



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

PAPEL DO RECEPTOR P2X7 NO EFEITO DA TOXINA A DO *CLOSTRIDIUM*
***DIFFICILE* EM MODELO DE ALÇA ILEAL EM CAMUNDONGOS.**

ANA ANGÉLICA QUEIROZ ASSUNÇÃO SANTOS

FORTALEZA- CEARÁ
2017

ANA ANGÉLICA QUEIROZ ASSUNÇÃO SANTOS

**PAPEL DO RECEPTOR P2X7 NO EFEITO DA TOXINA A DO *CLOSTRIDIUM*
DIFFICILE EM MODELO DE ALÇA ILEAL EM CAMUNDONGOS.**

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós –
graduação em Ciências Médicas, da Universidade
Federal do Ceará como requisito parcial para
obtenção de grau de Doutor em Ciências Médicas.
**Orientadora: Profa. Dra. Gerly Anne de Castro
Brito.**

FORTALEZA -CEARÁ

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

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

S233p Santos, Ana Angelica Queiroz Assuncao.
Papel do receptor P2X7 no efeito da Toxina A do Clostridium difficile em modelo de alca ileal em camundongos / Ana Angelica Queiroz Assuncao Santos. – 2017.
99 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, 0, Fortaleza, 2017.
Orientação: Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito.

1. Clostridium difficile. 2. Toxina A. 3. receptor P2X7. 4. Sistema nervoso enterico. 5. receptor purinergico. I. Título.

CDD



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

ATA DA SESSÃO DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE ANA ANGÉLICA QUEIROZ ASSUNÇÃO SANTOS REALIZADA NO DIA DEZESSEIS DE JANEIRO DE DOIS MIL E DEZESSETE.

1 As nove horas do dia dezesseis de janeiro do ano de dois mil e dezessete, no auditório Paulo Marcelo, da
 2 Universidade Federal do Ceará, realizou-se a 70ª. Sessão de Defesa da Tese de Doutorado de autoria de ANA
 3 ANGÉLICA QUEIROZ ASSUNÇÃO SANTOS. O trabalho tinha como título: "PAPEL DO
 4 RECEPTOR P2X7 NO EFEITO DA TOXINA A DO CLOSTRIDIUM DIFFICILE EM
 5 MODELO DE ALÇA ILEAL EM CAMUNDONGOS". Compunham a Banca Examinadora os
 6 professores doutores, Patrícia Castelucci, Maria Rosimar Teixeira Matos, Paula Goes Pinheiro Dutra, Pedro
 7 Marcos Gomes Soares e Gerly Anne de Castro Brito (ORIENTADORA). A sessão foi aberta pelo
 8 coordenador do Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas, professor doutor **Pedro Felipe**
 9 **Carvalho de Bruin**, que apresentou a Banca Examinadora e passou apalavra a orientadora afim de que
 10 apresentasse a candidata. Após a exposição, seguiu-se o processo de arguição da doutoranda. A primeira
 11 examinadora foi o professora doutora Patrícia Castelucci, Logo após procederam à arguição os professores
 12 doutores, Maria Rosimar Teixeira Matos, Paula Goes Pinheiro Dutra, Pedro Marcos Gomes Soares e Gerly
 13 Anne de Castro Brito. Em seguida, a Banca Examinadora reuniu-se reservadamente a fim de avaliar o
 14 desempenho da candidata. Por unanimidade, a Banca Examinadora considerou **APROVADO** o trabalho da
 15 doutoranda. Nada mais havendo a relatar, a sessão foi encerrada às treze horas.

Gerly Anne de Castro Brito

Profª. Dra. Gerly Anne de Castro Brito
 (Orientadora UFC)

Patrícia Castelucci

Profª. Dra. Patrícia Castelucci
 (USP)

Maria Rosimar Teixeira Matos

Profª. Maria Rosimar Teixeira Matos
 (UECE)

Paula Goes Pinheiro Dutra

Profª. Dra. Paula Goes Pinheiro Dutra
 (UFC)

Pedro Marcos Soares

Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares
 (UFC)

*A DEUS e Ao Meu maior presente
Cafel.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por todas as graças a mim concedidas e pela oportunidade de realizar este trabalho. Ele que esteve onipresente em todos os momentos da minha vida sempre me guiando e iluminando.

Aos meus pais, que são pessoas mais importantes da minha vida, que sempre estimularam a lutar pelos meus sonhos, me deram força, incentivo, carinho e alguns puxões de orelha quando se fez necessário.

Ao meu esposo, que sempre me apoiou, me deu força, entendeu as minhas ausências em vários momentos importantes e que cuidou do nosso Calel, em muitos finais de semana para que pudesse estudar e escrever.

À Dra. Gerly Anne, a quem admiro muito por seu profissionalismo e amor a pesquisar. Sem esquecer-me da oportunidade e disponibilidade em acolher-me e orientar-me no mestrado e no doutorado, com quem aprendi muito em todos esses anos de convivência.

À Dra. Patrícia Castelucci, a quem admiro muito pelo profissionalismo, dedicação a pesquisa. E por ter acolhido a nossa ideia, apoiado esse projeto e pela colaboração em todos os experimentos de imunorreatividade e código químico.

Ao Dr. Henning Ulrich, pela colaboração com inibidor de P2X7 e os experimentos de PCR

Ao Prof. Carlos Quezada pela parceria nos projetos com a toxina A do Clostridium difficile.

As Drs. Renata e Antoníela, por todo apoio, dicas, ideias trocadas e incentivo na conquista desse sonho.

Aos amigos do Laboratório da USP: Kelly, Cris, Bárbara e Mariana pelo incentivo, orientações, conversas e companhias em vários momentos.

Aos amigos do NEMPI: Dani, Luana, Nayana, Zulmira, Josy, Débora, Thiago, Chris entre vários, que sempre me apoiaram, escutaram, incentivaram na conquista deste sonho e principalmente pelas longas horas de experimentos juntos, amigos para a vida.

À Socorro, Flávia e Josy, pela constante ajuda.

À Rita e Ivone, secretárias da pós-graduação, pelo constante apoio e orientação nas questões administrativas.

Ao CNPq, CAPES e Funcap, pelo suporte financeiro.

RESUMO

O *Clostridium difficile* (*C. difficile*) é a maior causa de colite associada ao uso de antibióticos, com significativa morbidade e mortalidade. O sistema nervoso entérico (SNE) está localizado no trato gastrointestinal (TGI) e possui importante função de regulação do sistema digestório. O receptor P2X7 presente nas células gliais entéricas (CGE) e no SNE participa na regulação da permeabilidade celular, liberação de citocinas e apoptose, processos que estão envolvidos na patogênese do *C. difficile*. O objetivo deste estudo foi analisar o papel do receptor P2X7 na enterite induzida pela toxina A (TcdA) do *C. difficile*. A alça ileal dos camundongos foi injetada com salina (Cloreto de Sódio 0,9%- Controle) ou TcdA (50 µg/alça) em camundongos previamente tratados com os inibidores: BBG (50 mg/kg) ou A438079 (10 µM) via intraperitoneal 1h antes da injeção da TcdA ou salina. Os animais foram eutanaziados após 4h da injeção e a alça ileal coletada para as seguintes análises: imunofluorescência para ChAT, NOS, P2X7 e calretinina nos preparados de membrana, imunohistoquímica para GFAP, HuC/D, S-100β, TUNEL e PCR para P2X7. Os resultados demonstraram que a TcdA reduziu significativamente em 66,42% os neurônios do plexo mioentérico quando comparado ao controle, enquanto nos preparados de membrana observou-se uma redução significativa dos neurônios imunorreativos a ChAT em 23,21% e Calretinina 28,17%, contudo, houve um aumento de 21,23% da marcação para o receptor P2X7 em relação ao controle. No tecido ileal verificou-se um aumento de 411,95% e 22,40% respectivamente na área positiva para P2X7 e na expressão gênica. Em relação aos marcadores gliais, observou-se um aumento de 125,71% e 144,30% para GFAP e S-100β, respectivamente. Nos animais tratados com os inibidores de P2X7: BBG e o A438079 observou-se uma melhora dos parâmetros histológicos, uma redução significativa do número de células apoptóticas, das células marcadas para GFAP e S-100β, das citocinas: TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-8 com relação ao controle e um aumento significativo na área positiva para HuC/D em relação a TcdA. A partir desses resultados, concluiu-se que a TcdA promoveu alterações no sistema nervoso entérico, aumentando a morte neuronal e ativando as células da glia, e que o receptor P2X7 tem participação importante nas alterações induzidas pela TcdA do *C. difficile*.

Palavras-Chaves: *Clostridium difficile*, sistema nervoso entérico, Toxina A, receptor P2X7

ABSTRACT

Clostridium difficile (*C. difficile*) is the major cause of colitis associated with the use of antibiotics, with significant morbidity and mortality. The enteric nervous system (ENS) is located in the gastrointestinal tract (GIT) and has an important function of regulating the digestive system. The P2X7 receptor participates in the regulation of cellular permeability, cytokine release and apoptosis, processes that are involved in the pathogenesis of *C. difficile* induced disease. The aim of this study was to analyze the role of the P2X7 receptor in enteritis induced by *C. difficile* toxin A (TcdA). The mouse ileal loop was injected with saline (Sodium Chloride 0.9% - Control) or TcdA (50 µg / loop) in mice previously treated with the inhibitors: BBG (50 mg/kg) or A438079 (10 µM) i.p. injection 1 h prior to TcdA (TcdA + BBG; TcdA + A438079) or saline injection. The animals were euthanized after 4h later and the ileal loop collected for the following analyzes: immunofluorescence for ChAT, NOS, P2X7 and calretinin in membrane preparations, immunohistochemistry for GFAP, HuC / D, S-100β, TUNEL and PCR for P2X7. The results demonstrated that TcdA significantly reduced myenteric plexus neurons in 66.42% when compared to the control, while in the membrane preparations a significant reduction of the immunoreactive neurons to ChAT was observed in 23.21% and Calretinin 28.17%. However, there was a 21.23% increase in labeling for the P2X7 receptor over the control. In the ileal tissue there was an increase of 411.95% and 22.40% respectively in the P2X7 positive area and in the gene expression. In relation to the glial markers, an increase of 125.71% and 144.30% was observed for GFAP and S-100β, respectively. In animals treated with inhibitors P2X7; BBG and A438079, as observed an improvement in histological parameters. In addition, a significant reduction in the number of apoptotic cells decrease in GFAP and S-100β-labeled cells, and cytokines (TNF-α, IL-1β, IL-6 and IL-8) levels, compared to the control. This was associated with a significant increase in the HuC/D positive area. From these results, it is concluded that TcdA promotes changes in the enteric nervous system, increasing neuronal death and activating glial cells, and that the P2X7 receptor plays an important role in the changes induced by *C. difficile* TcdA.

