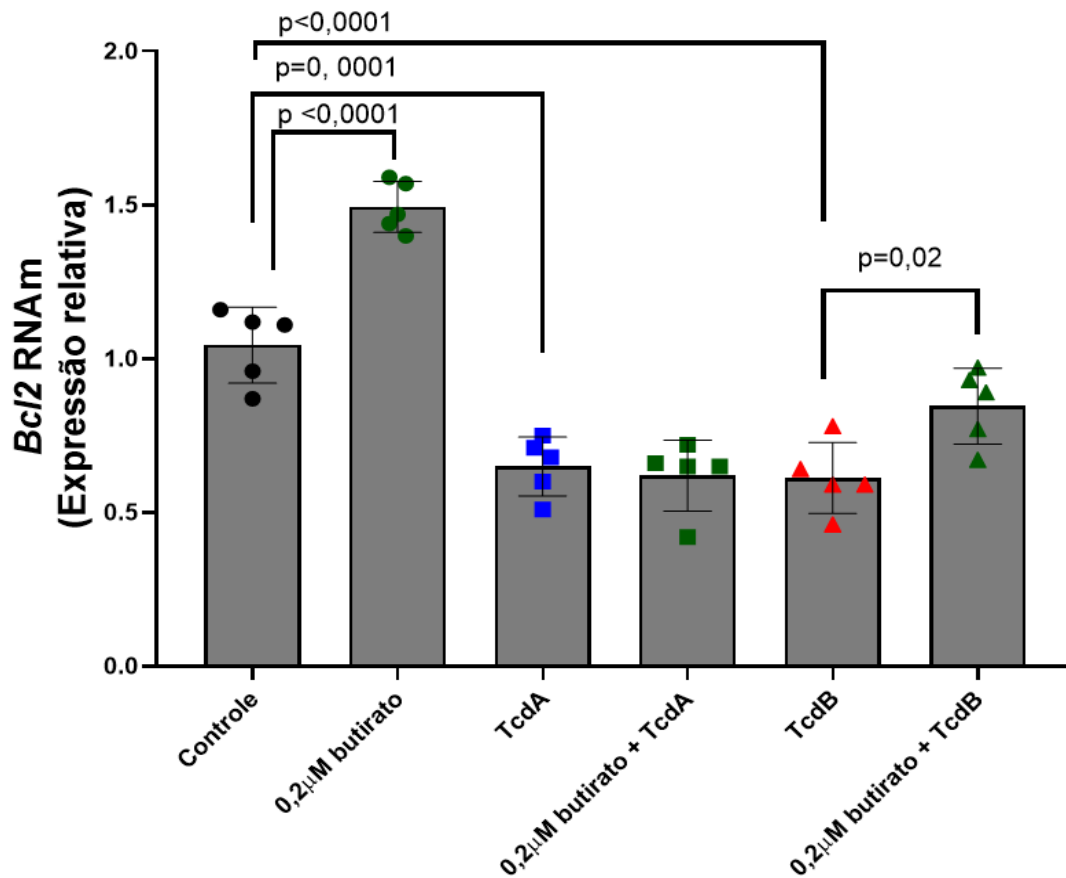
#### 5.4. Efeito do butirato na expressão de *Bcl-2* em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB *in vitro*

A proteína *Bcl-2* tem função antiapoptótica, faz parte da família de proteínas indutoras e repressoras de morte por apoptose (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). Para melhor entendermos se o butirato exerce sua função antiapoptótica via regulação da expressão gênica de *Bcl-2* em CGEs desafiadas pelas toxinas do *C. difficile*, realizou-se a avaliação da expressão relativa para esse gene.

De acordo com a figura 17, observa-se que a concentração de butirato (0,2  $\mu$ M) sozinha aumentou significativamente a atividade de *Bcl-2* quando comparado ao grupo controle ( $P < 0,0001$ ). Por outro lado, as toxinas TcdA e TcdB apresentaram uma redução significativa na atividade de *Bcl-2* quando comparado ao grupo controle (TcdA,  $P = 0,0001$ ; TcdB,  $P < 0,0001$ , Figura 17). Em adição, o butirato (0,2  $\mu$ M) aumentou a expressão gênica de *Bcl-2* em CGEs desafiadas com TcdB ( $P = 0,02$ , Figura 17).

Esses resultados sugerem que o butirato possui atividade antiapoptótica por promover a expressão de *Bcl-2* em CGEs expostas a TcdB.

Figura 15 - Efeito do butirato na atividade da expressão gênica de *Bcl-2* em CGEs expostas às toxinas do *C. difficile*.



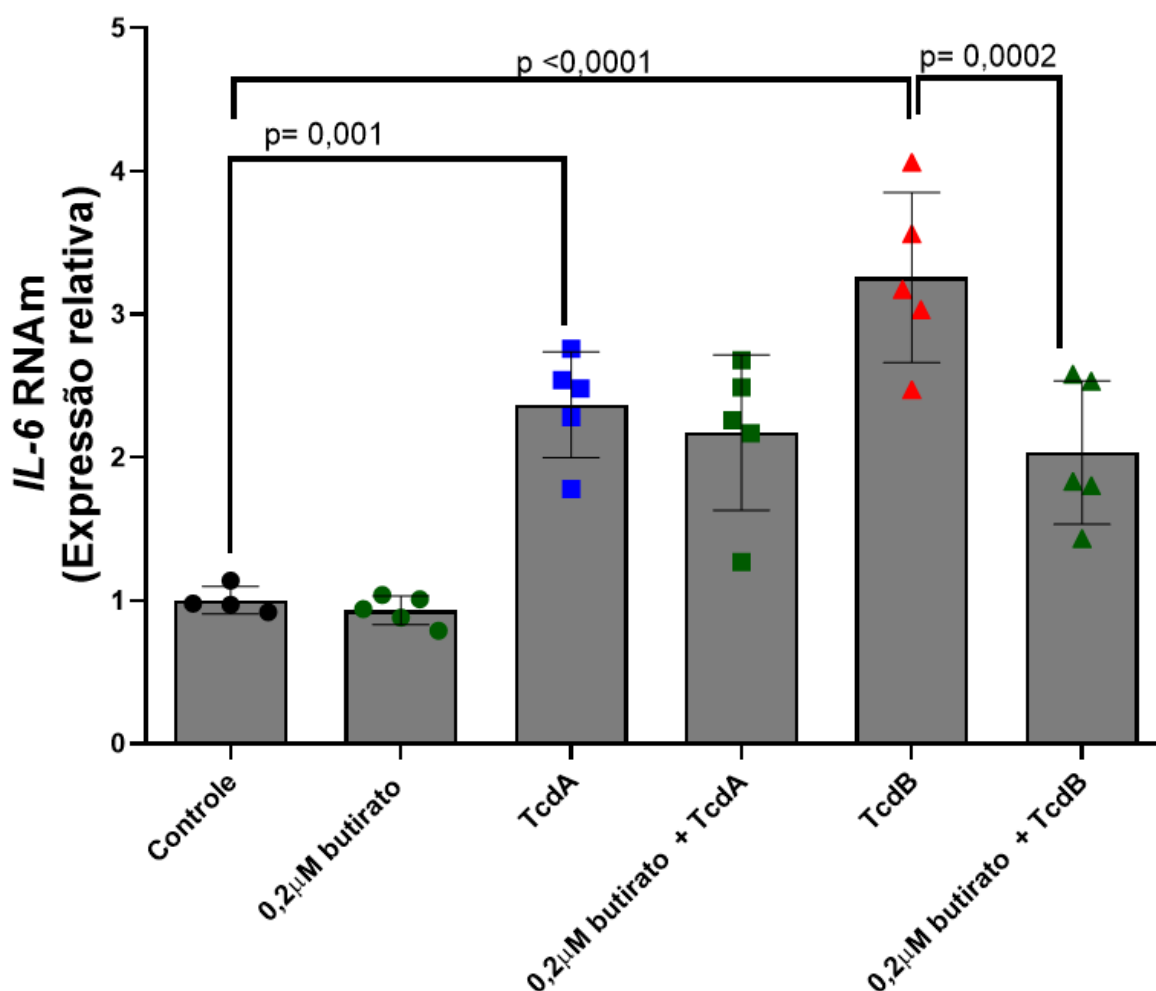
Expressão gênica de *Bcl-2* foi avaliada por qPCR em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB, previamente incubadas ou não com butirato (0,2 μM) por 18h. O grupo controle são CGEs incubadas apenas com meio de cultivo. Os dados são apresentados como média ± EPM (n=5). Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Tukey, onde o valor de *p* encontra-se representado no gráfico.

### 5.5. Efeito do butirato na expressão de *IL-6* e *S100B* em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB *in vitro*

Sendo as CGEs uma importante fonte de *IL-6* (COSTA, 2019), investigou-se o efeito do butirato na expressão gênica dessa citocina pleiotrópica nessas células desafiadas por TcdA e TcdB.

Na figura 16, observa-se que TcdA e TcdB aumentaram a expressão gênica de *IL-6* em CGEs quando comparado ao grupo controle (TcdA  $P=0,001$ ; TcdB  $P<0,0001$ ). Enquanto que o butirato diminuiu a expressão dessa citocina em CGEs expostas a TcdB, mas não TcdA ( $P=0,0002$ , figura 16).

Figura 16 - Efeitos do butirato na expressão gênica de *IL-6* induzidas por toxinas do *C. difficile* em CGEs.



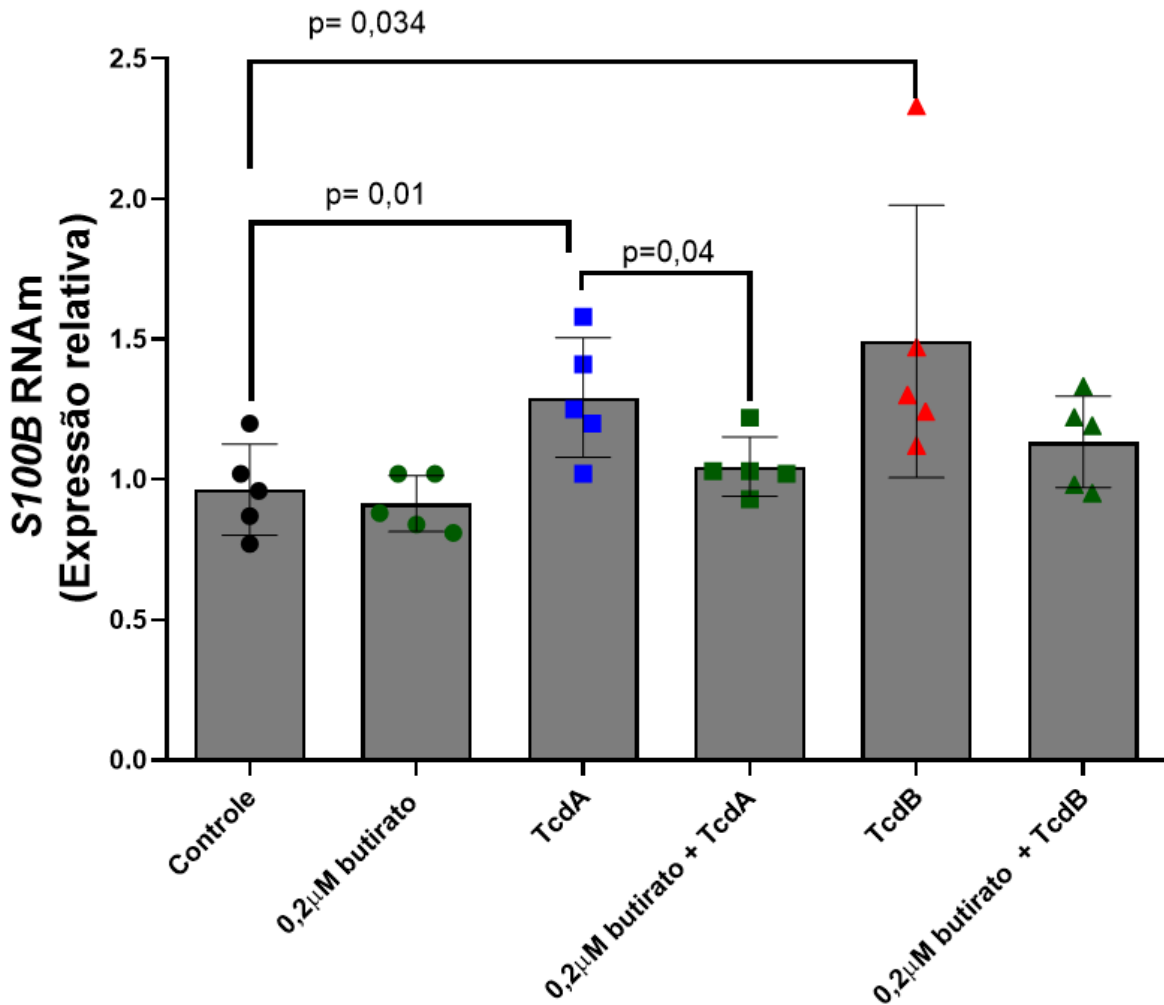
Expressão gênica de *IL-6* foi avaliada por qPCR em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB, previamente incubadas ou não com butirato por 18h. O grupo controle são CGEs incubadas apenas com meio de cultivo. Os dados são apresentados como média ± EPM (n=5). Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Tukey, onde o valor de  $p$  encontra-se representado no gráfico.

*S100B* é produzido principalmente por CGEs no intestino e quando liberado em elevadas concentrações no meio extracelular pode atuar como citocina pró-inflamatória (COSTA et al., 2019). Diante disso, investigou-se se o butirato poderia reduzir a expressão de *S100B* induzida pelas TcdA e TcdB em CGEs.

Na figura 19 observa-se que a TcdA e TcdB aumentaram a expressão gênica de *S100B* em CGEs quando comparado ao grupo controle (TcdA  $p=0,01$ ; TcdB  $p=0,034$ ). Em adição, foi observado que o butirato diminuiu a expressão dessa citocina em CGEs expostas a TcdA, mas não TcdB (TcdA  $P=0,04$ , figura 17).

Estes resultados sugerem que o butirato modula a expressão desses mediadores inflamatórios em CGEs desafiadas pelas toxinas do *C. difficile*.

Figura 17 - Efeitos do butirato na expressão gênica de *S100B* induzidas por toxinas do *C. difficile* em CGEs.



Expressão gênica de *S100B* foi avaliada por qPCR em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB, previamente incubadas ou não com butirato por 18h. O grupo controle são CGEs incubadas apenas com meio de cultivo. Os

dados são apresentados como média  $\pm$  EPM (n=5). Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Tukey, onde o valor de  $p$  encontra-se representado no gráfico.

## 6. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo revelaram que, em baixa concentração (0,2  $\mu$ M), o butirato possui atividade antiapoptótica por promover redução da ativação de caspase 3/7 e aumento da expressão de *Bcl-2* em CGEs expostas a TcdB. Enquanto o butirato em alta concentração (200  $\mu$ M) potencializou o efeito apoptótico das toxinas do *C. difficile* em CGEs. Estes achados sugerem que o butirato apresentou efeito dual nas CGEs desafiadas pelas toxinas do *C. difficile*. Além disso, evidenciou-se que o butirato em menor concentração (0,2  $\mu$ M) modula a expressão de mediadores pró-inflamatórios (*IL-6* e *SI00B*) em CGEs desafiadas pelas toxinas do *C. difficile*.

Os achados do presente estudo também mostraram que a CGE é drasticamente afetada pelas toxinas do *C. difficile*, as quais induzem morte celular e estimulam a expressão de citocinas pró-inflamatórias (*SI00B* e *IL-6*), assim como também evidenciado por estudos prévios (COSTA, 2019; COSTA et al., 2021; FETTUCIARI et al., 2017, 2018; MACCHIONI et al. 2017; VON BOYEN et al., 2011).

O butirato, um AGCC produzido pela microbiota, está associado a efeitos benéficos na barreira epitelial intestinal (DALILE et al., 2019). A redução do butirato no intestino está associada com inflamação local e agravamento da disbiose, bem como contribui para alterações na função da barreira epitelial intestinal (CHEAN, 2020). Um estudo em humanos mostrou que pacientes infectados por *C. difficile* apresentaram redução nas concentrações de butirato nas fezes comparado aos pacientes negativos para esse patógeno (NAGPAL et al., 2018). Na ICD experimental foi demonstrado que o pré-tratamento com butirato reduz a susceptibilidade de camundongos à infecção sugerindo dessa forma um efeito protetor via ativação do fator de transcrição HIF1 em células epiteliais intestinais por promover aumento da expressão das proteínas das junções firmes (FACHI et al., 2019). Fachi et al (2019) também mostrou que o efeito protetor do butirato não ocorre via efeito direto no patógeno, uma vez que o pré-tratamento com o butirato não influenciou no crescimento do *C. difficile* e produção de toxinas. Embora existam essas evidências sobre o efeito protetor do butirato na ICD, até o desenvolvimento do presente estudo não era conhecido como esse AGCC modulava a resposta da CGE às toxinas do *C. difficile*.

No presente estudo, as concentrações de butirato finais utilizadas (0,2 e 200  $\mu$ M) nas análises *in vitro* em CGEs desafiadas pelas toxinas do *C. difficile* foram inferiores as

apresentadas por estudos prévios, aos quais utilizaram concentrações finais entre 0,2 mM e 20 mM (QIU *et al.*, 2011, KAISAR *et al.*, 2017; WEBER; KERR, 2006; SEGAIN *et al.*, 2000; PENG *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2020; DYER *et al.*, 2005). No entanto, no estudo realizado por Fachi *et al.* (2019) em linhagem de células epiteliais intestinais (HCT116) desafiadas pelas toxinas do *C. difficile*, as concentrações de butirato utilizadas foram de 1 e 10  $\mu$ M. Estas concentrações se assemelham as utilizadas no nosso estudo, uma vez que a forma de desafio utilizada foi similar. Diferentemente, os outros estudos utilizaram LPS como forma de desafio ou investigaram o efeito do butirato em condições fisiológicas (QIU *et al.*, 2011, KAISAR *et al.*, 2017; WEBER; KERR, 2006; SEGAIN *et al.*, 2000; PENG *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2020; DYER *et al.*, 2005). O uso de concentrações de butirato em células desafiadas pelas toxinas do *C. difficile* inferiores a outros estudos sugere a possível interface entre as vias de sinalização do butirato e essas toxinas.

Um importante achado deste estudo foi o efeito dual do butirato na morte de CGE induzida pelas toxinas do *C. difficile* diminuindo e potencializando esse processo em baixas (0,2  $\mu$ M) e altas concentrações (200  $\mu$ M) respectivamente. De forma semelhante, Peng *et al.* (2007) evidenciaram que o butirato em altas concentrações (8mM) induz apoptose de células epiteliais intestinais (Caco-2). Por outro lado, nesse mesmo estudo o butirato em baixas concentrações (2mM) não promoveu apoptose e apresentou um potencial benéfico na função da barreira epitelial intestinal. Estudo anterior também mostrou que o butirato nas concentrações acima de 0,5 mM promove morte de células tumorais (DYSON; DANIEL; SURREY, 1992). Além disso, o butirato promoveu apoptose de células epiteliais intestinais, macrófagos e células T de camundongos (BAILÓN *et al.*, 2010). No entanto, os nossos dados apontam que na presença das toxinas do *C. difficile* é requerido concentrações inferiores de butirato (200  $\mu$ M) das utilizadas em estudos prévios para promover morte de CGEs.

Um dos mecanismos identificados no presente estudo pelo qual o butirato diminuiu a morte de CGEs induzidas por TcdB envolveu a participação de caspase 3/7 e *Bcl2*. Similarmente, o butirato, previamente, diminuiu a morte de células epiteliais intestinais (HCT116) expostas ao sobrenadante do *C. difficile* (Fachi *et al.*, 2019). A participação das caspases 3/7 na apoptose desencadeada pelas toxinas TcdA e TcdB foi previamente documentada em estudos anteriores (FETTUCCIARI *et al.*, 2017; FETTUCCIARI *et al.*, 2022; COSTA, 2019; COSTA *et al.*, 2021). As caspases 3/7 são as caspases efetoras as quais promovem a fragmentação do DNA culminando em morte celular (HOUDE *et al.*, 2004; JANICKE *et al.*, 1998; MCILWAIN *et al.*, 2013; SINGH *et al.*, 2019). Essas caspases podem ser



ativadas pelas caspases iniciadoras (caspase 8 e 9), as quais encontram-se aumentadas em CGEs desafiadas pelas toxinas do *C. difficile* (FETTUCCIARI *et al.*, 2022). O fator antiapoptótico Bcl2 tem papel fundamental em inibir a atividade de BAX, que por sua vez promove a liberação de citocromo C da mitocôndria ativando as caspases iniciadoras e efetoras (QIAN *et al.*, 2022).

Há outros mecanismos envolvidos no efeito antiapoptótico do butirato. Por exemplo, Li *et al.* (2019) demonstrou que o butirato atenuou a apoptose de MAC-T induzidas por LPS via redução de ROS por aumentar os níveis antioxidantes, incluindo superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase. Estudos anteriores em CGEs mostrou que ROS está envolvida na morte celular induzida por TcdB (MACCHIONI *et al.*, 2017). No presente estudo, o efeito do butirato na prevenção da morte de CGEs induzidas pelas toxinas do *C. difficile* ocorreu de forma parcial sugerindo, dessa forma, que outros mediadores podem ser cruciais nesse processo.

Em relação aos efeitos do butirato na modulação da resposta pró-inflamatória, o presente estudo mostrou que o butirato modula negativamente a expressão de importantes mediadores inflamatórios (*S100B* e *IL-6*) em CGEs desafiadas pelas toxinas do *C. difficile*.

As CGEs secretam S100B em condições normais (RAO *et al.*, 2015; COSTA *et al.*, 2021). As toxinas do *C. difficile* (TcdA e TcdB) aumentam a síntese de S100B em CGEs, *in vitro* e durante a ICD no colón de humanos e camundongos (COSTA *et al.*, 2021). Em um estudo anterior do nosso grupo foi mostrado que a inibição de S100B reduz tanto a expressão de *IL-6* como a própria expressão de S100B induzido pelas toxinas do *C. difficile* nas CGEs (COSTA *et al.*, 2021). Na ICD experimental, o S100B liberado pela CGE em resposta às toxinas do *C. difficile* modula a resposta inflamatória na fase aguda da doença (COSTA *et al.*, 2021a). Nesse cenário, o S100B, durante a inflamação causada pela ICD, ativa a via de sinalização S100B/RAGE/NFκB resultando no aumento da expressão gênica de diversos mediadores inflamatórios como iNOS, *IL-6* e TNF-α (COSTA *et al.*, 2021). Tendo em vista que o S100B é um mediador importante para induzir resposta pró-inflamatória durante a ICD, os resultados do nosso estudo *in vitro* apontam que o butirato atua como um importante regulador negativo da expressão dessa citocina induzida pela TcdA em CGEs.

Concomitantemente, o butirato também atua como um importante regulador negativo da expressão de *IL-6* em CGEs desafiadas pela TcdB. Similarmente, um estudo *in vitro* mostrou o efeito imunomodulatório do butirato em macrófagos intestinais (CHANG *et al.*, 2014), onde o butirato (500 μM) reduziu a expressão gênica de *IL-6* induzido por LPS via inibição de HDAC (histonas desacetilases). Em modelo murino de lesão pulmonar aguda

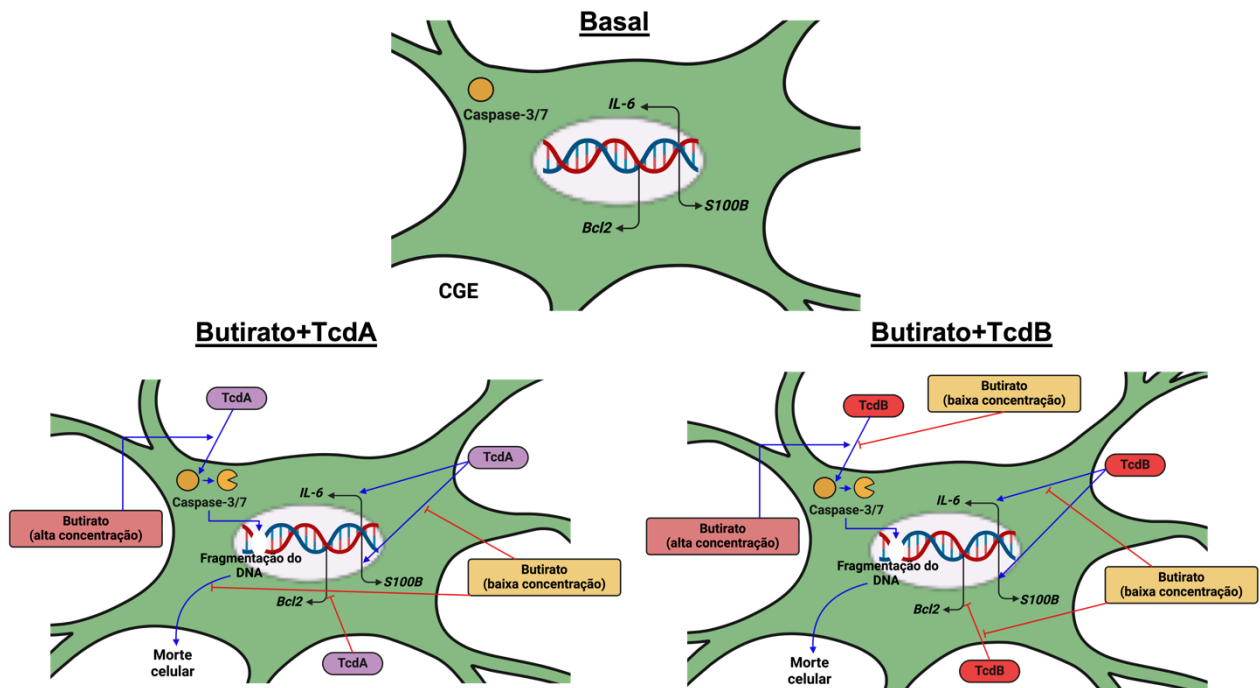
(LPA) induzida por LPS, o butirato (500mg/kg) também reduziu os níveis de IL-6 no lavado broncoalveolar (LI et al., 2018). O pré-tratamento com butirato de sódio mostrou também ser benéfico na redução da infiltração de células inflamatórias, o qual foi acompanhado pela diminuição da ativação de NFκB no tecido pulmonar de camundongos (LI et al., 2018). Esses estudos em conjunto com os nossos achados mostram o potencial efeito do butirato na expressão de *IL-6*, que é considerada um importante marcador da gravidade da ICD (MURAKAMI; KAMIMURA; HIRANO, 2019).

A IL-6, o membro mais conhecido da família da IL-6, é uma citocina pleiotrópica por apresentar atividade anti-inflamatória e pró-inflamatória (ABHYANKAR et al., 2020; KAUR et al., 2020). As funções regenerativas e anti-inflamatórias da IL-6 são mediadas pela via de sinalização clássica que ocorre por meio da sua ligação ao receptor de IL-6Rα e gp130, aos quais são expressos na membrana plasmática das células alvo. Essa ligação induz a ativação de diversas vias intracelulares como JAK1, STAT1 e STAT3. Enquanto a atividade pró-inflamatória da IL-6 ocorre por meio de um processo denominado via de trans sinalização. Nesse processo, a IL-6 se liga a forma solúvel do receptor IL-6Rα, ao qual se ligará ao gp130 expresso na célula alvo que está relacionado com a atividade pró-inflamatória da IL-6 (METCALFE; PUTOCZKI; GRIFFIN, 2020).