Key- Words: *Clostridium difficile*, enteric nervous system, Toxin A and P2X7 receptor

LISTA DE FIGURAS

Figura- 1	Micrografia eletrônica dos bacilos do <i>Clostridium difficile</i>.....	15
Figura- 2	Aspecto do cólon normal e do cólon de indivíduo com doença associada ao <i>Clostridium difficile</i> (DACD).....	19
Figura- 3	Estágios do ciclo de vida do <i>Clostridium difficile</i> no trato gastrointestinal humano.....	21
Figura- 4	Esquema de tratamento com metronidazol e vancomicina para infecção causada pelo <i>Clostridium difficile</i>.....	23
Figura- 5	Resposta inata do sistema imune do hospedeiro ao <i>Clostridium difficile</i>.....	24
Figura- 6	Locus de patogenicidade das toxinas produzidas pelo <i>Clostridium difficile</i>.....	26
Figura- 7	Efeito das proteínas regulatórias e metabolitos sobre a síntese de toxinas do <i>C. difficile</i>.....	27
Figura- 8	Domínio das toxinas do <i>Clostridium difficile</i> e o seu mecanismo de absorção.....	28
Figura- 9	Representação esquemática da estratigrafia da parede do trato gastrointestinal.....	34
Figura-10	Representação esquemática dos 14 tipos de neurônios do SNE.....	35
Figura-11	Representação esquemática do receptor P2X7.....	40
Figura-12	Esquema de sinalização do receptor P2X7.....	42
Figura-13	Efeito da TcdA do <i>C. difficile</i> sobre os gânglios neuronais.....	56
Figura-14	Efeito da TcdA do <i>C. difficile</i> sobre o receptor P2X7 no sistema nervoso entérico.....	57
Figura-15	Efeito da TcdA do <i>C. difficile</i> sobre os neurônios imunorreativos ao ChAT no sistema nervoso entérico.....	60
Figura-16	Efeito da TcdA do <i>C. difficile</i> sobre os neurônios imunorreativos ao NOS no sistema nervoso entérico.....	61
Figura-17	Efeito da TcdA do <i>C. difficile</i> sobre os neurônios imunorreativos ao Calr no sistema nervoso entérico.....	62

Figura-18	Expressão de P2X7 na alça ileal de animais injetadas com a TcdA do <i>C. difficile</i>.....	64
Figura-19	Efeito dos inibidores de P2X7 sobre os animais injetadas com a TcdA do <i>C. difficile</i> através da coloração HE.....	67
Figura-20	Efeito dos inibidores de P2X7 sobre os animais injetados com a TcdA do <i>C. difficile</i> através do método de TUNEL	68
Figura-21	Dosagem das citocinas: TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-8 na alça ileal de animais injetados com a TcdA do <i>C. difficile</i> tratados ou não com inibidores de P2X7.....	69
Figura-22	Efeito dos inibidores de P2X7 sobre a expressão do “pan” neuronal HuC/D em os animais injetados com a TcdA do <i>C. difficile</i>.....	70
Figura-23	Efeito dos inibidores de P2X7 sobre a expressão do GFAP em os animais injetados com a TcdA do <i>C. difficile</i>.....	72
Figura-24	Efeito dos inibidores de P2X7 sobre a expressão do S100β em os animais injetados com a TcdA do <i>C. difficile</i>.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µL	Microlitros
µM	Micromolar
A438079	A-438079 hydrochloride hydrate
ACh	Acetilcolina
ADA	Adenosina deaminase
ATP	Adenosina trifosfato
BBG	Brillhant Blue G
Ca ²⁺	Cálcio
Calb	Calbidina
Calr	Calretinina
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CDT	Toxina Binária do <i>Clostridium difficile</i>
CGE	Células gliais entéricas
ChAT	Colina acetiltransferase
cm	Centímetro
COX-2	Ciclooxigenase-2
Cx43	Conexina43
DACD	Doença associada ao <i>Clostridium difficile</i>
DII	Doença inflamatória intestinal
DMSO	Dimetilsufóxido
EPM	Erro padrão da média
<i>et al</i>	E colaboradores
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
GNDF	Fator neurotrófico derivado de células gliais
GNSO	S-nitrosoglutathione
HE	Hematoxilina-Eosina
IL-1β	Interleucina 1 Beta
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5

IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IPAN	Neurônios aferentes primários intrínsecos
K ⁺	Potássio
kDa	Kilodaltons
LTB ₄	Leucotrienos 4
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
Na ⁺	Sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NF-κB	Fator de transcrição nuclear-Kb
NLRP3	NLR family pyrin domain containing 3
nm	Nanômetros
nM	Nanomolar
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NPY	Neuropeptídeo Y
p	Significância
P2X	Família dos receptores purinérgicos
P2X7	Membro da família P2X
PAF	Fator ativador plaquetário
PaLoc	Locus patogenicidade
Panx-1	Panexina 1
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia de polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PRR	Receptores de reconhecimento padrão
S-100β	Fração beta da proteína S100
SlpA	Proteína A da camada superficial
SNA	Sistema nervoso autônomo
SNC	Sistema nervoso central
SNE	Sistema nervoso entérico
SP	Substância P
TcdA	Toxina A do <i>Clostridium difficile</i>

TcdB	Toxina B do <i>Clostridium difficile</i>
TGI	Trato gastrointestinal
TLR	Receptor Toll-like
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VIP	Polipeptídeo intestinal vasoativo

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	15
1.1.	<i>Clostridium difficile</i>	15
1.1.1.	O <i>Clostridium difficile</i> e seus aspectos históricos e epidemiológicos.....	15
1.1.2.	Doença associada ao <i>Clostridium difficile</i> (DACD)	18
1.1.3.	Toxinas do <i>Clostridium difficile</i>	24
1.1.3.1.	Toxina A do <i>Clostridium difficile</i>	30
1.2.	Sistema Nervoso Entérico	33
1.3.	P2X7	38
1.3.1.	Estrutura e mecanismo de ação do receptor P2X7	38
1.4.	JUSTIFICATIVA.....	43
2.	OBJETIVO.....	45
2.1.	Objetivo Geral.....	45
2.2.	Objetivos Específicos.....	45
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
3.1.	Drogas e reagentes.....	46
3.2.	Animais utilizados para o modelo de enterite induzida por TcdA.....	46
3.3.	Modelo de alça ileal.....	46
3.4.	Análise histopatológica da lesão induzida pela TcdA do <i>C. difficile</i>	47
3.5.	Imunofluorescência do plexo mioentérico na lesão induzida pela TcdA do <i>C. difficile</i>	47
3.5.1.	Preparação do material para imunofluorescência	47
3.5.2.	Método da dupla marcação com imunofluorescência do receptor P2X7 com anti- NOS, ChAT ou Calr	48
3.5.3.	Análise qualitativa dos neurônios imunorreativos ao receptor P2X7, NOS, ChAT e Calr	49
3.5.4.	Análise quantitativa dos neurônios imunorreativos ao receptor P2X7, NOS, ChAT e Calr	49
3.5.4.1.	Análise do código químico	49
3.5.4.2.	Análise da densidade e a estimativa da área do perfil neuronal.....	50
3.6.	Imunohistoquímica para marcadores gliais (GFAP e S100 β) e receptor P2X7 na lesão induzida pela TcdA do <i>C. difficile</i>	50

3.7.	Quantificação da expressão gênica de P2X7 pelo <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) em tempo real lesão induzida pela TcdA do <i>C. difficile</i>	51
3.8.	Método TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick end-labeling) lesão induzida pela TcdA do <i>C.difficile</i>	53
3.9.	Dosagem de citocinas na lesão induzida pela TcdA do <i>C.difficile</i>	53
3.10.	Análise Estatística.....	54
4.	RESULTADOS.....	55
4.1.	O efeito da TcdA do <i>C. difficile</i> sobre a densidade neuronal e a expressão de P2X7 no plexo mioentérico.....	55
4.2.	O efeito da TcdA do <i>C.difficile</i> sobre os neurônios imunorreativos a NOS, ChAT e Calr no plexo mioentérico	58
4.3.	O papel do receptor P2X7 na lesão induzida pela TcdA do <i>C. difficile</i>	63
4.4.	O papel dos inibidores do receptor P2X7 lesão induzida pela TcdA do <i>C. difficile</i>	65
4.5.	O efeito da TcdA no <i>C. difficile</i> e dos inibidores de P2X7 sobre as células gliais entéricas	71
5.	DISCUSSÃO	74
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

INTRODUÇÃO

1.1 *Clostridium difficile*

1.1.1 O *Clostridium difficile* e seus aspectos históricos e epidemiológicos

O *Clostridium difficile* (*C.difficile*) é um bacilo gram positivo, anaeróbio e formador de esporos, considerado a maior causa de diarreia nosocomial (figura 1). A infecção pelo *C. difficile* ocorre principalmente em indivíduos em uso de antibióticos de largo espectro como fluoroquinonas e cefalosporinas (BLOSSOM; MACDONALD, 2007; DIAL *et al.*, 2005). O *C. difficile* é encontrado com frequência no ambiente e em 3% da microbiota intestinal normal da população adulta (ARTEAGA *et al.*, 2009). O *C. difficile* está associado a diarreia em humanos e animais (KEEL *et al.*, 2007).

Figura 1- Micrografia eletrônica dos bacilos do *Clostridium difficile*.



Fonte: Universidade de Hobot University of Wales College of Medicine UK. Acessado em 29 de setembro de 2011. Disponível em: http://www.health.qld.gov.au/EndoscopeReprocessing/module_1/1_3d.asp#DACDff.

As primeiras pesquisas envolvendo o *C. difficile* datam de 1935 quando Hall e Toole, pesquisando microbiota intestinal de neonatos saudáveis, descreveram um microorganismo até então desconhecido, que originalmente recebeu a denominação de *Bacillus difficilis* e depois de *Clostridium difficile*, refletindo a enorme dificuldade encontrada para isolar e manter este microorganismo em cultura pura. Estes autores também revelaram que este microorganismo é toxicogênico, devido a achados de lesões, parada respiratória e morte em animais de laboratórios quando submetidos à injeção de sobrenadante de cultura ou filtrado do meio que continha esse microorganismo (HALL; TOOLE, 1935).

Hafiz (1974) demonstrou que o *C. difficile* está presente em diversos locais, tais como lama, solo e areia, e em uma ampla variedade de esterco animais como: vacas, camelos e jumentos. Porém, o estudo sobre este bacilo não teve grande importância até 1978 quando o *C. difficile* foi implicado como o agente responsável pela diarreia associada a antibióticos e a colite pseudomembranosa em humanos.

Segundo Gerding (2009), a partir de maio de 1977 a maio de 1978 houve uma rápida sucessão de trabalhos científicos para a identificação do *C. difficile* e suas toxinas como o agente causador de colite associada ao uso da clindamicina. Larson *et al.*, (1977) descreveram o efeito citopático de fezes de pacientes com colite pseudomembranosa como sendo devido a uma toxina desconhecida. Depois de diversas publicações, em maio de 1977, Larson e colaboradores comprovaram o isolamento de *C. difficile* nas fezes de pacientes com múltiplos episódios de colite pseudomembranosa. Nos últimos trinta anos diversos estudos foram publicados sobre este bacilo falando sobre o uso de novas terapias, mecanismo de resposta imune, diagnóstico clínico, características moleculares e genéticas.

Nos Estados Unidos, a Universidade de Pittsburgh, relatou um aumento nos casos graves de colite causada pelo *C. difficile* a partir do ano 2000, sendo que esse aumento contínuo da incidência também foi relatado em pacientes com doença associada ao *C. difficile* (DACD) no Canadá, nos Estados Unidos e na Europa (KUIJPER; COIGNARD; TULL, 2006; LOO *et al.*, 2005; PEPIN *et al.*, 2004; SMITS *et al.*, 2016). Segundo Lessa, Winston e McDonald (2015) apenas no ano de 2015, nos Estados Unidos, o *C. difficile* foi responsável por cerca de 500.000 infecções e 30.000 mortes por ano e paradoxalmente houve 83.000 casos de reincidência, aumentando bastante os custos hospitalares. Na América do Sul, principalmente no Brasil e alguns países da Europa ainda não tem sistema de notificação para medir a incidência e os óbitos associados ao DACD (BALASSIANO *et al.*, 2009; RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009). Conforme Balassiano e colaboradores (2012), as infecções causadas por *C.*

difficile podem tornar-se um problema significativo na América Latina, mas existe uma importante deficiência nos métodos de detecção, nas estratégias de diagnóstico e tratamento para evitar graves problemas de saúde pública, por conta da existência de poucos centros especializados.