Um estudo *in vivo* realizado em camundongos mostrou que a síntese contínua de IL-6 por astrócitos resultou em ativação de micróglia e aumento da produção de mediadores pró-inflamatórios (RECASENS et al., 2021). Enquanto em modelo animal de lesão aguda pulmonar em camundongos, a deficiência de IL-6 causou intensa inflamação broncoalveolar, sugerindo importante atividade anti-inflamatória dessa citocina nesse modelo (VOIRIOT et al., 2017). Mais estudos são necessários para melhor entendermos os benefícios de reduzir a síntese de IL-6 em CGEs durante a ICD.

Em resumo o butirato tem efeito dual em CGEs desafiadas pelas toxinas do *C. difficile*. Enquanto atua como potencializador da morte celular induzida por essas toxinas em alta concentração (200 μM), em baixa concentração (0,2 μM) age como protetor contra a morte celular induzida por essas toxinas. O mecanismo antiapoptótico do butirato em CGEs desafiadas pela TcdB envolve a redução da clivagem das caspases 3 e 7, bem como aumento da expressão de *Bcl2*. Em adição, o butirato em menores concentrações também demonstrou capacidade para modular a expressão gênica de mediadores pró-inflamatórios, como *S100B* e *IL-6* em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB respectivamente (Figura 18).

Figura 18 – Modelo hipotético de como o butirato modula a resposta da CGE desafiadas pelas toxinas do *C. difficile*.



Em estado basal, as CGEs apresentam a forma inativa de caspase 3/7, bem como expressam *IL-6*, *S100B* e *Bcl2*. TcdA e TcdB promovem a formação de caspase 3 e 7 clivadas que por sua vez induzem a fragmentação do DNA culminando em morte celular. Essas toxinas regulam positivamente a expressão gênica de *IL-6* e *S100B*, bem como regula negativamente a expressão de *bcl2*. Suplementação com butirato diminui morte celular e a expressão de *S100B* em CGEs desafiadas pela TcdA. Ao passo que a adição desse SCFA em CGEs desafiadas com TcdB reduziu a expressão de *IL-6*, bem como diminuiu morte celular via redução da atividade de caspase 3/7 e aumento da expressão de *Bcl2*.

## 7. CONCLUSÃO

Com base nos achados deste estudo, podemos concluir que o butirato tem efeito duplo: Em altas concentrações (200  $\mu\text{M}$ ) potencializa a atividade apoptótica das toxinas do *C. difficile* em CGEs. Em baixa concentração (0,2  $\mu\text{M}$ ) protege contra morte celular induzidas pelas toxinas do *C. difficile* por promover redução da ativação de caspase 3/7 e aumento da expressão de *Bcl-2* em CGEs expostas a TcdB. A atividade antiapoptótica do butirato em menores concentrações nas CGEs desafiadas pela TcdA não ocorre via modulação da atividade de caspase 3/7 e expressão de *Bcl-2*.

O butirato em menores concentrações modula a expressão de mediadores pró-inflamatórios (*IL-6* e *S100B*) em CGEs desafiadas pelas toxinas do *C. difficile*.

Os achados desse estudo mostraram como um importante produto da microbiota, o butirato, modula a resposta da CGE as toxinas do *C. difficile*, apontando que os efeitos protetores observados por estudo prévio em modelo murino de ICD ocorrem parcialmente via modulação da resposta dessas células.

Mais estudos são necessários para melhor entender: (1) como o pré-tratamento com altas e baixas doses de butirato podem implicar no desfecho na ICD em modelo pré-clínico; (2) Como a modulação de células epiteliais intestinais ou células do sistema imune (como macrófagos) pelo butirato podem implicar na resposta das CGEs as toxinas do *C. difficile*.

## 8. REFERÊNCIAS

ABHYANKAR, M. M.; MA, J. Z.; SCULLY, K. W.; NAFZIGER, A. J.; FRISBEE, A. L.; SALEH, M. M.; MADDEN, G. R.; HAYS, A. R.; POULTER, M.; PETRI JR, W. A. Immune profiling to predict outcome of *Clostridioides difficile* infection. **MBio**, v. 11, n. 3, p. 10–1128, 2020.

ARPAIA, N.; CAMPBELL, C.; FAN, X.; DIKIY, S.; VAN DER VEEKEN, J.; DEROOS, P.; LIU, H.; CROSS, J. R.; PFEFFER, K.; COFFER, P. J.; RUDENSKY, A. Y. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T cell generation. **Nature**, v.504, p.451-455, 2013.

BAGHDADI, M. B.; AYYAZ, A.; COQUENLORGE, S.; CHU, B.; KUMAR, S.; STREUTKER, C.; WRANA, J. L.; KIM, T.-H. Enteric glial cell heterogeneity regulates intestinal stem cell niches. **Cell Stem Cell**, v. 29, n. 1, p. 86- 100.e6, 2022.

BAILÓN, E.; CUETO-SOLA, M.; UTRILLA, P.; RODRÍGUEZ-CABEZAS, M. E.; GARRIDO-MESA, N.; ZARZUELO, A.; XAUS, J.; GÁLVEZ, J.; COMALADA, M. Butyrate in vitro immune-modulatory effects might be mediated through a proliferation-related induction of apoptosis. **Immunobiology**, v. 215, n. 11, p. 863–873, 2010.

BELKIND-GERSON, J.; GRAHAM, H. K.; REYNOLDS, J.; HOTTA, R.; NAGY, N.; CHENG, L.; KAMIONEK, M.; SHI, H. N.; AHERNE, C. M.; GOLDSTEIN, A. M. Colitis promotes neuronal differentiation of Sox2+ and PLP1+ enteric cells. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 2525, 2017.

BOESMANS, W.; LASRADO, R.; VANDEN BERGHE, P.; PACHNIS, V. Heterogeneity and phenotypic plasticity of glial cells in the mammalian enteric nervous system. **Glia**, v. 63, n. 2, p. 229–241, 2015.

BRICKER, E.; GARG, R.; NELSON, R. L.; LOZA, A.; NOVAK, T.; HANSEN, J. Antibiotic treatment for *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 4, 2003.

CAO, M.; ZHANG, Z.; HAN, S.; LU, X. Butyrate inhibits the proliferation and induces the apoptosis of colorectal cancer HCT116 cells via the deactivation of mTOR/S6K1 signaling mediated partly by SIRT1 downregulation. **Molecular Medicine Reports**, v. 19, n. 5, p. 3941–3947, 2019.

CARRETTA, M. D.; QUIROGA, J.; LÓPEZ, R.; HIDALGO, M. A.; BURGOS, R. A. Participation of Short-Chain Fatty Acids and Their Receptors in Gut Inflammation and Colon Cancer. **Frontiers in Physiology**, v. 12, p. 662739, 2021.

CDC. **Antibiotic resistance threats in the United States, 2019**. U. S. Department of Health and Human, , 2019. Disponível em: <<https://cir.nii.ac.jp/crid/1363107368650359296>>. Acesso em: 7 out. 2023.

CHANDRASEKARAN, R.; LACY, D. B. The role of toxins in *Clostridium difficile* infection. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 6, p. 723–750, 2017.

CHANG, P. V.; HAO, L.; OFFERMANN, S.; MEDZHITOV, R. The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 6, p. 2247–2252, 2014.

CHEN, W.; ZHANG, S.; WU, J.; YE, T.; WANG, S.; WANG, P.; XING, D. Butyrate-producing bacteria and the gut-heart axis in atherosclerosis. **Clinica Chimica Acta**, v. 507, p. 236–241, 2020.

CHOW, K.-C.; CHIOU, S.-H.; HO, S.-P.; TSAI, M.-H.; CHEN, C.-L.; WANG, L.-S.; CHI, K.-H. The elevated serum interleukin-6 correlates with the increased serum butyrate level in patients with nasopharyngeal carcinoma. **Oncology Reports**, v. 10, n. 4, p. 813–819, 2003.

CONG, J.; ZHOU, P.; ZHANG, R. Intestinal Microbiota-Derived Short Chain Fatty Acids in Host Health and Disease. **Nutrients**, v. 14, n. 9, p. 1977, 2022.

COSTA, D. V. da S. **Papel da via de sinalização S100B/RAGE na apoptose e gliose reativa induzida pelas toxinas A e B do *Clostridioides difficile* em células gliais entéricas.** 2019. Tese de Doutorado - UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, FORTALEZA, 2019.

COSTA, D. V. S.; MOURA-NETO, V.; BOLICK, D. T.; GUERRANT, R. L.; FAWAD, J. A.; SHIN, J. H.; MEDEIROS, P. H. Q. S.; LEDWABA, S. E.; KOLLING, G. L.; MARTINS, C. S.; VENKATARAMAN, V.; WARREN, C. A.; BRITO, G. A. C. S100B Inhibition Attenuates Intestinal Damage and Diarrhea Severity During *Clostridioides difficile* Infection by Modulating Inflammatory Response. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 2021. a.

COSTA, D. V. S.; MOURA-NETO, V.; BOLICK, D. T.; GUERRANT, R. L.; FAWAD, J. A.; SHIN, J. H.; MEDEIROS, P. H. Q. S.; LEDWABA, S. E.; KOLLING, G. L.; MARTINS, C. S.; VENKATARAMAN, V.; WARREN, C. A.; BRITO, G. A. C. S100B Inhibition Attenuates Intestinal Damage and Diarrhea Severity During *Clostridioides difficile* Infection by Modulating Inflammatory Response. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 2021. b.

COSTA, D. V. S.; MOURA-NETO, V.; BOLICK, D. T.; GUERRANT, R. L.; FAWAD, J. A.; SHIN, J. H.; MEDEIROS, P. H. Q. S.; LEDWABA, S. E.; KOLLING, G. L.; MARTINS, C. S.; VENKATARAMAN, V.; WARREN, C. A.; BRITO, G. A. C. S100B Inhibition Attenuates Intestinal Damage and Diarrhea Severity During *Clostridioides difficile* Infection by Modulating Inflammatory Response. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 2021.

COSTA, M.; BROOKES, S. J. H.; HENNIG, G. W. Anatomy and physiology of the enteric nervous system. **Gut**, v. 47, n. suppl 4, p. iv15–iv19, 2000.

DALILE, B.; VAN OUDENHOVE, L.; VERVLIET, B.; VERBEKE, K. The role of short-chain fatty acids in microbiota-gut-brain communication. **Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology**, v. 16, n. 8, p. 461–478, 2019.

DAVIES, K. A.; LONGSHAW, C. M.; DAVIS, G. L.; BOUZA, E.; BARBUT, F.; BARNA, Z.; DELMÉE, M.; FITZPATRICK, F.; IVANOVA, K.; KUIJPER, E.; MACOVEI, I. S.; MENTULA, S.; MASTRANTONIO, P.; MÜLLER, L. Von; OLEASTRO, M.; PETINAKI, E.; PITUCH, H.; NORÉN, T.; NOVÁKOVÁ, E.; NYČ, O.; RUPNIK, M.; SCHMID, D.;

WILCOX, M. H. Underdiagnosis of *Clostridium difficile* across Europe: the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID). **The Lancet Infectious Diseases**, v. 14, n. 12, p. 1208–1219, 2014.

DEFRIES, D.; BELTRAN, M. Short Chain Fatty Acid Transporter/Receptor Expression and Signaling in Enteric Glial Cells. **Current Developments in Nutrition**, v. 4, n. Suppl 2, p. 1201, 2020.

DEL PRETE, R.; RONGA, L.; ADDATI, G.; MAGRONE, R.; ABBASCIANO, A.; DECIMO, M.; MIRAGLIOTTA, G. Clostridium difficile. A review on an emerging infection. **La Clinica Terapeutica**, v. 170, n. 1, p. e41–e47, 2019.

DELEU, S.; MACHIELS, K.; RAES, J.; VERBEKE, K.; VERMEIRE, S. Short chain fatty acids and its producing organisms: An overlooked therapy for IBD? **EBioMedicine**, v. 66, p. 103293, 2021.

DYSON, J.; DANIEL, J.; SURREY, C. The effect of sodium butyrate on the growth characteristics of human cervix tumour cells. **British journal of cancer**, v. 65, n. 6, p. 803–808, 1992.

FACHI, J. L.; FELIPE, J. de S.; PRAL, L. P.; DA SILVA, B. K.; CORRÊA, R. O.; DE ANDRADE, M. C. P.; DA FONSECA, D. M.; BASSO, P. J.; CÂMARA, N. O. S.; DE SALES E SOUZA, É. L.; DOS SANTOS MARTINS, F.; GUIMA, S. E. S.; THOMAS, A. M.; SETUBAL, J. C.; MAGALHÃES, Y. T.; FORTI, F. L.; CANDREVA, T.; RODRIGUES, H. G.; DE JESUS, M. B.; CONSONNI, S. R.; FARIAS, A. D. S.; VARGA-WEISZ, P.; VINOLO, M. A. R. Butyrate Protects Mice from Clostridium difficile-Induced Colitis through an HIF-1-Dependent Mechanism. **Cell Reports**, v. 27, n. 3, p. 750- 761.e7, 2019.

FACHI, J. L.; SÉCCA, C.; RODRIGUES, P. B.; MATO, F. C. P. De; DI LUCCIA, B.; FELIPE, J. de S.; PRAL, L. P.; RUNGUE, M.; ROCHA, V. de M.; SATO, F. T.; SAMPAIO, U.; CLERICI, M. T. P. S.; RODRIGUES, H. G.; CÂMARA, N. O. S.; CONSONNI, S. R.; VIEIRA, A. T.; OLIVEIRA, S. C.; MACKAY, C. R.; LAYDEN, B. T.; BORTOLUCI, K. R.; COLONNA, M.; VINOLO, M. A. R. Acetate coordinates neutrophil and ILC3 responses against *C. difficile* through FFAR2. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 217, n. 3, p. jem.20190489, 2020.



FETTUCCIARI, K.; MACCHIONI, L.; DAVIDESCU, M.; SCARPELLI, P.; PALUMBO, C.; CORAZZI, L.; MARCHEGIANI, A.; CERQUETELLA, M.; SPATERNA, A.; MARCONI, P.; BASSOTTI, G. *Clostridium difficile* toxin B induces senescence in enteric glial cells: A potential new mechanism of *Clostridium difficile* pathogenesis. **Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Cell Research**, v. 1865, n. 12, p. 1945–1958, 2018.

FETTUCCIARI, K.; MARGUERIE, F.; FRUGANTI, A.; MARCHEGIANI, A.; SPATERNA, A.; BRANCORSINI, S.; MARCONI, P.; BASSOTTI, G. 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: CMLS**, v. 79, n. 8, p. 442, 2022.

FETTUCCIARI, K.; MARGUERIE, F.; FRUGANTI, A.; MARCHEGIANI, A.; SPATERNA, A.; BRANCORSINI, S.; MARCONI, P.; BASSOTTI, G. *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**, v. 79, n. 8, p. 442, 2022.

FETTUCCIARI, K.; PONSINI, P.; GIOÈ, D.; MACCHIONI, L.; PALUMBO, C.; ANTONELLI, E.; COACCIOLI, S.; VILLANACCI, V.; CORAZZI, L.; MARCONI, P.; BASSOTTI, G. Enteric glial cells are susceptible to *Clostridium difficile* toxin B. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 74, n. 8, p. 1527–1551, 2017.

FETTUCCIARI, K.; PONSINI, P.; GIOÈ, D.; MACCHIONI, L.; PALUMBO, C.; ANTONELLI, E.; COACCIOLI, S.; VILLANACCI, V.; CORAZZI, L.; MARCONI, P.; BASSOTTI, G. Enteric glial cells are susceptible to *Clostridium difficile* toxin B. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, n. 8, p. 1527–1551, 2017.

FLEMING, M. A.; EHSAN, L.; MOORE, S. R.; LEVIN, D. E. The Enteric Nervous System and Its Emerging Role as a Therapeutic Target. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2020, p. 8024171, 2020.

FURNESS, J. B. The enteric nervous system and neurogastroenterology. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 9, n. 5, p. 286–294, 2012.

FRAMPTON, J., MURPHY, K.G., Frost, G. et al. Short-chain fatty acids as potential regulators of skeletal muscle metabolism and function. **Nature**, v. 2, p. 840–848, 2020.

GIORGIO, R. D.; GIANCOLA, F.; BOSCHETTI, E.; ABDO, H.; LARDEUX, B.; NEUNLIST, M. Enteric glia and neuroprotection: basic and clinical aspects. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 303, n. 8, p. G887–G893, 2012.

GIRÃO, E. S.; DE MELO TAVARES, B.; ALVES DOS SANTOS, S.; GAMARRA, G. L.; RIZEK, C.; MARTINS, R. C.; PERDIGÃO NETO, L. V.; DIOGO, C.; ANNIBALE ORSI, T. D.; SANCHEZ ESPINOZA, E. P.; PAZ MORALES, H. M.; DA SILVA NOGUEIRA, K.; MAESTRI, A. C.; BOSZCZOWSKI, I.; PIASTRELLI, F.; COSTA, C. L.; COSTA, D. V.; MACIEL, G.; ROMÃO, J.; GUIMARÃES, T.; ANNE DE CASTRO BRITO, G.; COSTA, S. F. Prevalence of *Clostridioides difficile* associated diarrhea in hospitalized patients in five Brazilian centers: A multicenter, prospective study. **Anaerobe**, v. 66, p. 102267, 2020.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Da. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335–343, 2007.

GRUBIŠIĆ, V.; GULBRANSEN, B. D. Enteric glia: the most alimentary of all glia. **The Journal of Physiology**, v. 595, n. 2, p. 557–570, 2017.

GUH, A. Y.; MU, Y.; WINSTON, L. G.; JOHNSTON, H.; OLSON, D.; FARLEY, M. M.; WILSON, L. E.; HOLZBAUER, S. M.; PHIPPS, E. C.; DUMYATI, G. K.; BELDAVS, Z. G.; KAINER, M. A.; KARLSSON, M.; GERDING, D. N.; MCDONALD, L. C.; EMERGING INFECTIONS PROGRAM *CLOSTRIDIOIDES DIFFICILE* INFECTION WORKING GROUP. Trends in U.S. Burden of *Clostridioides difficile* Infection and Outcomes. **The New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 14, p. 1320–1330, 2020.

HALL, I. C.; O'TOOLE, E. INTESTINAL FLORA IN NEW-BORN INFANTS: WITH A DESCRIPTION OF A NEW PATHOGENIC ANAEROBE, BACILLUS DIFFICILIS. **American Journal of Diseases of Children**, v. 49, n. 2, p. 390–402, 1935.

HE, J.; ZHANG, P.; SHEN, L.; NIU, L.; TAN, Y.; CHEN, L.; ZHAO, Y.; BAI, L.; HAO, X.; LI, X.; ZHANG, S.; ZHU, L. Short-Chain Fatty Acids and Their Association with Signalling

Pathways in Inflammation, Glucose and Lipid Metabolism. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p. 6356, 2020.

HEE, B. Van der; WELLS, J. M. Microbial Regulation of Host Physiology by Short-chain Fatty Acids. **Trends in Microbiology**, v. 29, n. 8, p. 700–712, 2021.

JIANG, Y.; XU, L.; YU, L.; XU, X.; FENG, C.; LI, J. NOX4 inhibition protects enteric glial cells against *Clostridium difficile* toxin B toxicity via attenuating oxidative and Endoplasmic reticulum stresses. **Free Radical Research**, v. 53, n. 8, p. 932–940, 2019.

JIN, K.; WANG, S.; HUANG, Z.; LU, S. *Clostridium difficile* infections in China. **Journal of Biomedical Research**, v. 24, n. 6, p. 411–416, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3596688/>>. Acesso em: 7 out. 2023.

KHURANA, S.; KAHL, A.; YU, K.; DUPONT, A. W. Recent advances in the treatment of *Clostridioides difficile* infection: the ever-changing guidelines. **Faculty Reviews**, v. 9, p. 13, 2020.

LAKE, J. I.; HEUCKEROTH, R. O. Enteric nervous system development: migration, differentiation, and disease. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 305, n. 1, p. G1-24, 2013.

LI, L.; WANG, H.-H.; NIE, X.-T.; JIANG, W.-R.; ZHANG, Y.-S. Sodium butyrate ameliorates lipopolysaccharide-induced cow mammary epithelial cells from oxidative stress damage and apoptosis. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 2, p. 2370–2381, 2019.

LIU, C.; YANG, J. Enteric Glial Cells in Immunological Disorders of the Gut. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 16, p. 895871, 2022.

LOUREIRO, A. V.; MOURA-NETO, L. I.; MARTINS, C. S.; SILVA, P. I. M.; LOPES, M. B. S.; LEITÃO, R. F. C.; COELHO-AGUIAR, J. M.; MOURA-NETO, V.; WARREN, C. A.; COSTA, D. V. S.; BRITO, G. A. C. Role of Pannexin-1-P2X7R signaling on cell death and pro-inflammatory mediator expression induced by *Clostridioides difficile* toxins in enteric glia. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 2022.

LUCKETT-CHASTAIN, L. R.; KING, C. J.; MCSHAN, W. M.; GIPSON, J. R.; GILLASPY, A. F.; GALLUCCI, R. M. Loss of interleukin-6 influences transcriptional immune signatures

and alters bacterial colonization in the skin. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 658980, 2021.

MA, J.; PIAO, X.; MAHFUZ, S.; LONG, S.; WANG, J. The interaction among gut microbes, the intestinal barrier and short chain fatty acids. **Animal Nutrition (Zhongguo Xu Mu Shou Yi Xue Hui)**, v. 9, p. 159–174, 2022.

MACCHIONI, L.; DAVIDESCU, M.; FETTUCCIARI, K.; PETRICCIUOLO, M.; GATTICCHI, L.; GIOÈ, D.; VILLANACCI, V.; BELLINI, M.; MARCONI, P.; ROBERTI, R.; BASSOTTI, G.; CORAZZI, L. Enteric glial cells counteract *Clostridium difficile* Toxin B through a NADPH oxidase/ROS/JNK/caspase-3 axis, without involving mitochondrial pathways. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 45569, 2017.

MAJIDPOOR, J.; MORTEZAEE, K. Interleukin-6 in SARS-CoV-2 induced disease: Interactions and therapeutic applications. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 145, p. 112419, 2022.

MARKIEWICZ, L. H.; OGRODOWCZYK, A. M.; WICZKOWSKI, W.; WRÓBLEWSKA, B. Phytate and Butyrate Differently Influence the Proliferation, Apoptosis and Survival Pathways in Human Cancer and Healthy Colonocytes. **Nutrients**, v. 13, n. 6, p. 1887, 2021.

MARKOWIAK-KOPEĆ, P.; ŚLIŻEWSKA, K. The Effect of Probiotics on the Production of Short-Chain Fatty Acids by Human Intestinal Microbiome. **Nutrients**, v. 12, n. 4, p. 1107, 2020.

MARTÍNEZ-MELÉNDEZ, A.; CRUZ-LÓPEZ, F.; MORFIN-OTERO, R.; MALDONADO-GARZA, H. J.; GARZA-GONZÁLEZ, E. An Update on *Clostridioides difficile* Binary Toxin. **Toxins**, v. 14, n. 5, p. 305, 2022.

MAY, T.; MACKIE, R. I.; FAHEY, G. C.; CREMIN, J. C.; GARLEB, K. A. Effect of fiber source on short-chain fatty acid production and on the growth and toxin production by *Clostridium difficile*. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 29, n. 10, p. 916–922, 1994.

METCALFE, R. D.; PUTOCZKI, T. L.; GRIFFIN, M. D. Structural understanding of interleukin 6 family cytokine signaling and targeted therapies: focus on interleukin 11. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1424, 2020.

MURAKAMI, M.; KAMIMURA, D.; HIRANO, T. Pleiotropy and specificity: insights from the interleukin 6 family of cytokines. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 812–831, 2019.

NAGPAL, R.; WANG, S.; SOLBERG WOODS, L. C.; SESHIE, O.; CHUNG, S. T.; SHIVELY, C. A.; REGISTER, T. C.; CRAFT, S.; MCCLAIN, D. A.; YADAV, H. Comparative Microbiome Signatures and Short-Chain Fatty Acids in Mouse, Rat, Non-human Primate, and Human Feces. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018.

NIBBERING, B.; GERDING, D. N.; KUIJPER, E. J.; ZWITTINK, R. D.; SMITS, W. K. Host Immune Responses to *Clostridioides difficile*: Toxins and Beyond. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 804949, 2021.

OCHOA-CORTES, F.; TURCO, F.; LINAN-RICO, A.; SOGHOMONYAN, S.; WHITAKER, E.; WEHNER, S.; CUOMO, R.; CHRISTOFI, F. L. Enteric Glial Cells: A New Frontier in Neurogastroenterology and Clinical Target for Inflammatory Bowel Diseases. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 22, n. 2, p. 433–449, 2016.

ORIÁ, R. B.; BRITO, G. de C. Sistema digestório: integração básico-clínica. **Editora Edgard Blucher Ltda**, 2016.

PAWOLSKI, V.; SCHMIDT, M. H. H. Neuron-Glia Interaction in the Developing and Adult Enteric Nervous System. **Cells**, v. 10, n. 1, p. 47, 2020.

PEERY, A. F.; CROCKETT, S. D.; MURPHY, C. C.; LUND, J. L.; DELLON, E. S.; WILLIAMS, J. L.; JENSEN, E. T.; SHAHEEN, N. J.; BARRITT, A. S.; LIEBER, S. R.; KOCHAR, B.; BARNES, E. L.; FAN, Y. C.; PATE, V.; GALANKO, J.; BARON, T. H.; SANDLER, R. S. Burden and Cost of Gastrointestinal, Liver, and Pancreatic Diseases in the United States: Update 2018. **Gastroenterology**, v. 156, n. 1, p. 254- 272.e11, 2019.

PENG, L.; HE, Z.; CHEN, W.; HOLZMAN, I. R.; LIN, J. Effects of butyrate on intestinal barrier function in a Caco-2 cell monolayer model of intestinal barrier. **Pediatric research**, v. 61, n. 1, p. 37–41, 2007.

PENSINGER, D. A.; FISHER, A. T.; DOBRILA, H. A.; VAN TREUREN, W.; GARDNER, J. O.; HIGGINBOTTOM, S. K.; CARTER, M. M.; SCHUMANN, B.; BERTOZZI, C. R.; ANIKST, V.; MARTIN, C.; ROBILOTTI, E. V.; CHOW, J. M.; BUCK, R. H.; TOMPKINS, L. S.; SONNENBURG, J. L.; HRYCKOWIAN, A. J. Butyrate Differentiates Permissiveness to *Clostridioides difficile* Infection and Influences Growth of Diverse *C. difficile* Isolates. **Infection and Immunity**, v. 91, n. 2, p. e00570-22, 2023.

POLLOCK, N. R. Ultrasensitive Detection and Quantification of Toxins for Optimized Diagnosis of *Clostridium difficile* Infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 259–264, 2016.

PORTINCASA, P.; BONFRATE, L.; VACCA, M.; DE ANGELIS, M.; FARELLA, I.; LANZA, E.; KHALIL, M.; WANG, D. Q.-H.; SPERANDIO, M.; DI CIAULA, A. Gut Microbiota and Short Chain Fatty Acids: Implications in Glucose Homeostasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1105, 2022.

PRIYADARSHINI, M.; KOTLO, K. U.; DUDEJA, P. K.; LAYDEN, B. T. Role of Short Chain Fatty Acid Receptors in Intestinal Physiology and Pathophysiology. **Comprehensive Physiology**, v. 8, n. 3, p. 1091–1115, 2018.

PROGATZKY, F.; SHAPIRO, M.; CHNG, S. H.; GARCIA-CASSANI, B.; CLASSON, C. H.; SEVGI, S.; LADDACH, A.; BON-FRAUCHES, A. C.; LASRADO, R.; RAHIM, M.; AMANITI, E.-M.; BOEING, S.; SHAH, K.; ENTWISTLE, L. J.; SUÁREZ-BONNET, A.; WILSON, M. S.; STOCKINGER, B.; PACHNIS, V. Regulation of intestinal immunity and tissue repair by enteric glia. **Nature**, v. 599, n. 7883, p. 125–130, 2021.