Em relação ao Brasil temos poucos dados de detecção do *C. difficile*, pois não existe um sistema oficial de notificação. O estudo realizado por Ferreira *et al.* (2003) mostrou que essa bactéria foi isolada em 5,5% das crianças internadas com diarreia aguda em São Paulo e que as crianças saudáveis não eram hospedeiras deste bacilo. Pinto *et al.* (2003) investigaram a presença de cepas de *C. difficile* em crianças que estavam internadas ou em tratamento ambulatorial com diarreia ou não, e isolaram *C. difficile* em 6,7% das amostras de fezes. Em estudo realizado por Balassiano *et al.* (2009), durante o período de um ano, 28,5% dos pacientes internados em um hospital do Rio de Janeiro apresentaram DACD ativa, tiveram bactérias isoladas de 66,7% de suas amostras de fezes.

A epidemiologia da DACD está marcada pelo aumento no número de casos e aumento da gravidade nos últimos dez anos, o que tem sido relacionado ao surgimento de uma cepa hipervirulenta caracterizada como tipo toxicogênico III, ribotipo por PCR 027, denominada NAP1/BI/027 (RUPNIK; JANEZIC, 2016). Esta cepa produz uma maior quantidade de toxina A (TcdA) e B (TcdB), bem como uma toxina binária (CDT), por isso esta cepa tem alta patogenicidade, além de ter maior capacidade de esporular e que lhe dá um grande potencial epidêmico no âmbito hospitalar e na comunidade (ARTEAGA *et al.*, 2009).

Em 2005, a análise molecular levou à identificação da cepa *C. difficile* NAP1/BI/027 que foi responsável por um grande número de infecções durante um aumento nas taxas de DACD em hospitais em toda a América do Norte (RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009). Esta cepa foi encontrada em hospitais em 40 estados nos Estados Unidos, em todas as províncias do Canadá e na maioria dos países europeus (KUIJPER *et al.*, 2008; LOO *et al.*, 2005; PEPIN *et al.*, 2004). Outras cepas do *C. difficile* como: 001, 053, 106 e 078 também podem causar surtos e casos graves (BORGSMANN *et al.*, 2008). Na Holanda, os pacientes infectados com ribotipo 078 eram mais jovens e tinham a doença associada à comunidade com maior frequência (17,5% versus 6,7%) do que os pacientes infectados com ribotipo 027. É importante enfatizar que o ribotipo 078 é mais prevalente em alimentos e em humanos principalmente relacionados a casos na comunidade (LESSA; WINSTON; McDONALD, 2015; RUPNIK, 2007; RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009; SONGER *et al.* 2009). Conforme Rupnik e Janezic (2016) os ribotipos 027 e 078 são, respectivamente, dos toxinotipos

III e V, que estão representados entre os 12 mais prevalentes. No Brasil, em estudo publicado por Balassiano e colaboradores (2009) mostrou através de análise de PCR que os isolados de *C. difficile* distribuíam-se entre dois ribotipos respectivamente, 014 (cepas 1575 e 1598) e 106 (cepas 1599 e 1602). A análise também revelou que as cepas encontradas neste estudo não estavam relacionadas com a cepa hipervirulenta NAP1/BI/027.

Em 2014, Costa e colaboradores publicaram um estudo de caso de um paciente com DACD, sendo o mesmo portador de HIV e neoplasia, em hospital de referência para o tratamento de Câncer no Ceará, ressaltando a importância desse dado para o nordeste do Brasil, pois foi o primeiro caso de DACD na comunidade. Em outro estudo realizado por Costa (2014) em um hospital de referência para o tratamento de câncer no Ceará, observou-se a elevada incidência de DACD (46,3%), sendo a cepa predominantemente identificada como NAP4, encontrada em outros países como Estados Unidos e Canadá, presentes em hospitais e em casos na comunidade..

Uma nova cepa de *C. difficile* (ICC-45) foi recuperada de um paciente com câncer, em um hospital do Ceará no Brasil, que morreu de diarreia grave. A abordagem polifásica atribuiu um novo ribotipo de PCR e um padrão de macro restrição de PFGE à estirpe ICC-45, que é toxigênico (tcdA_þ, tcdB_þ e ctdB_þ), classificada como ST41 de MLST Clade 2 e toxinotipo IX, sendo susceptível a fluoroquinolonas e não produz quantidades elevadas de TcdA e TcdB. Porém os sobrenadantes das estirpes ICC-45 e NAP1/BI/027 produziram uma expressão semelhante de citocinas pró-inflamatórias, danos epiteliais e resposta ao estresse oxidativo no modelo de alça ileal em camundongos, mostrando as características comuns na patogênese (COSTA *et al.*, 2016).

1.1.2 Doença associada ao *Clostridium difficile* (DACD)

Segundo González- Garcia, Gómez- Pavón e Martínez- Porras (2005), a sequência para o aparecimento da diarreia causada pelo *C. difficile* ocorre da seguinte forma: uso de antibiótico de amplo espectro, alteração da microbiota intestinal, exposição e colonização pelo *C. difficile* e pôr fim a produção de toxinas que induzem a resposta inflamatória aguda, podendo variar de uma simples diarreia até uma colite pseudomembranosa (Figura 2).

A infecção causada pelo *C. difficile* pode causar na sua forma mais grave uma colite necrosante, no qual por vezes se torna necessário tratamento radical como a colectomia a fim

de evitar a morte do paciente (MUTO *et al.*, 2005), mas também pode causar outras complicações como: desidratação, alterações hidroeletrólíticas, acidose, choque séptico, anasarca e hipoalbuminemia grave (FEKETY, 1997). A alta mortalidade está relacionada principalmente com grupos de risco como: pacientes imunodeprimidos e idosos a partir de 65 anos de idade (DALLAL *et al.*, 2002). A colite fulminante acomete 1 a 3% dos pacientes com sintomas de toxicidade grave, febre, dor e distensão abdominal (KELLY; LAMONT, 1998).

Figura 2 - Aspecto do cólon normal (esquerda) e do cólon de indivíduo com doença associada ao *Clostridium difficile* (DACD) (direita).



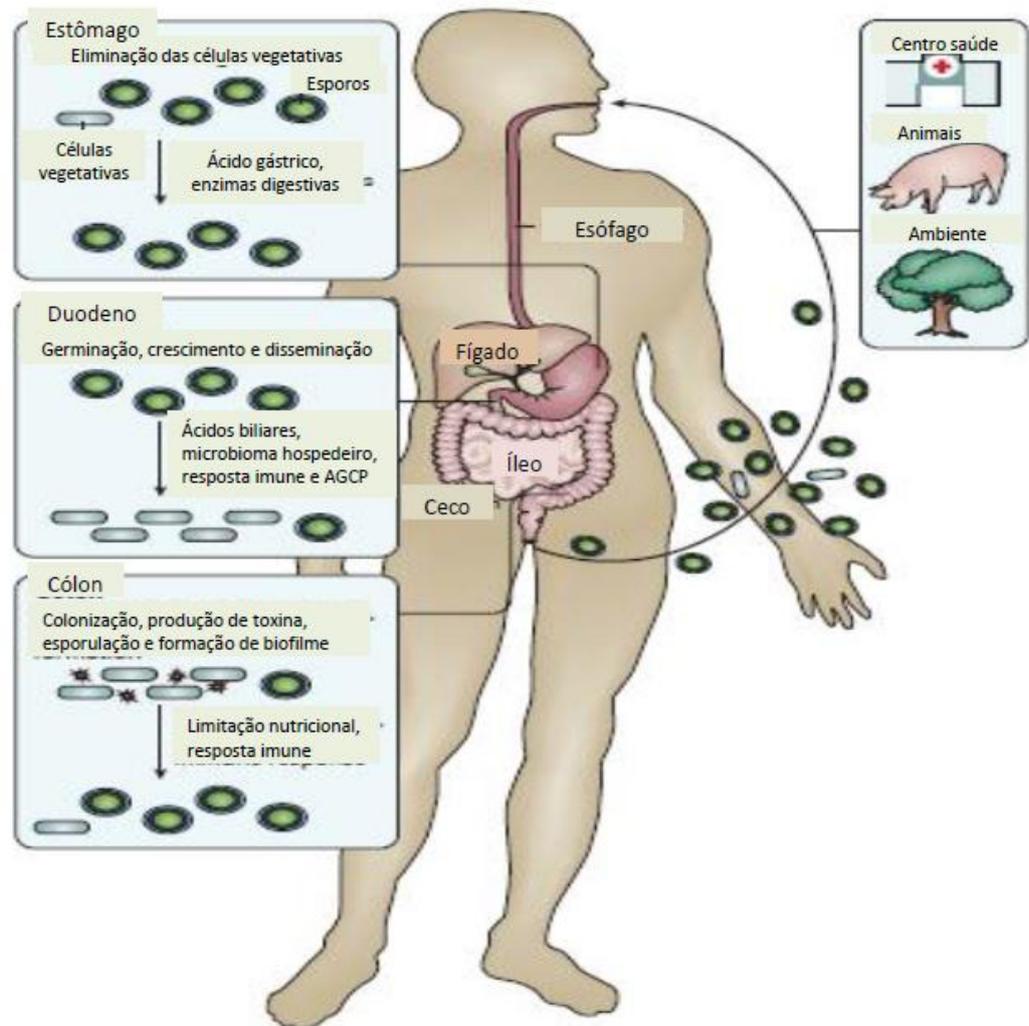
Fonte: Adaptada de Rupnik; Wilcox e Gerding, 2009. Colonoscopia do intestino normal e em seguida a imagem das pseudomembranas formadas por placas amareladas e confluentes

Conforme Paredes- Sabja e Sorg (2014) e Smits e colaboradores (2016), a contaminação pelo *C. difficile* pode ser orofecal (Figura 3). Na transmissão do DACD, o esporo bacteriano é o agente contaminante. Esses esporos são resistentes em condições ambientais à dessecação, produtos químicos e temperaturas extremas, e também frequentemente contaminam o meio ambiente em torno dos pacientes com DACD (VISWANATHAN; MALLOZZI; VEDANTAM, 2010). Segundo Fawley *et al.* (2007), a cepa epidêmica do *C. difficile* tem maior capacidade de esporulação *in vitro* que as outras cepas.

A germinação de esporos é dependente dos ácidos biliares para a liberação do receptor CspC e a inibição secundária dos ácidos biliares no colón, onde ocorre a fixação dos

esporos (PAREDES-SABJA; SHEN; SORG, 2014). Uma cascata proteolítica promove a degradação dos peptideoglicanos dos esporos e por consequência a reidratação dos mesmos, sendo que o processo de colonização do hospedeiro é influenciado pela microbiota do mesmo (BHATTACHARJEE *et al.*, 2015; PAREDES-SABJA; SHEN; SORG, 2014). Outro fator relevante é se houver deslocamento dessa microbiota por uso de antibiótico pois geram um ambiente propício a DACD, pela capacidade de produção de enzimas mucolíticas como as proteínas de superfície Cwp84 e SlpA (GONZÁLEZ- GARCIA, GÓMEZ- PAVÓN E MARTÍNEZ- PORRAS; 2005; SMITS *et al.*, 2016).

Figura 3: Estágios do ciclo de vida do *C. difficile* no trato gastrointestinal humano.



Fonte: Adaptado de Smits *et al.*, 2016. Existe três fontes de infecção: hospitais, animais e comunidade. Uma variedade de fatores do hospedeiro influencia o ciclo de vida do *C. difficile*, bem como o número relativo de esporos e células vegetativas (metabolicamente ativas) no intestino. Note que a passagem pelo estômago elimina a maioria das formas vegetativas (mas os esporos sobrevivem), e os esporos germinam e se desenvolvem no

duodeno. No ceco e no cólon, o *C. difficile* inicia a produção de esporos novamente e as células vegetativas são excretadas pelo paciente durante a infecção. As toxinas são produzidas no cólon. Como o *C. difficile* é uma bactéria anaeróbia obrigatória, a transmissão ocorre primariamente via esporos.