QIU, Y.; MA, X.; YANG, X.; WANG, L.; JIANG, Z. Effect of sodium butyrate on cell proliferation and cell cycle in porcine intestinal epithelial (IPEC-J2) cells. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 53, p. 304–311, 2017.

RAEISI, H.; AZIMIRAD, M.; NABAVI-RAD, A.; ASADZADEH AGHDAAEI, H.; YADEGAR, A.; ZALI, M. R. Application of recombinant antibodies for treatment of *Clostridioides difficile* infection: Current status and future perspective. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 972930, 2022.

RAO, M.; GERSHON, M. D. Enteric nervous system development: what could possibly go wrong? **Nature Reviews Neuroscience**, v. 19, n. 9, p. 552–565, 2018.

SANTOS, A. A. Q. A.; COSTA, D. V. S.; FOSCHETTI, D. A.; DUARTE, A. S. G.; MARTINS, C. S.; SOARES, P. M. G.; CASTELUCCI, P.; BRITO, G. A. C. P2X7 receptor blockade decreases inflammation, apoptosis, and enteric neuron loss during *Clostridioides difficile* toxin A-induced ileitis in mice. **World Journal of Gastroenterology**, v. 28, n. 30, p. 4075–4088, 2022.

SCHELLER, J.; CHALARIS, A.; SCHMIDT-ARRAS, D.; ROSE-JOHN, S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 5, p. 878–888, 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167488911000425>>. Acesso em: 8 jan. 2024.

SCHEMANN, M.; NEUNLIST, M. The human enteric nervous system. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 16 Suppl 1, p. 55–59, 2004.

SEGUELLA, L.; GULBRANSEN, B. D. Enteric glial biology, intercellular signalling and roles in gastrointestinal disease. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 18, n. 8, p. 571–587, 2021.

SMITS, W. K.; LYRAS, D.; LACY, D. B.; WILCOX, M. H.; KUIJPER, E. J. *Clostridium difficile* infection. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, n. 1, p. 1–20, 2016.

TENÓRIO, C.; ARAÚJO, P. S. R. De; LINS, A. K.; SOBRINHO, C. R. W.; MAGALHÃES, V. Baixa prevalência de infecções por *Clostridioides difficile* em Hospitais de Referência em Oncologia. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 6, p. e16710615612–e16710615612, 2021.

VICENTINI, F. A.; KEENAN, C. M.; WALLACE, L. E.; WOODS, C.; CAVIN, J.-B.; FLOCKTON, A. R.; MACKLIN, W. B.; BELKIND-GERSON, J.; HIROTA, S. A.; SHARKEY, K. A. Intestinal microbiota shapes gut physiology and regulates enteric neurons and glia. **Microbiome**, v. 9, n. 1, p. 210, 2021.

VINOLO, M. A. R.; RODRIGUES, H. G.; NACHBAR, R. T.; CURI, R. Regulation of Inflammation by Short Chain Fatty Acids. **Nutrients**, v. 3, n. 10, p. 858–876, 2011.

VON BOYEN, G. B. T.; SCHULTE, N.; PFLÜGER, C.; SPANIOL, U.; HARTMANN, C.; STEINKAMP, M. Distribution of enteric glia and GDNF during gut inflammation. **BMC gastroenterology**, v. 11, p. 3, 2011.

XI, Y.; JU, R.; WANG, Y. Roles of Annexin A protein family in autophagy regulation and therapy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 130, p. 110591, 2020.

ZHU, Q.; PAN, Q.-Z.; ZHONG, A.-L.; HU, H.; ZHAO, J.-J.; TANG, Y.; HU, W.-M.; LI, M.; WENG, D.-S.; CHEN, M.-Y.; MA, G.; XIA, J.-C. Annexin A3 upregulates the infiltrated neutrophil-lymphocyte ratio to remodel the immune microenvironment in hepatocellular carcinoma. **International Immunopharmacology**, v. 89, p. 107139, 2020.



**1. APÊNDICE**

<b>Fármacos e proteínas</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Código do produto</b>
brometo de tiazolil azul de tiazolil (MTT)	Sigma-Aldrich	M2128
SYBER Green PCR master mix	Applied biosystems	4309155
Ensaio de apoptose RealTime-Glo annexin V	Promega	JA1000
Butirato de sódio	Sigma-Aldrich	303410-500G
Ensaio de atividade de caspase 3/7	Promega	G8090

## 1. ANEXOS



# Host and Clostridioides difficile-Response Modulated by Micronutrients and Glutamine: An Overview

Andréa V. Loureiro<sup>1†</sup>, Maria L. L. Barbosa<sup>2†</sup>, Maria L. G. S. Morais<sup>2</sup>, Ismael P. Souza<sup>2</sup>, Leticia S. Terceiro<sup>1</sup>, Conceição S. Martins<sup>2</sup>, Arkila P. R. Sousa<sup>2</sup>, Renata F. C. Leitão<sup>2</sup>, Jae H. Shin<sup>4</sup>, Cirle A. Warren<sup>4†</sup>, Deiziane V. S. Costa<sup>4†</sup> and Gerly A. C. Brito<sup>1,2,3†\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Medical Sciences, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil, <sup>2</sup> Department of Morphology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil, <sup>3</sup> Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil, <sup>4</sup> Division of Infectious Diseases and International Health, University of Virginia, Charlottesville, Virginia, VA, United States

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Christophe Lacroix,  
ETH Zürich, Switzerland

### Reviewed by:

Anthony Buckley,  
University of Leeds, United Kingdom

### \*Correspondence:

Gerly A. C. Brito  
gerlybrito@hotmail.com

<sup>†</sup> These authors have contributed  
equally to this work and share first  
authorship

<sup>‡</sup> These authors have contributed  
equally to this work and share last  
authorship

### Specialty section:

This article was submitted to  
Nutrition and Microbes,  
a section of the journal  
Frontiers in Nutrition

Received: 05 January 2022

Accepted: 16 May 2022

Published: 20 June 2022

### Citation:

Loureiro AV, Barbosa MLL,  
Morais MLGS, Souza IP, Terceiro LS,  
Martins CS, Sousa APR, Leitão RFC,  
Shin JH, Warren CA, Costa DVS and  
Brito GAC (2022) Host and  
Clostridioides difficile-Response  
Modulated by Micronutrients and  
Glutamine: An Overview.  
Front. Nutr. 9:849301.  
doi: 10.3389/fnut.2022.849301

Changes in intestinal microbiota are integral to development of *Clostridioides difficile* (*C. difficile*)—associated nosocomial diarrhea. Certain diets, especially Western diets, increase susceptibility to *C. difficile* infection (CDI). Here, we discuss recent findings regarding how nutrients modulate response of the host and *C. difficile* during infection. Calcium has a role in the sporulation and germination process. Selenium is effective in reducing the total amount of *C. difficile* toxin A (TcdA) and toxin B (TcdB) and in decreasing its cytotoxicity. In addition, selenium phosphate synthetase deficiency reduces *C. difficile* growth and spore production. On the other hand, iron has a dual role in *C. difficile* growth. For instance, high intracellular levels can generate reactive hydroxyl radicals, whereas low levels can reduce its growth. In humans, zinc deficiency appears to be related to the recurrence of CDI, in contrast, in the CDI model in mice a diet rich in zinc increased the toxin's activity. Low vitamin D levels contribute to *C. difficile* colonization, toxin production, and inflammation. Furthermore, glutamine appears to protect intestinal epithelial cells from the deleterious effects of TcdA and TcdB. In conclusion, nutrients play an important role in modulating host and pathogen response. However, further studies are needed to better understand the mechanisms and address some controversies.

**Keywords:** *Clostridium difficile*, calcium, selenium, iron, zinc, vitamin D, glutamine

## INTRODUCTION

*Clostridioides difficile* (*C. difficile*), a gram-positive, spore-forming, toxin-producing anaerobic bacterium, is a major cause of nosocomial diarrhea associated with antibiotic use (1, 2). Age (>65 years), female gender, comorbidities (such as chronic kidney disease, diabetes mellitus, leukemia, cancer, and inflammatory bowel disease), hospitalization, and immunosuppression are risk factors for acquiring *C. difficile* infection (CDI) (3). The incidence of CDI worldwide increased between 2001–2011, when it is stabilized (4). However, it remains a challenge in hospitals around the world and in the community. In European hospitals, seven cases of CDI occur for every 10,000 patients, costing ~\$6,000 for each first case of CDI (5, 6). CDI is the tenth cause of 30-day readmission scans

of gastrointestinal disease, and the fifth cause of death from non-malignant gastrointestinal disease in the U.S., costing ~\$4 billion a year (5).

Changes in intestinal microbiota components is one of the key factors for CDI. Diets, especially Western, are often associated with changes in the intestinal microbiome (7). In an antibiotic-induced CDI rat model, the high-fat and high-protein diet increases the severity of CDI, whereas the high-carbohydrate diet protects (7). In another similar study, mice infected with *C. difficile* that consumed a dietary fiber with low microbiota accessible carbohydrates (MACs), perpetuated CDI after 12 days of infection (8). These diets may change the micronutrients availability into the gut by changing the microbiota, which in turn can contribute to CDI susceptibility. Micronutrients are required for many pathogenic cellular processes and are essential cofactors for a variety of proteins that are critical for bacterial life (9).

The transmission of *C. difficile* occurs via fecal-oral route or contact with the spores of this bacteria. The spores, after resisting gastric acid content, germinate in the small intestine, and then colonize the colon of the host, releasing several virulence factors, such as toxins A (TcdA) and B (TcdB) (10–12). The virulence factors act in the colon causing severe inflammation and mucosal disruption, resulting from mild diarrhea to pseudomembranous fulminant colitis (1).

To survive and cause disease, most bacterial pathogens need nutrients. Therefore, we performed a review of the literature on the role of specific nutrients such as calcium, selenium, iron, zinc, vitamin D, and glutamine in the pathogen and/or host response during CDI.

## MICRONUTRIENTS

### Calcium

Calcium is an important micronutrient for the regulation of bacterial homeostasis. Its action is subdivided into several mechanisms that vary from the regulation of ion passage, which is important to the sporulation process, to protection against reactive oxygen species (ROS) (13). This mineral is known to be crucial in spore formation, a mechanism that allows bacteria to survive in various environments (14).

Kochan et al. (14) demonstrated that calcium present in the intestinal environment, in a glycine amino acid-dependent manner, facilitates spore germination of *C. difficile* *in vitro*. In mice with CDI, the calcium present in the bile is sufficient to induce sporulation, and intestinal calcium (present in the ileum region) at a concentration around 15 mM is responsible for *C. difficile* spore production. *C. difficile* spores can store large amounts of calcium on their outermost layers (<50 mM calcium), thus in the absence of intestinal calcium, there is activation of the calcium-dependent enzyme (in an intracellular form in the spore) that releases endogenous calcium into the extracellular medium, which combined with glycine, initiates the spore germination process. Thus, if this enzyme is inhibited the onset of germination is delayed (14).

In an *in vitro* study, TcdB treatment induced HeLa cells to release higher levels of calcium leading to increased activation of protein kinase C (PKC). Calcium has been shown to play an

important role in TcdB-induced ROS synthesis in HeLa cells, as blockade of L-type calcium channels decreased ROS production (15). Calcium binds to the L-type calcium channels, resulting in PKC activation (in the first 15 min after toxin challenge), which in turn activates the metabolites of nitric oxide, resulting in production of ROS (15). To our knowledge there are no reports about calcium uptake or serum calcium levels in CDI in patients or murine models.

### Selenium

Selenium is an essential micronutrient that plays a crucial role in the development of a variety of physiological processes (16). It is present in a wide variety of selenoproteins, including proline and glycine reductases, enzymes essential for carrying out Stickland metabolism. Stickland metabolism and its substrates play an important role in the pathogenesis of CDI (17).

Selenophosphate synthase (SelD) initiates the process of selenium incorporation into proteins through the generation of selenophosphate from hydrogen selenide. The absence of selenophosphate leads to decreased selenoprotein synthesis, which in turn causes changes in the physiology of *C. difficile* (17).

McAllister et al. (17) demonstrated that a strain of *C. difficile* deficient in SelD exhibits decreased growth and reduced spore production. However, its deficiency did not affect the early events of spore germination, but rather caused a delay in the growth of germinated spores. Furthermore, the authors proposed that the mutant strain was able to compensate for the loss of selenoprotein synthesis through upregulation of other metabolic pathways.

In contrast, Pellissery et al. (18) have found that selenium (sodium selenite) was effective in reducing TcdA and TcdB levels and in decreasing cytotoxicity of *C. difficile* culture supernatant on Vero cells. The authors have proposed that this effect on toxin production occurred due to the downregulation of genes important for toxin production (*tcdB*, *tcdA*, and *tcdR*), as well as the up-regulation of *tcdC* (toxin negative regulator) and *CodY* (*tcdR* repressor). Moreover, selenium was also able to reduce the growth of *C. difficile* spores and decrease bacterial growth in the presence of ciprofloxacin (18).

It has been demonstrated that auranofin disrupts selenium metabolism in *C. difficile* by forming a stable Auranofin–Selenide complex (19). This complex formation caused the selenium deficiency for selenoenzymes synthesis and the consequent inhibition of *C. difficile* growth due to prevention of the uptake and nutritional utilization of Selenium (19).

Previous study reported that ebselen, a selenium-based organic complex, showed efficacy against autoprolytic cleavage of both TcdA and TcdB, inhibiting toxin-mediated pathology *in vitro*, blocking lethal toxicity of TcdB in a systemic toxicogenic mouse model, and was effective in a clinically relevant mouse model of CDI. The authors suggest that the protective effect of ebselen was mediated by its ability to block a cysteine protease domain (CPD), involved in the glucosyltransferase domain (GTD) processing (20).