Essas proteínas superficiais que estão associadas à virulência são de grande relevância para aderência do mesmo à mucosa intestinal, além de poderem induzir a resposta de anticorpos e inflamatória no hospedeiro (AUSIELLO *et al.*, 2006; DRUDY *et al.*, 2004; WRIGHT *et al.*, 2005). Conforme Merrigan, Gerding e Vedantam (2006) existem uma variabilidade considerável entre as proteínas de superfície de diferentes cepas, principalmente nas proteínas A da camada superficial (SlpA). As cepas consideradas mais virulentas como BI/NAP1/027 apresentam uma SlpA alterada que é responsável pelo aumento da aderência nas células epiteliais humanas de acordo com a indicação de estudos preliminares. Antes da germinação das células vegetativas, o *C. difficile* já demonstra capacidade de aderir às células do cólon. Semenyuk e colaboradores (2015) discorrem que *in vitro* este bacilo é capaz de formar biofilmes.

A base para o diagnóstico de DACD são a presença de sintomas clínicos e teste de diagnóstico como: testes dos produtos de *C. difficile* (glutamato desidrogenase (GDH), TcdA e / ou TcdB); método para a detecção de produção de toxina de *C. difficile* através de cultura bacteriana; e amplificação de ácidos nucleicos testes para os genes de *C. difficile* (detecção de rRNA 16S, toxina genes ou o gene que codifica GDH) (BARTLETT; GERDING, 2008). A seleção do teste é importante para diferenciar entre pacientes com DACD e aqueles assintomáticos. Os testes que detectam componentes da bactéria podem indicar a colonização do paciente, sem o mesmo ter desenvolvido a DACD (BARTLETT; GERDING, 2008; PLANCHE; WILCOX, 2015).

Um grupo europeu de estudo sobre o *C. difficile* propôs alguns critérios para ser considerado positivo o diagnóstico de DACD. O paciente deve apresentar de forma combinada algumas das seguintes situações: (a) fezes diarreicas ou megacolon tóxico e uma técnica de laboratório positiva para toxina A (TcdA) e/ou toxina B (TcdB) nas fezes; (b) colite pseudomembranosa observada através da endoscopia gastrointestinal baixa; e (c) amostra colônica com características histopatológicas de DACD obtida por endoscopia, colectomia ou autópsia, associada a dois episódios de DACD no mesmo paciente que se consideraram eventos distintos entre si por ocorrerem com diferença mínima de dois meses entre um e outro (ARTEAGA *et al.*, 2009). Segundo esses mesmos autores não será considerado caso de DACD

pacientes que apresentarem testes positivos para TcdA e/ou TcdB do *C. difficile*, mas que sejam assintomáticos.

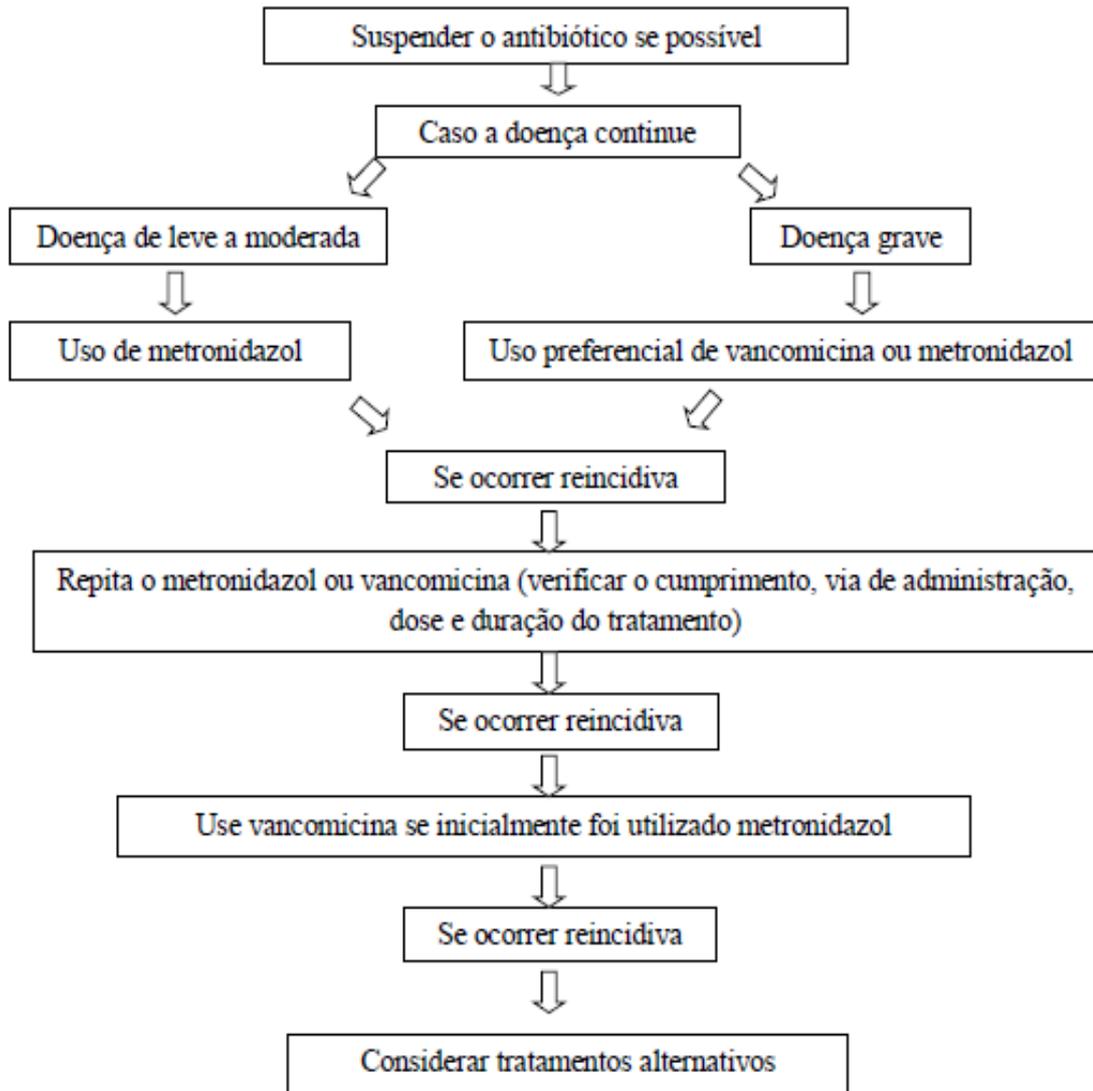
No tratamento da DACD (Figura 4), o primeiro passo deve ser suspender o antibiótico que promoveu a infecção pelo bacilo, se for possível (FEKETY, 1997; CIMOLAI, 2011). Os fármacos de primeira linha para o tratamento da DACD são metronidazol e vancomicina via oral já que o *C. difficile* fica restrito a luz colônica, sendo que estes têm taxas de resposta em torno de 90 a 97% (BRICKER *et al.*, 2005; GONZÁLEZ- GARCIA; GÓMEZ- PAVÓN; MARTÍNEZ- PORRAS, 2005).

Segundo Cimolai (2011) a terapia com metronidazol é utilizada por causa do seu baixo custo, com taxa de eficiência de 90% em caso de DACD leve e moderada, além de não promover o aumento da resistência bacteriana, no entanto as taxas de resposta ao metronidazol podem estar mudando sugerindo uma eficácia reduzida. A vancomina tem seu uso preferencial em casos mais graves, onde sua eficiência é 10-15% maior que o metronidazol, porém tem custo elevado e pode ocasionar reações de aumento de resistência bacteriana (CIMOLAI, 2011; GONZÁLEZ- GARCIA; GÓMEZ- PAVÓN; MARTÍNEZ- PORRAS, 2005; GERDING, 2009). A fidomicina também pode ser utilizada no tratamento da DACD, mas tem um alto custo, além de uma reincidência de 10% (VENUGOPAL; JOHNSON, 2012). Outras abordagens para prevenir e tratar o DCAD despertam interesse considerável pelo aumento no número de reincidivas, as alternativas a serem utilizadas são o transplante de microbiota fecal, e o uso de probióticos para regular a microbiota intestinal (KOCIOLEK; GERDING, 2016)

Uma grande variedade de preparações probióticas estão sendo submetidas a avaliações clínicas como preventivas DACD, múltiplas revisões sistemáticas e metanálises de probióticos sugerem que pode haver algum benefício para a prevenção da mesma (ALLEN, 2015). No entanto, o maior estudo duplo-cego, controlado por placebo, utilizando lactobacilos e bifidobactérias como probióticos, não mostrou benefício (KOCIOLEK; GERDING, 2016).

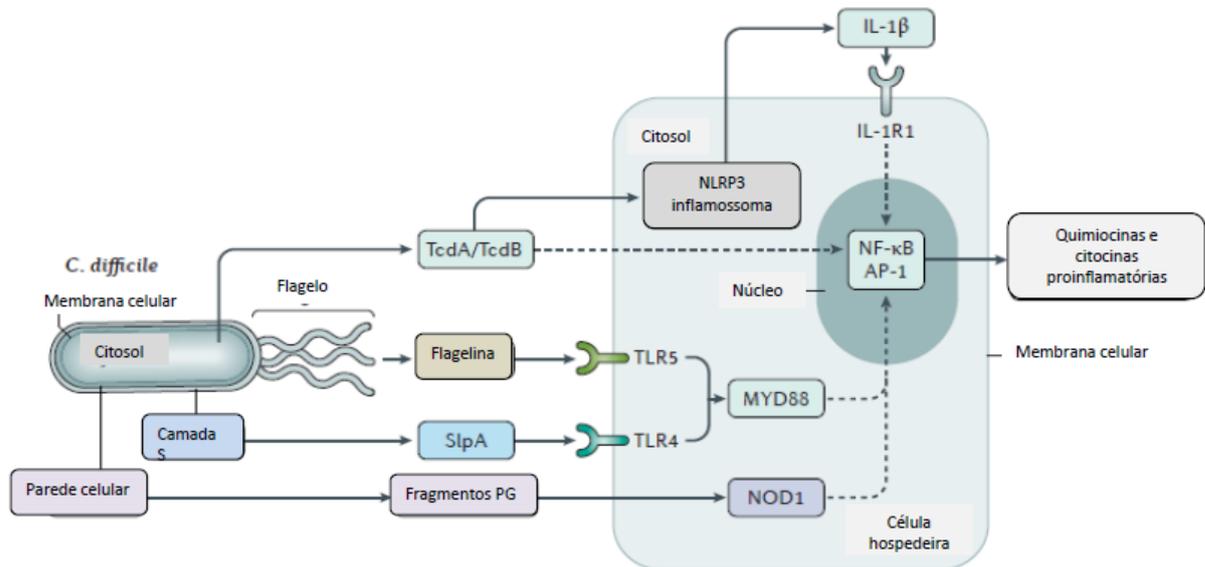
O *C. difficile* ativa a resposta imune inata do hospedeiro (figura 5), através da ativação dos receptores de reconhecimento padrão (PRR's) como: NOD1, nesse caso ativado pelos fragmentos de peptidoglicanos; o receptor TLR - 4, ativado pela SlpA e o TLR-5, ativado pela flagelina, levando a produção de NF-kB, citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, além da produção de compostos antimicrobianos (SMITS *et al.*, 2016). No entanto, os principais fatores de virulência do microorganismo são as toxinas A (TcdA) e B (TcdB).

Figura 4- Esquema de tratamento com metronidazol e vancomicina para infecção causada pelo *Clostridium difficile*.



Fonte: Adaptado de Cimolai 2011.

Figura 5: Resposta inata do sistema imune hospedeiro ao *C. difficile*.