Interestingly, sodium selenite facilitated the growth of beneficial bacteria to the intestinal microbiota (*Lactococcus lactis* lacti, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus brevis*, and

*Lactobacillus plantarum* (18). The normal intestinal microbiota plays a key role in protecting against CDI, as it provides colonization resistance against pathogenic bacteria (11). The imbalance in microbiota composition and the consequent reduction of beneficial bacteria species causes the breakdown of the integrity of the intestinal barrier and the loss of its functionality, making the individual more susceptible to CDI. A brief summary of the effects of calcium and selenium in CDI is shown in **Figure 1**.

### Iron

Iron is an essential cofactor for the survival of Gram-positive and Gram-negative bacteria (21). This nutrient has critical function for the strict anaerobe *C. difficile*. High intracellular levels of iron can generate reactive hydroxyl radicals, therefore maintenance of iron at the right levels is important (22). The ferric uptake regulator (Fur) is responsible for regulating the *C. difficile* response to iron limitation. The study carried out by Berges et al. (23) characterized the functional and metabolic alterations induced by Fur-mediated low iron response.

To investigate the role of Fur, the authors constructed a fur mutant *C. difficile* strain. Under iron-limited conditions, wild type (WT) strain grew better than Fur mutant strain. Furthermore, the fur mutant grew slower and had less terminal densities compared to the WT strain (23). In low iron conditions, the Fur mutant strain significantly lost flagella and decreased motility when compared with the WT. Furthermore, lower iron conditions induced rearrangements in energy metabolism, *C. difficile* significantly reduced the formation of most iron-requiring, ferredoxin-dependent processes. This adaptation was only partially regulated by Fur (23). The transition period for adaptation to low iron conditions represented a period of metabolic weakness and physical vulnerability, as demonstrated by the increased susceptibility to vancomycin and polymyxin B of the mutant (23).

Another study (24) investigated the Fur control putative iron acquisition systems *in vitro* and *in vivo* in *C. difficile* infection model. The Fur mutant strain grew normally in high and low-iron conditions when compared with WT. However, the Fur mutant exhibited low growth during the late stationary phase (24). The authors also observed that the Fur mutant present more than 70 upregulated and 44 downregulated transcripts compared with WT. 14 Fur-repressed genes, also were iron repressed. Interestingly, among those Fur- and iron-repressed genes were *C. difficile* genes encoding 7 putative cation transport systems. The expression of the flavodoxin gene, *fldX*, was suppressed by Fur and by high iron. In another way, the ferredoxin gene had lower expression either in mutant or under low-iron conditions (24). Moreover, Fur-regulated and iron-regulated genes increased *in vivo* during CDI using the hamster model. In general, Fur and iron were demonstrated to regulate several classes of ion transporters in *C. difficile* either *in vitro* or *in vivo* for regulating bacterial homeostasis (24).

Monaghan et al. (25) investigated the effects of the ferrous iron uptake system FeoB1 and the ferric uptake regulator and iron-dependent global gene regulator Fur, in a human *in vitro* gut model of *C. difficile* infection. The authors used two

knockout mutants, an in single *feoB1* and other in *fur* homolog. Cytotoxicity assays revealed that the fur mutant strain produced considerably lower toxin levels than the *feoB1* and WT strain (25). These results demonstrated the importance of the Fur system in regulating the expression of *C. difficile* toxins.

Iron significantly influences the growth of *C. difficile* (26, 27). Current reports point out that from the first 5 h of culture, the presence of this mineral increases the growth of 360 strain, while in iron deprivation the growth rate is reduced followed by upregulation of genes linked to cellular iron uptake. Another important data concerning the growth of *C. difficile* shows that the addition of ferrous sulfate (FeSO<sub>4</sub>), iron chloride (FeCl<sub>3</sub>), iron citrate, and ferritin to the broth media in an iron-depleted environment allowed the bacteria to grow better when compared to media without iron supplementation (27). These findings suggest the importance of this micronutrient in *C. difficile* growth and the initiation of pathogenesis. **Figure 2** summarizes the role of iron in *C. difficile* homeostasis.

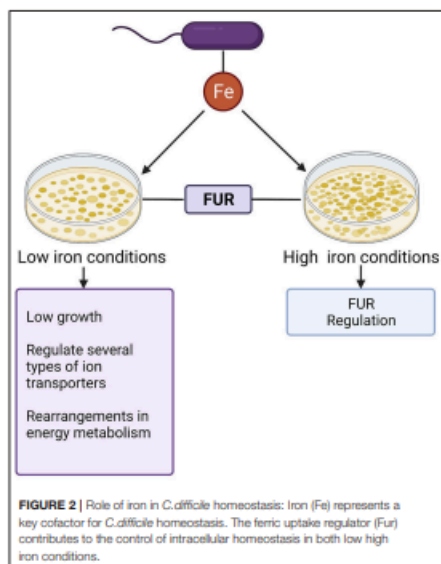
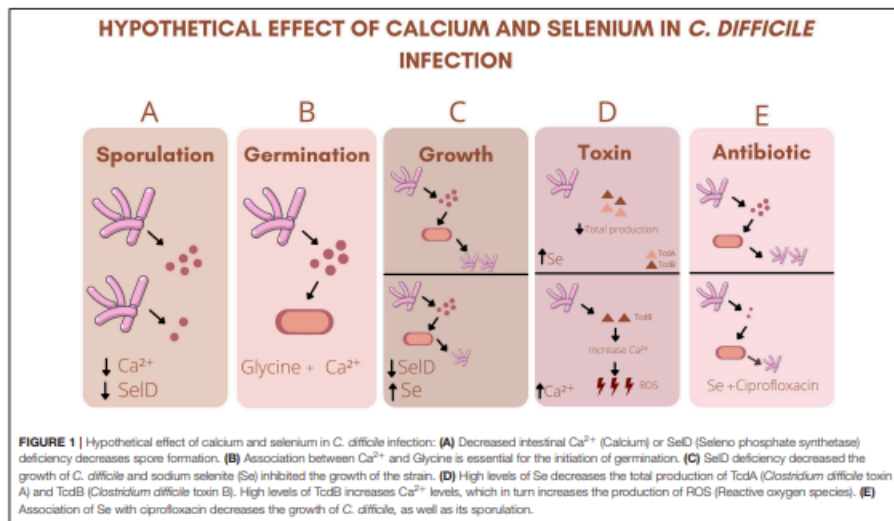
In addition to the importance of iron for pathogen homeostasis, there appears to be a relationship between hemoglobin levels and CDI in humans (28, 29). Hemoglobin is the iron-containing pigment that enables red blood cells to carry high concentrations of oxygen to the tissues (30). A retrospective cohort study of 84 patients with CDI demonstrated that the hemoglobin levels were significantly low in patients with CDI recurrence (28). Another study carried out with 294 patients demonstrated that low hemoglobin levels (below 9 g/dL) may have prognostic significance, of colectomy or death in IBD patients with CDI (29).

Recent findings reported the connection between metronidazole resistance and dependence on undegraded heme stands out. The study by Wu et al. (31) noted that strains known to be resistant to metronidazole appeared more susceptible to the antibiotic when tested in heme-free media or in heme-containing media that were exposed to light (likely due to heme decomposition). The authors speculate that metronidazole-resistant *C. difficile* uses heme to recover in the presence of metronidazole. These results corroborate with a study conducted for Boekhoud et al. (32) that investigated resistance to metronidazole in a collection of clinical isolates of *C. difficile* and observed that heme supplementation from blood agar plates was the crucial determinant for four strains determined to be resistant to metronidazole. This effect would presumably be related to the ability of heme to detoxify the nitro-radicals generated by metronidazole activation.

### Zinc

Zinc (Zn) is an essential micronutrient acquired through the diet and is recommended by the World Health Organization (WHO) in cases of acute diarrhea (33). CDI is often associated with nosocomial diarrhea, and zinc deficiency appears to be related to the recurrence of CDI (33).

Three papers have implicated the importance of zinc in patients with CDE: a case study (34) and two retrospective cohort studies (33, 35). The case report showed the history of a 52-year-old diabetic patient who had undergone kidney transplantation and developed recurrent CDI, presenting

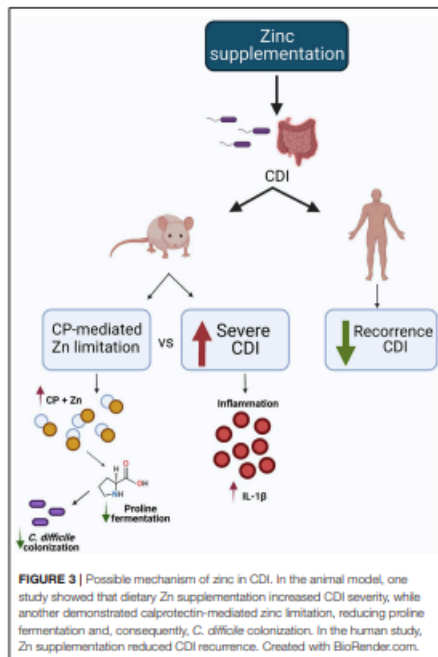


with persistent diarrhea and weight loss of 13kg. The initial treatment was with vancomycin. After the third recurrence of CDI, an evaluation of serum Zn was carried out, and low serum zinc level (36  $\mu\text{g/dL}$ ) was found. The patient underwent another cycle of vancomycin, however, in combination with zinc supplementation. Improvement of symptoms, including diarrhea, without a new CDI recurrence episode, was reported (34).

In a retrospective cohort study of 113 patients, zinc was the most common micronutrient deficiency in patients with CDI, and it was observed that Zn supplementation may decrease the association between zinc deficiency and recurrent CDI (35). Similarly, in another retrospective cohort study of 127 patients, zinc deficiency was associated with higher rates of CDI recurrence after fecal microbiota (FMT) transplantation. Zinc supplementation in zinc-deficient patients, associated with reduced recurrence rate in these patients (33).

In contrast, a study using a CDI model in mice showed that a diet rich in zinc (1,000 mg/kg) increased the toxin's activity, altered the immune response (increased IL-1 $\beta$  and decreased levels of IL-6 and IL-12 cytokines and anti-inflammatory cytokine IL-10), and increased the severity of the disease (36). In this same study, deficiency of calprotectin (CP), which is a calcium and zinc binding protein, did not alter the stool shedding of *C. difficile* in mice (36). Another study demonstrated a putative zinc transporter (ZupT) is used by *C. difficile* as a mechanism for survival due to high CP levels-mediated decreases in availability of Zn (37).





In another mouse model of CDI, CP limited the availability of Zn and increased the transcription of *C. difficile* genes necessary for proline fermentation. This reduced fermentation is due to the limited availability of another nutrient needed for proline fermentation, selenium. Therefore, CP-mediated Zn limitation combined with selenium deficiency affects the proline fermentation necessary for broader adaptation of *C. difficile* in the host gut (38).

These inconsistent effects of zinc in *C. difficile* infection may be related to supraphysiologic levels of zinc in the mouse studies. The **Figure 3** summarizes the possible mechanism of zinc in CDI.

### Vitamin D

Vitamin D is an essential dietary nutrient known for its critical function in bone homeostasis. It is also involved in absorption of inorganic elements (such as calcium, phosphorus, and magnesium), kidney dysfunction (by reducing proteinuria and inflammation) and immune responses (39–42). There are two forms of vitamin D, ergocalciferol (vitamin D2), and cholecalciferol (vitamin D3). Vitamin D deficiency increases the risk of autoimmune disease and allergies (43), as well

as causes alterations in intestinal barrier and changes in microbiome composition (44). Moreover, some studies have demonstrated a strong correlation between vitamin D deficiency and incidence/severity of some infectious diseases such as respiratory infection, tuberculosis, and CDI (45–47).

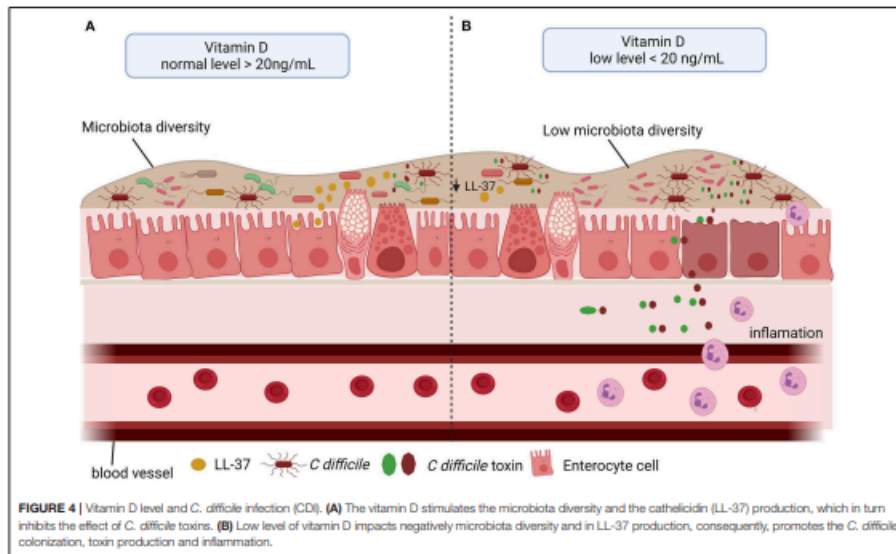
In patients with CDI, it was demonstrated that there is a significant association between low vitamin D 25 (OH) D3 levels and CDI severity (48). Accordingly, patients with normal levels of vitamin D (>20 ng/mL) presented with non-severe CDI, although the low level of vitamin D was not associated directly with increased risk of developing CDI and mortality in hospitalized patients. The level of vitamin D did not correlate with CDI recurrence (49).

In a study with 271 patients with CDI, 17.5 % of patients with severe CDI had deficiency of Vitamin D [25 (OH) D < 10 ng/mL] (50). Additionally, Gayam et al. (51) and Kanamori et al. (52) found that patients with CDI and vitamin D deficiency (<10 ng/mL) are more susceptible to developing sepsis and peritonitis, resulting in increased medical treatment costs and mortality for this group of patients. Ananthkrishnan et al. (53) and Sahay et al. (54) also demonstrated that low levels of vitamin D (<20 ng/mL) were associated with increased risk of CDI in patients with inflammatory bowel disease (IBD) while higher plasma calcifediol [25 (OH) D] was associated with reduced risk. A negative correlation between vitamin D levels and the risk of developing community-acquired *C. difficile* infection (CA-CDI) has been reported (55). In addition, low vitamin D levels and age > 70 years old were independently associated with increased recurrence of *C. difficile* associated diarrhea (56). Consistent with these findings, CA-CDI cases was previously associated with low serum levels of 25 (OH) D (>15 ng/mL) measured up to 12 months or 2 weeks after toxin positivity (54).