Fonte : Adaptado de Smits et al., 2016. O *C. difficile* provoca a resposta imune inata por pelo menos quatro efetores diferentes, levando a indução de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias via NF-κB e o fator de transcrição AP-1. As toxinas, TcdA e TcdB agem via dependente de inflamossoma NLRP3 (NOD-, LRR- e pirina contendo domínio-3) ou vias independentes. A proteína A de superfície (SlpA) e a flagelina agem via dependente de MYD88 através do receptor tipo Toll 4 (TLR4) e TLR5, respectivamente. A via de indução dependente de NOD1 detecta provavelmente fragmentos de peptídeo glicano (PG) derivados da parede celular do *Clostridium difficile*. Linhas pontilhadas indicam efeitos indiretos.

1.1.3 Toxinas do *Clostridium difficile*

O *C. difficile* produz a enterotoxina toxina A, citotoxina toxina B e a toxina binária (CDT), isolada de cepa NAP1/B1/027. Grande parte da sintomatologia da DACD, como diarreia secretória e inflamação da mucosa intestinal provavelmente é induzida por essas toxinas (JANK; GIESEMANN; AKTORIES, 2007; RUPNIK; JUST, 2006; THELESTAM; CHAVES-OLARTE, 2000). Essas toxinas são citotóxicas, promovendo alterações no citoesqueleto de F-actina e nas junções oclusivas, resultando na diminuição da resistência transepitelial, acúmulo de fluídos e destruição do epitélio intestinal, além da TcdA também estimula a imunidade inata e por consequência mastócitos e macrófagos (POTHOULAKIS, 2000; RIEGLER *et al.*, 1995; RUPNIK; JUST, 2006; SMITS *et al.*, 2016; THELESTAM; CHAVES-OLARTE, 2000). Estudo realizado por nosso grupo de pesquisa, Brito *et al.*, (2002a) mostra que a TcdA também altera a forma e a função dos leucócitos polimorfonucleares, o que

pode estar relacionado com a formação de pseudomembranas. Além disso, esta toxina modifica o funcionamento dos nervos entéricos e neurônios sensoriais resultando no influxo de células inflamatórias, aumentando a secreção de fluidos, inflamação intestinal e a transmigração de neutrófilos (POTHOULAKIS, 2000).

A manipulação genética do *C. difficile* permitiu um maior conhecimento do papel destas toxinas em sua patogênese através da comparação de mutantes, como no estudo publicado por Lyras *et al.* (2009), no qual se demonstrou que o mutante TcdA⁻TcdB⁺ teve a capacidade de levar hamsters a óbito, enquanto o mutante TcdA⁺TcdB⁻ não foi virulenta. Estes resultados estão compatíveis com dados clínicos nos quais a cepa TcdA⁻TcdB⁺ causa toda a sintomatologia característica da DACD, além de experimentos realizados em tecido do colón humano com TcdB e TcdA, que revelaram a primeira mais devastadora na diminuição da função da barreira intestinal e na necrose tecidual quando comparado com a segunda (RIEGLER *et al.*, 1995). No entanto, Kuehne *et al.*, (2010) mostraram que a TcdA pode causar DACD na ausência de TcdB. Nesse trabalho, os pesquisadores usaram um modelo de mutantes isogênicos do *C. difficile* produzindo apenas TcdA ou TcdB e constataram que estas, isoladamente, podiam causar DACD fulminante em modelos de infecção em hamster, através de um gene “knockout”, no qual inativa permanentemente a expressão gênica da toxina. Além disso, observou-se que o *C. difficile* produzindo uma ou ambas as toxinas apresentaram atividade citotóxica *in vitro*, restabelecendo a importância da TcdA e TcdB para DACD (KUEHNE *et al.*, 2010).

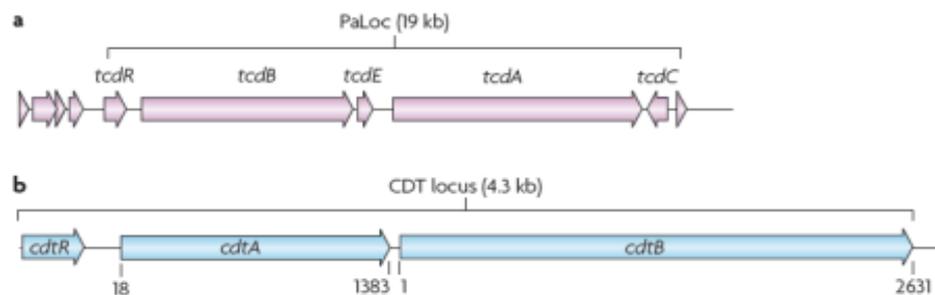
As TcdA e TcdB compõem um grande grupo das toxinas clostridiais (LCTs), nas quais estão incluídas o TcsL e TcsH do *Clostridium sordellii*, TcnA de *Clostridium novyi* e TcpL de *Clostridium perfringens* tipos B e C, que tem por característica glicosilar proteínas da família GTPases de células do paciente infectado promovendo alterações em seu citoesqueleto (JANK; GIESEMANN; AKTORIES, 2007; THELESTAM; CHAVES-OLARTE, 2000).

As cepas toxicogênicas abrigam uma ilha genômica de 19,6 Kb chamado Locus de patogenicidade (PaLoc) (Figura 6), contendo cinco genes: dois genes do PaLoc codificam a toxinas TcdA (309 kDa) e TcdB (267 kDa), respectivamente, e outros três genes que regulam a produção e secreção das toxinas, sendo estes tcdR, tcdC e tcdE. (BELLA *et al.*, 2016; POTHOULAKIS, 2000; SMITS *et al.*, 2016).

O gene tcdR, membro da família ECF, codifica um fator sigma RNA polimerase que é responsável pela expressão dos genes tcdA e tcdB (MANI; DUPUY, 2001); o tcdC codifica um fator anti-sigma, que regula negativamente a produção de toxinas, sendo que no

ribotipo 027 existe uma mutação no gene *tcdC*, aumentando a virulência da cepa (HUNDSBERGER *et al.*, 1997; SMITS, 2013); *tcdE*, codifica uma proteína lítica, semelhante à proteína “holins”, que pode facilitar a liberação da TcdA e TcdB ao ambiente extracelular (BELLA *et al.*, 2016; DUPUY *et al.*, 2008; MATAMOUROS; ENGLAND; DUPUY, 2007; SMITS *et al.*, 2016; TAN; WEE; SONG, 2001). A CDT é composta por duas proteínas *cdtA* e *cdtB* (figura 6), esta última se liga às células hospedeiras e transloca *cdtA* no citosol, que é o componente catalítico (RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009). Os genes que codificam *cdtA* e *cdtB* estão localizados nos locos da toxina binária (Cdtloc), juntamente com outro gene regulador *cdtR* (CARTER *et al.*, 2007). Mesmo com essas informações o papel do CDT na DACD não é bem esclarecido. Geric *et al.* (2006) mostrou que tipos selvagens de cepas que produzem CDT, mas não produzem TcdA e TcdB, podem colonizar hamsters, mas não matar. Portanto torna-se necessário mais estudos a fim de esclarecer o papel da CDT na doença associada ao *C. difficile*.

Figura 6- Locus de patogenicidade das toxinas produzidas pelo *Clostridium difficile*.

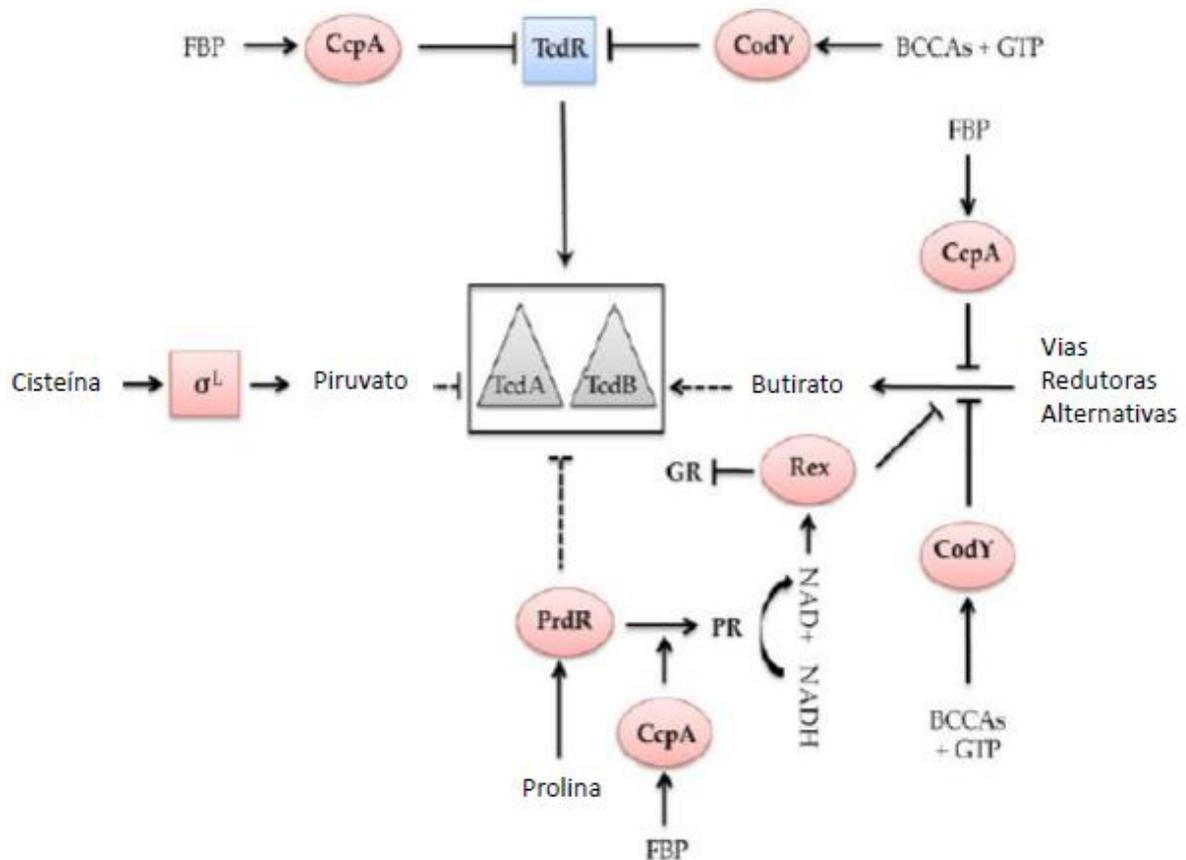


Fonte: Adaptada de Rupnix, Wilcox e Gerding (2009). **a.** A toxina A do *Clostridium difficile* (TcdA) e a toxina B do *Clostridium difficile* (TcdB) são codificadas no locus de patogenicidade (PaLoc), que é composta de cinco genes. Cepas não toxicogênicas, esta região é substituída por uma curta sequência de 115bp. Ambas as toxinas são proteínas de cadeia simples. **b.** A toxina binária do *Clostridium difficile* (CDT) compreende três genes, codificado em uma região separada do cromossomo (CdtLoc), é composta de duas proteínas desvinculadas, sendo *cdtB* que tem uma função de ligação e o *cdtA* é o componente enzimático.

As toxinas TcdA e TcdB são produzidos pelo bacilo durante o final da fase de crescimento logarítmico e a fase estacionária. Sua produção depende de fatores como os níveis

de nutrientes, temperatura e presença de antibióticos em níveis subinibitórios (DUPUY *et al.*, 2008; SAXTON *et al.*, 2009). Conforme Martin-Verstraete, Peltier e Dupuy (2016), a regulamentação do PaLoc do *C. difficile* é muito complexa pois envolve diversos fatores como: limitação de nutrientes, disbiose e a detecção de densidade celular, além de vários reguladores metabólicos globais, como CcpA, Cody, SigI, PrdR e Rex, que do ponto de vista da bactéria, o aumento da virulência serve como uma forma de aumentar a disponibilidade de nutrientes. Os metabólitos como: isoleucina, valina, leucina e butirato podem regular a síntese de *C. difficile* (Figura 7), através das vias do CcpA e CodY (DINEEN *et al.*, 2007; ANTUNES, MARTIN-VERSTRAETE e DUPUY, 2011).

Figura 7 – Efeito das proteínas regulatórias e metabolitos sobre a síntese de toxinas do *C. difficile*.



Fonte: Adaptado de Martin-Verstraete; Peltier e Dupuy, 2016. Os metabólitos que ativam as proteínas reguladoras são: FBP, frutose- 1,6-bifosfato, BCAA, aminoácidos de cadeia ramificada, NAD, dinucleotídeo adenina nicotinamida. As vias que modulam negativamente incluem GR, redutase glicina, produção de butirato e succinato. Os quadrados correspondem aos fatores alternativos, enquanto os círculos aos reguladores de

transcrição, os triângulos as toxinas. As linhas com seta indicam controles positivos, as linhas com barra indicam controle negativo e o tracejado mecanismos ainda não elucidados.

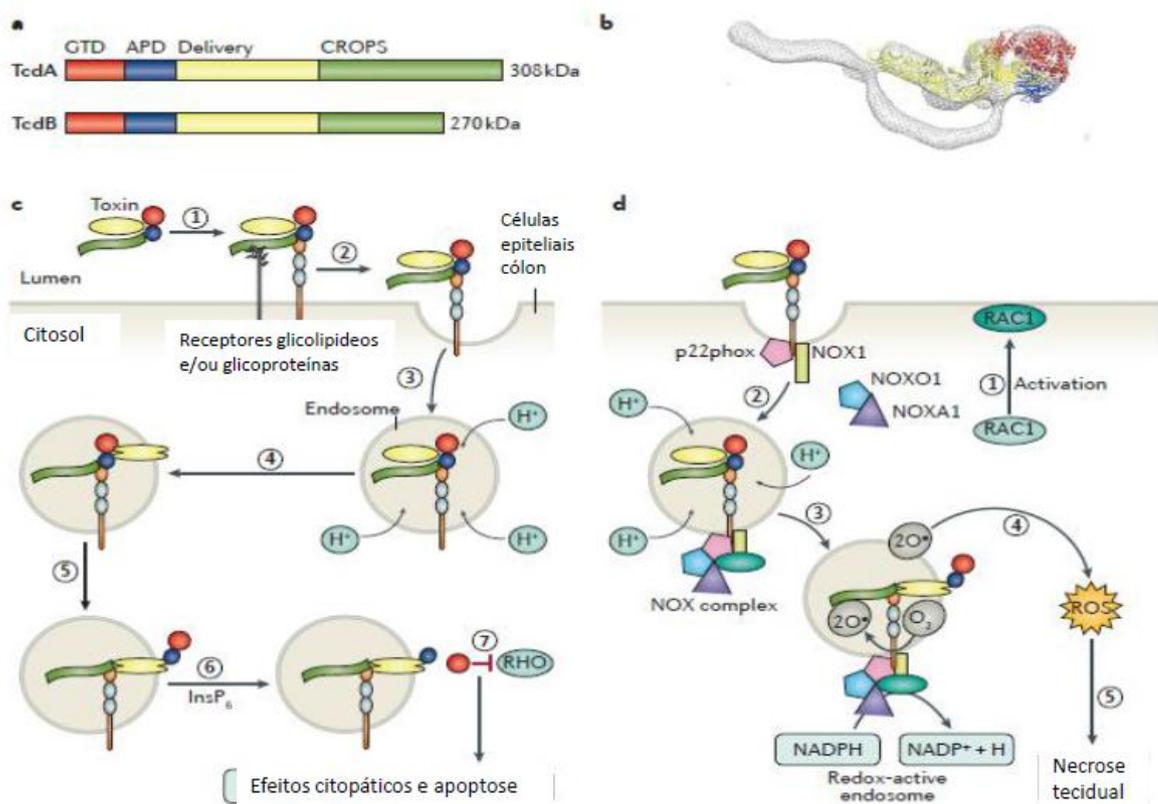
Jank e Aktories (2008) mostraram que a TcdA e a TcdB tem uma estrutura de domínio multi-modular (Figura 8), como o modelo ABCD, que compreende: (A) Extremidade N-terminal biologicamente ativo que contém um domínio glicosiltransferase (GTD), sendo este responsável pela glicosilação das GTPases (BELLA *et al.*, 2016; DAVIES *et al.* 2011); (B) extremidade C-terminal, que interage com estruturas de carboidratos como o Gal- α (1,3)-Gal β -(1,4)-GlcNAc sobre as células epiteliais do hospedeiro, formando o domínio *binding receptor* (RBD), este forma combinações repetitivas de estruturas oligopeptídicas (CROPs) e o mesmo quando se liga ao íon cálcio aumenta a potência da toxina (BELLA *et al.*, 2016; JANK; GIESEMAN; AKTORIES, 2007; NA *et al.*, 2008); (C) a região C corresponde ao domínio cisteína protease (CPD), faz parte da região hidrofóbica e desempenha um papel na clivagem proteolítica da toxina, pois TcdA e TcdB sofrem um processo auto-catalítico de clivagem, na presença de InsP₆; (D) a região hidrofóbica, domínio D (DD) está envolvido na formação de poros, sendo dependente de fatores como pH e da neutralização das cargas. (BARTH *et al.*, 2001; BELLA *et al.*, 2016; QA'DAN *et al.* 2000).

O mecanismo de absorção das toxinas (Figura 8) é complexo e pode sofrer alterações de acordo com ribotipo, porém o mesmos podem ser descrito em sete passos, a fim de facilitar o entendimento,: (1) ligação da toxina ao receptor da superfície da célula hospedeira; (2) a internalização da toxina através do processo de endocitose mediada por receptores; (3) acidificação do endossomo; (4) formação do poro; (5) libertação de GTD do endossomo para o citoplasma da célula hospedeira; (6) inativação por glicosilação da Rho GTPases ; e (7) os efeitos citopáticos e citotóxicos no hospedeiro (BELLA *et al.*,2016; DAVIES *et al.*, 2011; SMITS *et al.*,2016).No primeiro momento, ocorre a ligação do domínio RBD (Figura 8) aos receptores da superfície celular seguida da endocitose da toxina para endossomo que entra na célula através de endocitose e requer um endossoma acidificado para a translocação. Com efeito, a acidificação do endossoma é necessária para alterar a estrutura da toxina através de uma mudança conformacional induzida pelo pH mais provavelmente entre região de recorte e do CPD. Por sua vez, isso permite a exposição de regiões hidrofóbicas que facilitem a entrada para o citosol da célula hospedeira (BARTH *et al.*, 2001; BELLA *et al.*, 2016; QA'DAN *et al.*, 2000).

As duas toxinas do *C. difficile* parecem interagir em diferentes receptores. Os receptores da TcdA são: sacarase-isomaltase e glicoproteína 96 (gp96), expressos em

membranas apicais dos colonócitos manos e no citoplasma, facilitando a entrada da toxina na célula, além de participar do processo de sinalização da cascata inflamatória e citotoxicidade (NA *et al.*, 2008). Enquanto que os receptores específicos para TcdB são: o proteoglicano sulfato de condroitina 4 (CSPG4) e o receptor-like poliovirus 3 (PVRL3) necessários para a citotoxicidade mediada por TcdB (YUAN *et al.*, 2015). Olling e colaboradores (2011) mostra que a presença dos CROPs não é estritamente necessária para desencadear as funções biológicas das toxinas, inclusive mostrando que TcdA e TcdB sem CROPs são capazes de causar arredondamento celular, devido a um receptor independente.

Figura 8 – Domínio das toxinas do *Clostridium difficile* e o seu mecanismo de absorção.



Fonte: Adaptada de Davies *et al.*, (2011) e Smits *et al.*, (2016). A toxina A do *Clostridium difficile* (TcdA) e a toxina B do *Clostridium difficile* (TcdB) são compostas por quatro domínios respectivamente: Domínio N-terminal (azul escuro); Domínio cisteína protease (verde); Domínio hidrofóbico (amarelo) e Domínio C-terminal (vermelho). (A) Estrutura tridimensional da toxina (B). Mecanismo de absorção das toxinas (C. e D.)

Em seguida, é observado a diminuição do pH no compartimento endossomal, o que causa uma mudança conformacional nas proteínas da toxina, permitindo a formação de poros e a translocação de parte dessa para o citosol (BARTH *et al.*, 2001; QA'DAN *et al.*, 2000). As cepas consideradas hipervirulentas têm a maior capacidade de penetrar nas células mais rapidamente por necessitarem de um pH menos ácido para sofrerem as mudanças conformacionais que são essenciais para translocação das toxinas, contribuindo para o surgimento de novos casos de DACD (LANIS; BARUA; BALLARD, 2010). Uma vez no citoplasma, as toxinas passam por uma clivagem autocatalítica dependente de Insp6 com a liberação de GTD, que faz glicosilação de vários membros da subfamília Rho, sendo a principal reação a transferência de uma unidade de glicose a partir de a UDP-glicose ao resíduo Thr35 / 37 das proteínas Rho (DAVIES *et al.*, 2011; GENTH *et al.*, 2008). A inativação da proteína Rho é considerada uma via essencial para patogênese da DACD (JUST *et al.*, 1995).

A proteína Rho, pertencente à família de proteínas Ras, têm múltiplas funções, tais como a regulação do citoesqueleto de actina, miosina de filamentos (fibras de stress), de progressão do ciclo celular, e de divisão celular, bem como a regulação da fagocitose e produção de citocinas, provocando, assim, os denominados efeitos citopáticos e citotóxicos (Figura 8). Os efeitos citopáticos principais são: o encolhimento e arredondamento das células, e inicialmente acompanhada por uma formação de neurites, como fibras de retração de bloqueio à sinalização da Rho-dependente e causando a ruptura do citoesqueleto de actina e das junções aderentes, a perda de contatos célula-célula, e aumento da permeabilidade epitelial, todos os quais são provavelmente a causa da diarreia (SANTOS *et al.*, 2013). Os efeitos citotóxicos são igualmente associados com a ativação do inflamassoma pela RhoA glicosilada, que é provavelmente a causa da inflamação e colite induzida por *C. difficile* (Na *et al.*, 2010).

1.1.3.1 Toxina A do *Clostridium difficile*

Esta toxina é uma proteína de alto peso molecular (308 kDa) e o seu uso purificado no lúmen intestinal *in vivo* causa alterações no epitélio intestinal, secreção intestinal, intensa inflamação da mucosa e colite hemorrágica (LYERLY *et al.*, 1988). A monoglicosilação da proteína Rho é considerado o principal efeito da TcdA e esta modificação está relacionada com as alterações no citoesqueleto de F-actina, retração celular, perda de adesão celular e o arredondamento das células em cultura (JUST *et al.*, 1995; HALL, 1998; SANTOS *et al.*, 2013).

A TcdA estimula a liberação de mediadores endógenos da inflamação como: fator de necrose tumoral α (TNF-alfa), interleucina (IL) 1, 6 e 8, leucotrieno B₄ (LTB₄) e fator ativador plaquetário (PAF) (FANG *et al.* 1994). Assis (2014) mostrou que experimentos realizados com o sobrenadante do *C. difficile* também induzem a liberação desses mediadores.