Drall et al. (57) showed that maternal consumption of vitamin D-fortified milk reduced the *C. difficile* colonization in infants by a microbiota independent mechanism, as no difference was found in microbiota composition of infants breastfed with vitamin D-fortified milk and not breastfed. In contrast, Singh et al. (58) showed that vitamin D supplementation increased gut microbial diversity and specifically increase the abundance of *Bifidobacterium* which has been related to reduce manifestation of CDI (59, 60). The microbial diversity is essential to reduce the susceptibility to intestinal infections (61).

Impairment of innate and adaptive immune responses during infections are increasingly being related to hypovitaminosis D (62). This is because vitamin D has an important effect on clearance of pathogenic organisms by stimulating the production of cathelicidin, an antimicrobial peptide that has also shown to inhibit the effect of *C. difficile* toxins (63). Cathelicidin is a key antimicrobial peptide in mammals, being found in sites of inflammation and is involved in the host defense against bacteria and other pathogens (64).

Taken together all these findings, vitamin D deficiency may be associated with an increased risk of CDI by reducing cathelicidin production, resulting in decreased intestinal microbiota diversity. Thus, vitamin D plays an important protective role during CDI. The **Figure 4** summarizes the role of vitamin D in CDI.



### Glutamine

Glutamine (L-Gln) is a nonessential amino acid (NEAA) due to the endogenous glutamine biosynthesis pathway. L-alanyl-L-glutamine (AQ) is a stable source of L-Gln used in clinical and pre-clinical studies. L-Gln plays an important role in tricarboxylic acid (TCA) cycle supplementation and in biosynthesis of nucleotides, glutathione (GSH), and other nonessential amino acids. The L-Gln transporters (SLC1A5, SLC38A1, and SLC38A2) can mediate the L-Gln transportation into cells through plasma membrane, once in the cytoplasm, it can be used to the biosynthesis of hexosamine, nucleotides, and asparagine (65).

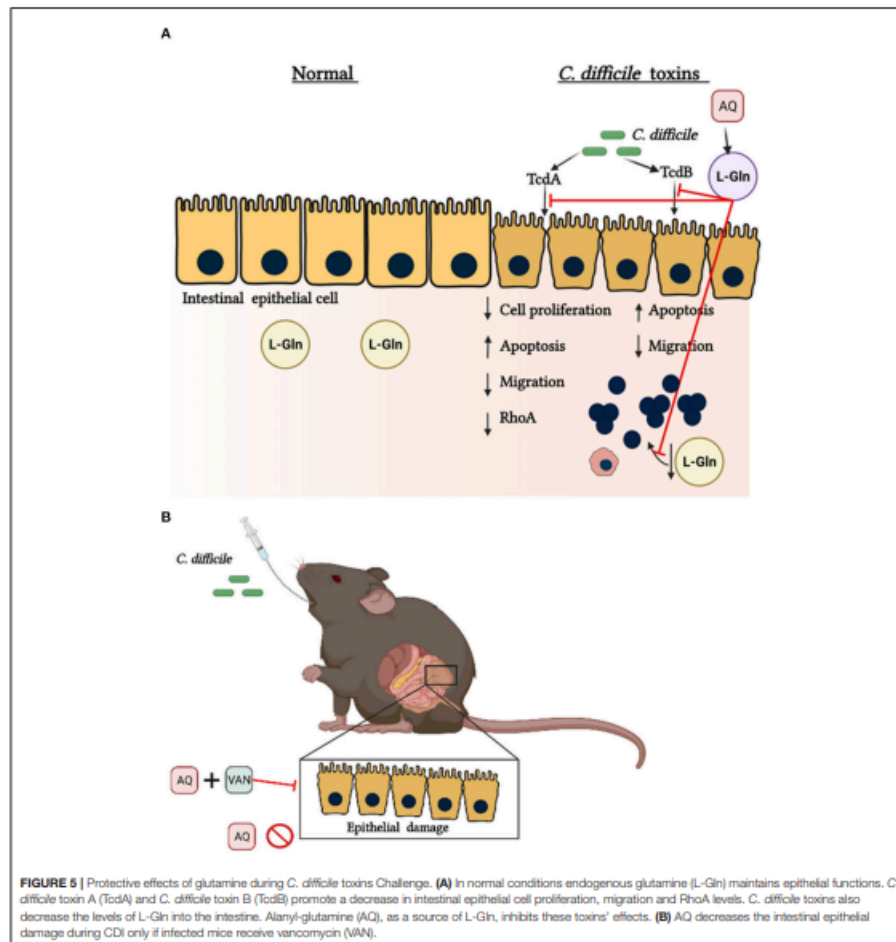
*In vitro*, L-Gln protected intestinal epithelial cells (IEC-6) from the deleterious effects of TcdA by promoting proliferation and inhibiting apoptosis via increasing RhoA expression (66). RhoA is a Rho GTPase that has a key inductor role in proliferation and migration, its deletion decreases these functions in other cells (67). Similarly, L-Gln also protected rat intestinal epithelial cells (IEC-6) challenged with TcdA and TcdB by increasing proliferation and migration, and by decreasing apoptosis (68–70). Glutamine is also important to the host response and its depletion potentiates leucocyte-dependent inflammatory events induced by TcdA in rats (71). In rabbit ileum and mouse cecal tissues challenged with TcdA, AQ potentialized the effect of A2A agonist in decreasing apoptosis, intestinal damage and proinflammatory cytokine secretion (72). On the other hand, in a model of CDI, AQ decreased intestinal damage only when mice were treated with vancomycin (68). These data

suggest that the AQ-related protective effects do not occur by directly targeting *C. difficile* during infection.

Further, in a metabolomics analysis of cecum content after 30 h post-CDI, levels of glutamine showed to be elevated (73). However, because of its short half-life, glutamine may not be able to stimulate host cells such as epithelial cells to generate its protective effects during infection. More studies to better understand the mechanism involved in the beneficial outcome promoted by AQ supplementation during CDI are still needed. The Figure 5 summarizes the possible mechanism of glutamine in *C. difficile* toxins challenge.

### CONCLUSION

Here, we showed that nutrients play an important role in modulating host and pathogen response during CDI. Calcium facilitates spore germination and TcdB-induced ROS synthesis. Selenium reduces the cytotoxicity of *C. difficile* toxins by decreasing the production of these toxins in *C. difficile*. Vitamin D deficiency is strongly associated to CDI severity, once vitamin D plays an important role in stimulating cathelicidin synthesis, which in turn inhibits the toxins' effects. Whereas the beneficial effects of glutamine in CDI seems to be by modulating the host response. However, the beneficial effects of Iron and Zinc during CDI appears to be level dependent. However, further studies are needed to better characterize the role of nutrients in the interaction between the host components and *C. difficile* and



clarify some controversial results. We believe it is important to investigate nutritional deficiencies during CDI in human.

final version. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

AL, MB, MM, IS, LT, CM, and DC wrote sections of the manuscript. AL, MB, AS, RL, JS, CW, DC, and GB contributed to the organization of the manuscript, reviewed, and approved the

#### FUNDING

This work was supported by CAPES and CNPq of Brazil (PRONEX CNPq/FUNCAP grant number PR2-0101-00060.01.00/15).



## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful for the support provided by the Federal University of Cear1 in partnership with the

University of Virginia. The authors also would like to thank to Dr. Richard Guerrant for sharing his knowledge and review this article. Illustrations were created with BioRender.com.

## REFERENCES

- Abt MC, McKenney PT, Pamer EG. Clostridium difficile colitis: pathogenesis and host defence. *Nat Rev Microbiol.* (2016) 14:609–20. doi: 10.1038/nrmicro.2016.108
- Leffler DA, Lamont JT. Clostridium difficile infection. *N Engl J Med.* (2015) 372:1539–48. doi: 10.1056/NEJmra1403772
- Eze P, Balsells E, Kyaw MH, Nair H. Risk factors for clostridium difficile infections—an overview of the evidence base and challenges in data synthesis. *J Glob Health.* (2017) 7:010417. doi: 10.7189/jogh.07.010417
- Marra AR, Perencevich EN, Nelson RE, Samore M, Khader K, Chiang HY, et al. Incidence and outcomes associated with clostridium difficile infections: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Netw Open.* (2020) 3:e1917597. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2019.17597
- Peery AF, Crockett SD, Murphy CC, Lund JL, Dellon ES, Williams JL, et al. Burden and cost of gastrointestinal, liver, and pancreatic diseases in the United States: update 2018. *Gastroenterology.* (2019) 156:254–72 e11. doi: 10.1053/j.gastro.2018.08.063
- Davies KA, Longshaw CM, Davis GL, Bouza E, Barbut F, Barna Z, et al. Underdiagnosis of clostridium difficile across Europe: the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of clostridium difficile infection in hospitalised patients with diarrhoea (euclid). *Lancet Infect Dis.* (2014) 14:1208–19. doi: 10.1016/S1473-3099(14)70991-0
- Mefferd CC, Bhubu SS, Phan JR, Villarama IV, Do DM, Alarcia S, et al. A high-fat/high-protein, Atkins-type diet exacerbates clostridioides (clostridium) difficile infection in mice, whereas a high-carbohydrate diet protects. *mSystems.* (2020) 5:e00765–19. doi: 10.1128/mSystems.00765-19
- Hryckowian AJ, Van Treuren W, Smits SA, Davis NM, Gardner JO, Bouley DM, et al. Microbiota-accessible carbohydrates suppress clostridium difficile infection in a murine model. *Nat Microbiol.* (2018) 3:662–9. doi: 10.1038/s41564-018-0150-6
- Lopez CA, Skaar EP. The impact of dietary transition metals on host-bacterial interactions. *Cell Host Microbe.* (2018) 23:737–48. doi: 10.1016/j.chom.2018.05.008
- Chandrasekaran R, Lacy DB. The role of toxins in clostridium difficile infection. *FEMS Microbiol Rev.* (2017) 41:723–50. doi: 10.1093/femsre/fux048
- Czepiel J, Drozdz M, Pituch H, Kuijper EJ, Perucki W, Mielimonka A, et al. Clostridium difficile infection review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* (2019) 38:1211–21. doi: 10.1007/s10096-019-03539-6
- Smits WK, Lyras D, Lacy DB, Wilcox MH, Kuijper EJ. Clostridium difficile infection. *Nat Rev Dis Primers.* (2016) 2:16020. doi: 10.1038/nrdp.2016.20
- Wang T, Flint S, Palmer J. Magnesium and calcium ions: roles in bacterial cell attachment and biofilm structure maturation. *Biofouling.* (2019) 35:959–74. doi: 10.1080/08927014.2019.1674811
- Kochan TJ, Somers MJ, Kaiser AM, Shoshiev MS, Hagan AK, Hastie JL, et al. Intestinal calcium and bile salts facilitate germination of clostridium difficile spores. *PLoS PATHOG.* (2017) 13:e1006443. doi: 10.1371/journal.ppat.1006443
- Farrow MA, Chamber NM, Bloch SC, King M, Moton-Melancon K, Shupe J, et al. Small molecule inhibitor screen reveals calcium channel signaling as a mechanistic mediator of clostridium difficile tcdB-induced necrosis. *ACS Chem Biol.* (2020) 15:1212–21. doi: 10.1021/acscchembio.9b00906
- Avery JC, Hoffmann PR. Selenium, selenoproteins, and immunity. *Nutrients.* (2018) 10:1203. doi: 10.3390/nu10091203
- McAllister KN, Martinez Aguirre A, Sorg JA. The selenophosphate synthetase gene, selD, is important for clostridioides difficile physiology. *J Bacteriol.* (2021) 203:e000821. doi: 10.1128/JB.00008-21
- Pellissery AJ, Vinayamohan PG, Yin HB, Mooyottu S, Venkitanarayanan K. *In vitro* efficacy of sodium selenite in reducing toxin production, spore outgrowth and antibiotic resistance in hypervirulent clostridium difficile. *J Med Microbiol.* (2019) 68:1118–28. doi: 10.1099/jmm.0.001008
- Jackson-Rosario S, Cowart D, Myers A, Tarrien R, Levine RI, Scott RA, et al. Auranofin disrupts selenium metabolism in clostridium difficile by forming a stable au-se adduct. *J Biol Inorg Chem.* (2009) 14:507–19. doi: 10.1007/s00775-009-0466-z
- Bender KO, Garland M, Ferreyra JA, Hryckowian AJ, Child MA, Puri AW, et al. A small-molecule antivirulence agent for treating clostridium difficile infection. *Sci Transl Med.* (2015) 7:306ea148. doi: 10.1126/scitranslmed.aac9103
- Andrews SC, Robinson AK, Rodriguez-Quinones F. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev.* (2003) 27:215–37. doi: 10.1016/S0168-6445(03)00055-X
- Troxell B, Hassan HM. Transcriptional regulation by ferric uptake regulator (fur) in pathogenic bacteria. *Front Cell Infect Microbiol.* (2013) 3:59. doi: 10.3389/fcimb.2013.00059
- Berges M, Michel AM, Lassek C, Nuss AM, Beckstette M, Dersch P, et al. Iron regulation in clostridioides difficile. *Front Microbiol.* (2018) 9:3183. doi: 10.3389/fmicb.2018.03183
- Ho TD, Ellermeier CD. Ferric uptake regulator fur control of putative iron acquisition systems in clostridium difficile. *J Bacteriol.* (2015) 197:2930–40. doi: 10.1128/JB.00098-15
- Monaghan TM, Chilton CH, Fit M, Buckley AM, Kuehne SA, Wilcox MH, et al. Mutation of the ferric uptake regulator (fur) severely impairs toxin production in a human *in vitro* gut model of clostridium difficile infection. *Gut.* (2016) 65:A25–6. doi: 10.1136/gutjnl-2016-312388.43
- Hastie JL, Hanna PC, Carlson PE. Transcriptional response of clostridium difficile to low iron conditions. *Pathog Dis.* (2018) 76:fty009. doi: 10.1093/femspd/fty009
- Cernat RC, Scott KP. Evaluation of novel assays to assess the influence of different iron sources on the growth of clostridium difficile. *Ameroebe.* (2012) 18:298–304. doi: 10.1016/j.anaerobe.2012.04.007
- Choi HK, Kim KH, Lee SH, Lee SJ. Risk factors for recurrence of clostridium difficile infection: effect of vancomycin-resistant enterococci colonization. *J Korean Med Sci.* (2011) 26:859–64. doi: 10.3346/jkms.2011.26.7.859
- Ananthakrishnan AN, Guzman-Perez R, Gainer V, Cai T, Churchill S, Kohane I, et al. Predictors of severe outcomes associated with clostridium difficile infection in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* (2012) 35:789–95. doi: 10.1111/j.1365-2036.2012.05022.x
- Gell DA. Structure and function of haemoglobins. *Blood Cell Mol Dis.* (2018) 70:13–42. doi: 10.1016/j.bcmd.2017.10.006
- Wu XQ, Shen WJ, Deshpande A, Olaitan AO, Palmer KL, Garey KW, et al. The integrity of heme is essential for reproducible detection of metronidazole-resistant clostridioides difficile by agar dilution susceptibility tests. *J Clin Microbiol.* (2021) 59:e0058521. doi: 10.1128/JCM.00585-21
- Boekhoud IM, Sidorov I, Nooij S, Harmanus C, Bos-Sanders I, Viprey V, et al. Haem is crucial for medium-dependent metronidazole resistance in clinical isolates of clostridioides difficile. *J Antimicrob Chemother.* (2021) 76:1731–40. doi: 10.1093/jac/dkab097
- Niccum BA, Stein DJ, Behm BW, Hays RA. Zinc deficiency and the recurrence of clostridium difficile infection after fecal microbiota transplant: a retrospective cohort study. *J Nutr Metab.* (2018) 2018:9682975. doi: 10.1155/2018/9682975
- Parvatani S, Dasari AR. Zinc level and its role in recurrent clostridium difficile infection: a case report and literature review. *J Investig Med High Impact Case Rep.* (2020) 8:2324709620941315. doi: 10.1177/2324709620941315
- Shin JH, Chaplin AS, Hays RA, Kolling GL, Vance S, Guerrant RI, et al. Outcomes of a multidisciplinary clinic in evaluating recurrent clostridioides