Através de um modelo de alça intestinal isoladas de coelho, Lima e colaboradores (1989) mostraram que, após 2h de inoculação dessas alças com TcdA, havia infiltrado neutrofílico na lâmina própria e na superfície epitelial juntamente com a destruição da mucosa. Um artigo publicado pelo nosso grupo, utilizando a fucoidina, que é um inibidor de moléculas de adesão essenciais para migração leucocitária, em um modelo de alça isolada de camundongo injetada com TcdA, resultou em uma redução na secreção e infiltração celular inflamatória e do dano de mucosa (BARRETO *et al.* 2008). Nas alças ileais de camundongos injetadas com TcdA também observamos um aumento nos níveis de adenosina deaminase (ADA), que é uma enzima responsável pela degradação da adenosina e desempenha um importante papel nas reações inflamatórias. A utilização de um agonista do receptor A_{2A} de adenosina resultou na redução na secreção, lesão tecidual e infiltração de células inflamatórias induzidas pela TcdA, revelando outra via relevante para a fisiopatologia da colite causada pela TcdA (CAVALCANTE *et al.*, 2006; FOSCHETTI, 2014). Ao ser utilizado o EHNA, o inibidor da enzima adenosina desaminase, neste mesmo modelo, observou-se uma redução da destruição da mucosa intestinal, infiltração neutrofílica e secreção (JUNQUEIRA *et al.*, 2011). Em modelo de infecção com TcdA no ceco, observou-se um aumento da expressão dos receptores de adenosina, principalmente o receptor A_{2B} e ao ser utilizado um inibidor deste receptor, notou-se uma redução de todos os efeitos inflamatórios causados pela TcdA. (FOSCHETTI, 2014).

Conforme Lyerly e colaboradores (1988), a lesão causada pela TcdA do *C. difficile* está associada ao influxo de neutrófilos para dentro da mucosa colônica, inclusive polimorfonucleares característicos da colite pseudomembranosa. Em estudo publicado por Brito *et al.* (2002a, b) sobre o efeito da TcdA purificada *in vitro* sobre a forma e a função de leucócitos polimorfonucleares (PMNL). Essa toxina induziu mudanças na forma, que foi acompanhada pelo rearranjo do citoesqueleto de F-actina. Os PMNL que receberam TcdA mostraram maior aderência a componentes de matriz extracelular e expressaram menos L-selectina e mais Mac-1, em comparação ao grupo não tratados, sendo estes efeitos ocasionados possivelmente pela capacidade da TcdA glicosilar Rho GTPases em neutrófilos humanos (BRITO *et al.*, 2002b). Neste mesmo ano, o grupo também mostrou alguns mecanismos através dos quais a TcdA pode induzir a apoptose em células epiteliais intestinais

colônicas humanas (T-84), verificando que o processo de apoptose era dependente do tempo de incubação e da dose de TcdA utilizada, e que o processo de apoptose era completamente inibido pelo bloqueio da atividade enzimática da toxina na Rho GTPases com uridina-5-difosfato-2,3-dialdeído e parcialmente inibida quando se utilizava inibidores de caspases 1, 3, 6, 8 e 9. Portanto, a TcdA induzia a apoptose pelo mecanismo dependente da inativação de Rho, ativação das caspases 3, 6, 8 e 9, Bid e por lesão mitocondrial (BRITO *et al.*, 2002a). Estudo realizado por Kim e colaboradores (2007) mostrou que a tal toxina também induz a liberação de prostaglandina E₂ (PGE₂) que promove a ativação do fator NF- κ B e do sistema Fas/FasL causando apoptose e inflamação de forma conjunta com os outros fatores anteriormente mostrados.

Lima e colaboradores (2014) verificaram que a TcdA do *C. difficile* inibe de forma dose dependente a via de sinalização Wnt/ β -catenina em cultura de células epiteliais intestinais, estando essa via provavelmente ligada a monoglicosilação da Rho GTPases (SANTOS *et al.*, 2013). A TcdA também ativa a via do TGF- β 1, aumentando a sua expressão gênica e do seu receptor T β RII, em cultura de células intestinais e em animais, induzindo a translocação nuclear do Smad 2/3, atuando na transcrição dos genes alvo (VERAS, 2015).

Outros estudos do nosso grupo (BRITO *et al.*, 2005; CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2006; NASCIMENTO *et al.*, 2005 e SANTOS *et al.*, 2013) mostram o efeito de micronutrientes como glutamina e alanil-glutamina exercem efeito protetor na lesão induzida pela TcdA, inclusive promovendo a proliferação das células epiteliais intestinais.

1.2 Sistema Nervoso Entérico

O sistema nervoso entérico (SNE) é uma divisão do sistema nervoso, o qual consiste de feixes nervosos interconectados e gânglios que estão localizados dentro da parede de órgãos tubulares do trato gastrointestinal (TGI), pâncreas e sistema biliar e estes circuitos possuem grande importância para o perfeito funcionamento do sistema digestório (FURNESS, 2006). O conceito inicial de SNE derivou dos estudos de Langley (1903) apud Furness (2006) em 1921, que chamou a atenção para um grande número de neurônios que apresentaram características diferenciais de outras divisões do sistema nervoso, apresentando um grau de independência do sistema nervoso central, devido à presença de neurônios sensoriais, interneurônios e neurônios motores que formam trajetos reflexos que são intrínsecos no intestino (FURNESS, 2006).

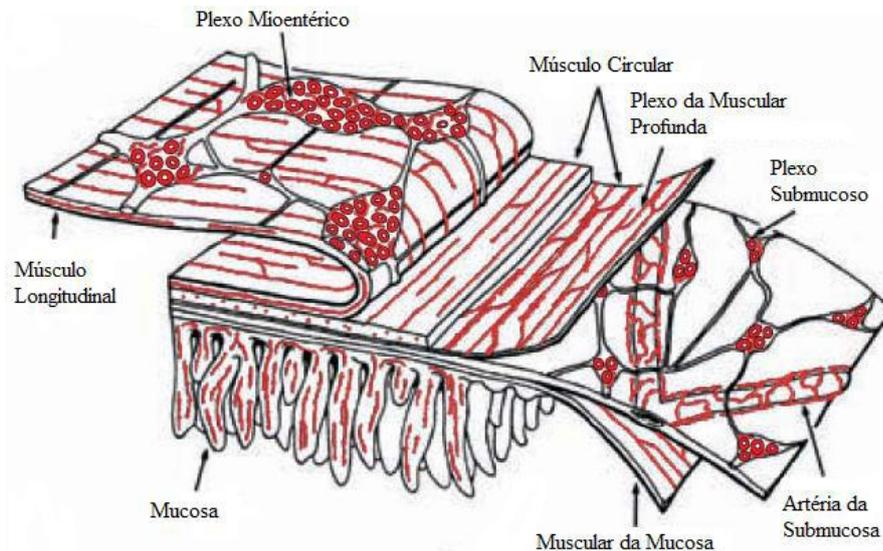
O SNE foi considerado como a porção pós-ganglionar da divisão parassimpática do sistema nervoso autônomo (SNA), e durante muito tempo, foi reconhecido como uma divisão própria do sistema nervoso autônomo, pois existem reflexos polarizados que funcionam no intestino, por influência extrínseca, diferenciando o SNE dos sistemas nervosos simpático e parassimpático. (FURNESS, 2006)

O SNE determina os padrões de movimento do trato gastrointestinal, controlando a secreção de ácido gástrico; o movimento de fluidos através do epitélio de revestimento, o fluxo sanguíneo local e interação com os sistemas imunológico e endócrino. Contribui ainda, através das células gliais, para manter a integridade da barreira epitelial entre o lúmen do intestino e das células e tecidos no intestino (NEULINST *et al.*, 2014). As células gliais entéricas (CGE) formam uma vasta rede na mucosa do TGI, realizando a ponte celular e molecular entre os nervos entéricos, células enteroendócrinas, células do sistema imunológico e células epiteliais (SHARKEY, 2015).

Segundo Furness e Costa (1987) e Neulinst e colaboradores (2014), o SNE compõem-se por dois grandes plexos nervosos interconectados, o plexo mioentérico e o plexo submucoso. O plexo mioentérico (figura 9) (ou de Auerbach) localiza-se entre a túnica muscular longitudinal externa e a túnica muscular circular interna, estendendo-se ao longo do trato digestório, desde o esôfago até o reto, enquanto que o plexo submucoso (figura 9) é proeminente nos intestinos delgado e grosso e, divide-se em plexo submucoso interno (plexo de Meissner) abaixo da mucosa, o plexo submucoso externo (plexo de Schabadash ou de Henle) e junto à camada circular do músculo, o plexo intermediário posicionado entre o plexo submucoso

interno e externo. Suas malhas são menores do que o plexo mioentérico, suas fibras interconectadas são mais finas e o gânglio é menor. Este plexo está situado em torno da circunferência e ao longo do intestino, sendo que, um plexo fica próximo do músculo circular e o outro próximo da mucosa (FURNESS, 2006). Além das CGE, existem também duas principais populações: a primeira no SNE, que ultrapassam ligeiramente os neurônios entéricos, sendo encontrado nos plexos submucoso e mioentérico e a segunda que fica localizada abaixo do epitélio ao longo da mucosa intestinal (GULBRANSEN; SHARKEY, 2012)

Figura 9: Representação esquemática da estratigrafia da parede do trato gastrointestinal.

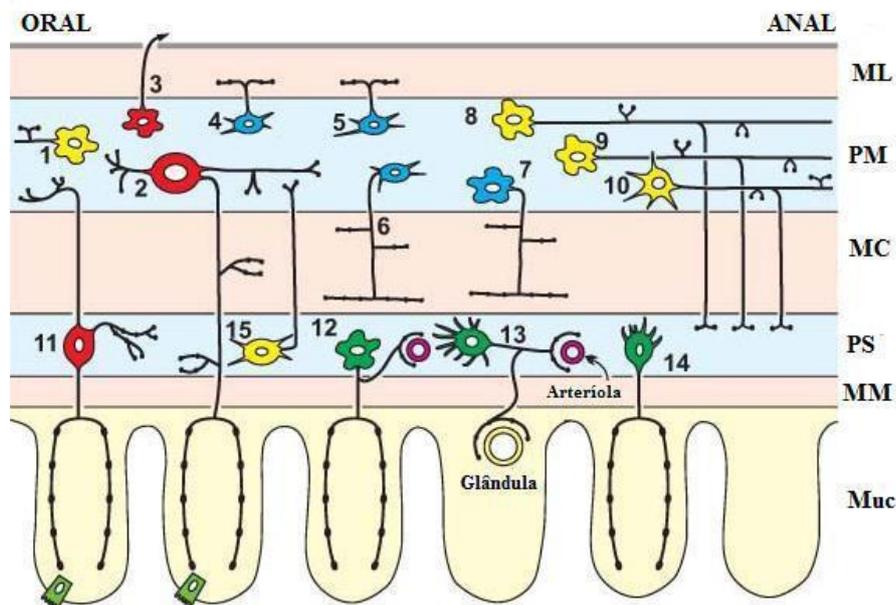


Fonte: Adaptado de Furness, 2006. Este esquema mostra a localização dos plexos mioentéricos e submucoso dentro da parede do trato gastrointestinal.

Os plexos entéricos seguem um padrão ao longo do trato digestório tubular, porém diferenças quanto à densidade e ao tamanho dos neurônios, bem como a forma dos gânglios, podem ser encontradas no mesmo segmento do trato digestório dos animais de mesma espécie e com diferentes idades (SANTER, 1994; SANTER, BAKER, 1988) ou submetidos a condições experimentais como a desnutrição (GREGGIO *et al.*, 2010; CASTELUCCI *et al.*, 2002) ou em protocolo de inflamação intestinal (VENTURA-MARTINEZ *et al.*, 2008). Portanto a utilização de métodos como: imunohistoquímicos, eletrofisiológicos e morfológicos permitiram o entendimento dos circuitos neurais e neurofisiológicos do SNE e, em consequência destes

estudos, houve a descoberta de que cada neurônio entérico contém vários códigos químicos, o qual indica as suas funções. Estes estudos utilizaram combinações metodológicas que permitiram a descoberta em torno de 14 tipos funcionais de neurônios entéricos somente no intestino (figura 10) (FURNESS, 2006).