- difficile infection patients for fecal microbiota transplant: a retrospective cohort analysis. *J Clin Med*. (2019) 8:1036. doi: 10.3390/jcm8071036
36. Zackular JP, Moore JL, Jordan AT, Juttukonda LJ, Noto MJ, Nicholson MR, et al. Dietary zinc alters the microbiota and decreases resistance to clostridium difficile infection. *Nat Med*. (2016) 22:1330–4. doi: 10.1038/nm.4174
  37. Zackular JP, Knippel RJ, Lopez CA, Beavers WN, Maxwell CN, Chazin WJ, et al. Zupt facilitates clostridioides difficile resistance to host-mediated nutritional immunity. *mSphere*. (2020) 5:1–20. doi: 10.1128/mSphere.00061-20
  38. Lopez CA, Beavers WN, Weiss A, Knippel RJ, Zackular JP, Chazin W, et al. The immune protein calprotectin impacts clostridioides difficile metabolism through zinc limitation. *mBio*. (2019) 10:1–19. doi: 10.1128/mBio.02289-19
  39. Aguilar-Shea AL. Vitamin D, the natural way. *Clin Nutr ESPEN*. (2021) 41:10–2. doi: 10.1016/j.clnesp.2020.12.001
  40. Amrein K, Scherkl M, Hoffmann M, Neuwersch-Sommeregger S, Kostenberger M, Tnava Berisha A, et al. Vitamin D deficiency 20: an update on the current status worldwide. *Eur J Clin Nutr*. (2020) 74:1498–513. doi: 10.1038/s41430-020-0558-y
  41. Lucisano S, Buemi M, Passantino A, Aloisi C, Cernaro V, Santoro D. New insights on the role of vitamin D in the progression of renal damage. *Kidney Blood Press Res*. (2013) 37:667–78. doi: 10.1159/000355747
  42. Wang Y, Yang S, Zhou Q, Zhang H, Yi B. Effects of vitamin D supplementation on renal function, inflammation and glycemic control in patients with diabetic nephropathy: a systematic review and meta-analysis. *Kidney Blood Press Res*. (2019) 44:72–87. doi: 10.1159/000498838
  43. Bishop E, Ismailova A, Dimeloe SK, Hewison M, White JH. Vitamin D and immune regulation: antibacterial, antiviral, anti-inflammatory. *JBM R Plus*. (2020) 5:e10405. doi: 10.1002/jbm.b.10405
  44. Yamamoto EA, Jorgensen TN. Relationships between Vitamin D, gut microbiome, and systemic autoimmunity. *Front Immunol*. (2019) 10:3141. doi: 10.3389/fimmu.2019.03141
  45. Martineau AR, Jolliffe DA, Hooper RL, Greenberg L, Aloia JF, Bergman P, et al. Vitamin D supplementation to prevent acute respiratory tract infections: systematic review and meta-analysis of individual participant data. *BMJ*. (2017) 356:e6583. doi: 10.1136/bmj.e6583
  46. Lang PO, Aspinall R. Vitamin D status and the host resistance to infections: what it is currently (not) understood. *Clin Ther*. (2017) 39:930–45. doi: 10.1016/j.clinthera.2017.04.004
  47. Ganmaa D, Uyanga B, Zhou X, Ganntseteg G, Delgerekh B, Enkhmaa D, et al. Vitamin D supplements for prevention of tuberculosis infection and disease. *N Engl J Med*. (2020) 383:359–68. doi: 10.1056/NEJMoa1915176
  48. van der Wilden GM, Fagenholz PJ, Velmahos GC, Quraishi SA, Schipper IB, Camargo CA Jr. Vitamin D status and severity of clostridium difficile infections: a prospective cohort study in hospitalized adults. *J Parenter Enteral Nutr*. (2015) 39:465–70. doi: 10.1177/0148607113519129
  49. Abdelfatah M, Nayfe R, Mofkhar B, Nijim A, El Zoghbi M, Donskey CJ, et al. Low vitamin D level and impact on severity and recurrence of clostridium difficile infections. *J Investig Med*. (2015) 63:17–21. doi: 10.1097/JIM.0000000000000117
  50. Wong KK, Lee R, Watkins RR, Haller N. Prolonged clostridium difficile infection may be associated with vitamin D deficiency. *J Parenter Enteral Nutr*. (2016) 40:682–7. doi: 10.1177/0148607114568121
  51. Gayam V, Mandal AK, Dittah CM, Sidhu J, Konala VM, Adapa S, et al. Outcomes of clostridioides difficile in patients with vitamin D deficiency: a propensity-matched national inpatient sample analysis. *South Med J*. (2020) 113:593–9. doi: 10.14423/SMJ.00000000000001168
  52. Furuya-Kanamori L, Wangdi K, Yakob I, McKenzie SJ, Doi SAR, Clark J, et al. 25-Hydroxyvitamin D concentrations and clostridium difficile infection: a meta-analysis. *J Parenter Enteral Nutr*. (2017) 41:890–5. doi: 10.1177/0148607115623457
  53. Ananthkrishnan AN, Cagan A, Gainer VS, Cheng SC, Cai T, Szelovits P, et al. Higher plasma vitamin D is associated with reduced risk of clostridium difficile infection in patients with inflammatory bowel diseases. *Aliment Pharmacol Ther*. (2014) 39:1136–42. doi: 10.1111/apt.12706
  54. Sahay T, Ananthkrishnan AN. Vitamin D deficiency is associated with community-acquired clostridium difficile infection: a case-control study. *BMC Infect Dis*. (2014) 14:661. doi: 10.1186/s12879-014-0661-6
  55. Quraishi SA, Litonjua AA, Moromizato T, Gibbons FK, Camargo CA Jr, Giovannucci E, et al. Association between prehospital vitamin D status and hospital-acquired clostridium difficile infections. *J Parenter Enteral Nutr*. (2015) 39:47–55. doi: 10.1177/0148607113511991
  56. Wang WJ, Gray S, Sison C, Arramraju S, John BK, Hussain SA, et al. Low vitamin D level is an independent predictor of poor outcomes in clostridium difficile-associated diarrhea. *Therap Adv Gastroenterol*. (2014) 7:14–9. doi: 10.1177/1756283X13502838
  57. Drall KM, Field CJ, Haqq AM, de Souza RJ, Tun HM, Morales-Lizcano NP, et al. Vitamin D supplementation in pregnancy and early infancy in relation to gut microbiota composition and C. difficile colonization: implications for viral respiratory infections. *Gut Microbes*. (2020) 12:1799734. doi: 10.1080/19490976.2020.1799734
  58. Singh P, Rawat A, Ahwaked M, Sharif E, Al Khodor S. The potential role of Vitamin D supplementation as a gut microbiota modifier in healthy individuals. *Sci Rep*. (2020) 10:21641. doi: 10.1038/s41598-020-77806-4
  59. Yun B, Song M, Park DJ, Oh S. Beneficial effect of bifidobacterium longum atcc 15707 on survival rate of clostridium difficile infection in mice. *Korean J Food Sci Anim Resour*. (2017) 37:368–75. doi: 10.5851/kosfa.2017.37.3.368
  60. Wei Y, Yang F, Wu Q, Gao J, Liu W, Liu C, et al. Protective effects of bifidobacterial strains against toxigenic clostridium difficile. *Front Microbiol*. (2018) 9:888. doi: 10.3389/fmicb.2018.00888
  61. Mosca A, Leclerc M, Hugot JP. Gut microbiota diversity and human diseases: should we reintroduce key predators in our ecosystem? *Front Microbiol*. (2016) 7:455. doi: 10.3389/fmicb.2016.00455
  62. Hewison M. An update on vitamin D and human immunity. *Clin Endocrinol*. (2012) 76:315–25. doi: 10.1111/j.1365-2265.2011.04261.x
  63. Hing TC, Ho S, Shih DQ, Ichikawa R, Cheng M, Chen J, et al. The antimicrobial peptide cathelicidin modulates clostridium difficile-associated colitis and toxin-a-mediated enteritis in mice. *Gut*. (2013) 62:1295–305. doi: 10.1136/gutjnl-2012-302180
  64. Peng L, Scheenstra MR, van Harten RM, Haagsman HP, Veldhuizen EJA. The immunomodulatory effect of cathelicidin-b1 on chicken macrophages. *Vet Res*. (2020) 51:122. doi: 10.1186/s13567-020-00849-y
  65. Yoo HC, Yu YC, Sung Y, Han JM. Glutamine reliance in cell metabolism. *Exp Mol Med*. (2020) 52:1496–516. doi: 10.1038/s12276-020-00504-8
  66. Santos AA, Braga-Neto MB, Oliveira MR, Freire RS, Barros EB, Santiago TM, et al. Glutamine and alanyl-glutamine increase rhoa expression and reduce clostridium difficile toxin-a-induced intestinal epithelial cell damage. *Biomol Res Int*. (2013) 2013:152052. doi: 10.1155/2013/152052
  67. Wen J, Qian C, Pan M, Wang X, Li Y, Lu Y, et al. Lentivirus-mediated RNA interference targeting rhoa slacks the migration, proliferation, and myelin formation of schwann cells. *Mol Neurobiol*. (2017) 54:1229–39. doi: 10.1007/s12035-016-9733-5
  68. Rodrigues RS, Oliveira RA, Li Y, Zaja-Milatovic S, Costa LB, Braga Neto MB, et al. Intestinal epithelial restitution after tcdb challenge and recovery from clostridium difficile infection in mice with alanyl-glutamine treatment. *J Infect Dis*. (2013) 207:1505–15. doi: 10.1093/infdis/jit041
  69. Brito GA, Carneiro-Filho B, Oria RB, Destura RV, Lima AA, Guarrant RL. Clostridium difficile toxin a induces intestinal epithelial cell apoptosis and damage: role of gln and ala-gln in toxin a effects. *Dig Dis Sci*. (2005) 50:1271–8. doi: 10.1007/s10620-005-2771-x
  70. Carneiro BA, Fujii J, Brito GA, Alcantara C, Oria RB, Lima AA, et al. Caspase and bid involvement in clostridium difficile toxin a-induced apoptosis and modulation of toxin a effects by glutamine and alanyl-glutamine in vivo and in vitro. *Infect Immun*. (2006) 74:81–7. doi: 10.1128/IAI.74.1.81-87.2006
  71. Nascimento SB, Sousa RB, Martins MJ, Souza Gomes A, Souza MH, Guarrant RL, et al. Glutamine depletion potentiates leucocyte-dependent inflammatory events induced by carrageenan or clostridium difficile toxin a in rats. *Immunology*. (2005) 116:328–36. doi: 10.1111/j.1365-2567.2005.02232.x
  72. Warren CA, Calabrese GM Li Y, Pawlowski SW, Figler RA, Rieger J, et al. Effects of adenosine a(2)a receptor activation and alanyl-glutamine in clostridium difficile toxin-induced ileitis in rabbits and cecitis in mice. *BMC Infect Dis*. (2012) 12:13. doi: 10.1186/1471-2334-12-13
  73. Fletcher JR, Erwin S, Lanzas C, Theriot CM. Shifts in the gut metabolome and clostridium difficile transcriptome throughout colonization and infection

in a mouse model. *mSphere*. (2018) 3:e00089–18. doi: 10.1128/mSphere.00089-18

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in

this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Loureiro, Barbosa, Monis, Souza, Terceiro, Martins, Sousa, Leitão, Shin, Warren, Costa and Brito. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.