Figura 10 – Representação esquemática dos 14 tipos de neurônios do SNE



Fonte: Adaptado de Furness, 2006. Esta figura mostra os 14 tipos de neurônios entéricos sendo: 1. Interneurônio ascendente; 2. Neurônio aferente primário intrínseco mioentérico; 3. Neurônio intestino-fugal; 4. Neurônio motor excitatório do músculo longitudinal; 5. Neurônio motor inibitório do músculo longitudinal; 6. Neurônio motor excitatório do músculo circular; 7. Neurônio motor inibitório do músculo circular; 8. Interneurônio descendente (reflexos locais); 9. Interneurônio descendente (reflexo secretomotor); 10. Interneurônio descendente (complexo mioelétrico migratório); 11. Neurônio aferente primário intrínseco submucoso; 12. Neurônio vasodilatador/secretomotor não-colinérgico; 13. Neurônio vasodilatador/secretomotor colinérgico; 14. Neurônio secretomotor (não-vasodilatador) colinérgico, Músculo longitudinal (ML), Plexo mioentérico (PM), Músculo circular (CM), Plexo submucoso (PS), Muscular da mucosa (MM), Mucosa (Muc).

Com o estudo dos códigos químicos foi possível começar a identificar os diferentes tipos de neurônios. Os neurônios colinérgicos entéricos foram identificados pela técnica de imunohistoquímica somente no início da década de 80 (FURNESS *et al.*, 1983). Desde as primeiras descrições de Hokfelt e sua equipe (HÖKFELT *et al.*, 1975) sobre a presença de somatostatina em neurônios entéricos, a localização de outros neuropeptídeos tornou-se alvo de inúmeros estudos (COSTA; FURNESS, 1983). A partir destes estudos, foi revelada a presença

de neuropeptídeo Y (NPY), substância P (SP), peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e serotonina em neurônios entéricos. Foi ainda demonstrada a co-existência de neuropeptídeos dos mesmos grupos neuronais, tanto do SNC quanto do SNE (HOKFELT *et al.*, 1984), marcando o início de uma nova era nos estudos da codificação neuroquímica de neurônios.

Cada plexo contém vários tipos neuronais, incluindo os neurônios motores, interneurônios e neurônios aferentes primários intrínsecos (IPANS) que reflexamente controlam as funções gastrintestinais (FURNESS 2006; SAYEGH; RITTER, 2003). A rede neural do plexo mioentérico está predominantemente envolvida com a regulação reflexa das atividades contráteis da musculatura externa, enquanto que os neurônios motores do plexo submucoso estão relacionados com o controle das atividades secreto motora e vasomotora da túnica mucosa (FURNESS *et al.*, 2003).

Conforme Furness e colaboradores (1995), os neurônios motores podem ser divididos em dois grupos, os excitatórios e os inibitórios. Ambos inervam as túnicas musculares e a muscular da mucosa em todo TGI. Os principais neuromediadores encontrados nos neurônios excitatórios são a acetilcolina (ChAT) e as taquicininas. Os neurônios inibitórios possuem vários neuromediadores, como NO (óxido nítrico), VIP e adenosina trifosfato (ATP), enquanto os interneurônios são identificados em todas as camadas do TGI, sendo que sua constituição neuroquímica varia muito, dependendo do órgão em questão.

Os IPANs, por alguns denominados de neurônios sensoriais, traduzem e codificam informações sobre o ambiente químico e estado físico do tecido que eles inervam, e transmitem essa informação para um circuito neuronal integrado, através do qual o estado funcional do órgão pode ser modificado (HOLZER *et al.*, 1991; LEWIS, 1927). Nos plexos mientérico e submucoso, esses neurônios se conectam a outros IPANs, a interneurônios e a neurônios motores (DOGIEL, 1899; GERSHON; KIRCHGESSNER, 1991). Evidências recentes indicam que os IPANs são influenciados por processos inflamatórios, tanto no intestino delgado como no cólon. Em doenças inflamatórias intestinais, as propriedades funcionais dos IPANs são modificadas, alterando conseqüentemente a sinalização sensorial e o controle dos reflexos entéricos (SHARKEY; MAWE, 2002).

Os neuromediadores do SNE possuem atividade considerável sobre o sistema imune. A substância P, por exemplo, é considerada uma molécula pró-inflamatória. Ela estimula a proliferação linfocitária, o tráfego de linfócitos através dos linfonodos e a produção

de IL-2. Além disso, a substância P age como um dos ativadores de células *Natural Killer* (NK) e mastócitos e possui ação quimiotática para monócitos e neutrófilos. Já o neuropeptídeo VIP inibe a resposta de células NK e de linfócitos T, bem como a produção de IL-2 e IL-4 por estas células. Por outro lado, VIP estimula a quimiotaxia de monócitos e a produção de IL-5 por linfócitos (MCKAY; FAIRWEATHER, 1997). As CGEs expressam marcadores como proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e fração beta da proteína s100 (S100 β), além de relacionarem-se com sistema imune através da expressão de receptores *toll-like* (TLR), iniciando a resposta imune inata, além de responderem a estímulos inflamatórios como ATP extracelular, Ca²⁺ intracelular, dentre outros (OCHOA-CORTES *et al.*, 2016; RÜHL, 2015).

Portanto, o estudo do código químico depende da detecção da imunorreatividade aos anticorpos produzidos contra o marcador neuronal, assim como os neurotransmissores, receptores, proteínas citoesqueléticas, ou enzimas nos neurônios entéricos como, por exemplo, óxido nítrico sintase (NOS), P2X, calbindina (Calb) e neurofilamento-N (CASTELUCCI *et al.*, 2002; FURNESS, 2006; SAYEGH; RITTER, 2003). Dentre os códigos químicos mais estudados na investigação dos neurônios entéricos temos: a acetilcolina (ACh), calbindina (Calb), calretinina (Calr), colecistoquinina (CCK), colina acetiltransferase (ChAT), encefalinas (ENK), 5-hidroxi-triptamina (5-HT), neurofilamento-N (NF-N), óxido nítrico sintase (NOS), neuropeptídeo Y (NPY), somatostatina (SOM), peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e a família dos receptores purinérgicos (P2X) (ANLAUF *et al.*, 2003; CHIOCCETTI *et al.*, 2003). Dentre a família dos receptores purinérgicos, neste trabalho será destacado o P2X7, pois estudos indicam um grande envolvimento desse receptor purinérgico nas funções imunológicas e no processo de inflamação intestinal (ANTONIOLI *et al.*, 2014).

1.3 Receptor P2X7

O receptor P2X7 é um membro original da família P2X e participa na regulação da permeabilidade celular, liberação das citocinas e na apoptose. É expresso em células lineares hematopoiéticas, monócitos, macrófagos e nas CGE (FERRARI *et al.*, 1999; GULBRANSEN *et al.*, 2012). Em 1996, Surprenant e colaboradores, clonaram uma forma do receptor purinérgico P2X7, a partir de cérebros de rato, que desempenha um papel essencial na liberação de IL-1 β . Estes dados concordam com o suposto papel deste receptor no reparo do cérebro após a inflamação, infarto, apoptose, hipóxia ou o insulto imune (FERRARI *et al.*, 1999).

Em adição, tem sido demonstrada a presença do receptor P2X7 em fibroblastos humanos (SOLINI *et al.*, 2000), no epitélio e na bexiga urinária humana (O'REILLY *et al.*, 2001), na uretra de humanos e ratos (SLATER *et al.*, 2000; TASSELL *et al.*, 2000), nos órgãos genitais masculinos de humanos e de ratos (LEE *et al.*, 2000), nas células do ducto e acinares da glândula parótida (LI *et al.*, 2003), no epitélio intestinal (SOUZA *et al.*, 2012) e no SNE (PALOMBIT *et al.*, 2013).

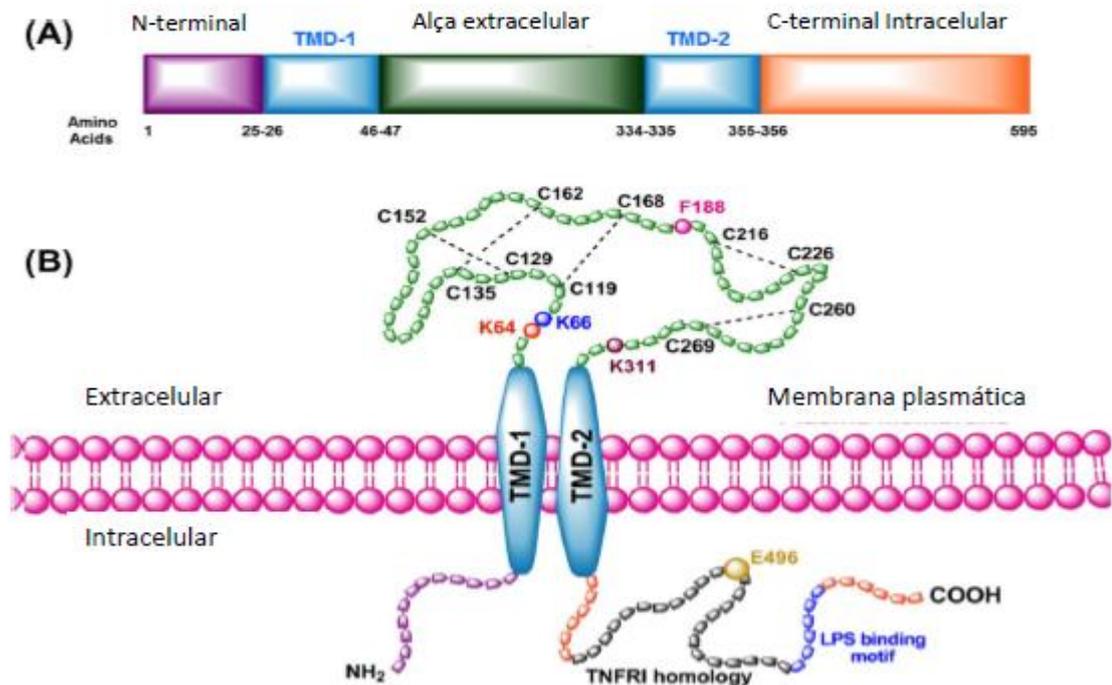
O receptor P2X7 desempenham uma série de funções importantes no sistema imune, como a secreção de citocinas por macrófagos, e ao utilizarem uma molécula antagonista desse receptor, foi observado um papel benéfico na gestão de várias doenças inflamatórias como: aterosclerose, distúrbios do sistema nervoso central, diabetes, osteoartrite, tuberculose, doença pulmonar obstrutiva crônica, asma, e doença inflamatória intestinal entre outras (MEHTA *et al.*, 2014; MCCULLOCH, DOWNEY, EL-GABALAWY, 2006; MOLLER, VILLIGER, 2006).

1.3.1 Estrutura e mecanismo de ação do receptor P2X7

Segundo Mehta e colaboradores (2014) e Volonté e colaboradores (2012), o gene responsável pela expressão do receptor de P2X7, que está localizado cromossomicamente em seres humanos na posição 12 (q24.31), codifica um polipeptídeo de 595 aminoácidos e estrutura gênica com 13 exons e múltiplas variantes. Cada unidade P2X7 é caracterizada por um domínio amino intracelular terminal relativamente curto e um domínio carboxi-terminal longo, bem como dois segmentos que atravessam a membrana hidrofóbica (domínios transmembranares) separadas por uma cadeia extracelular longa glicosilada com domínio de ligação ao ATP (Figura 11), com peso molecular de 69 kDa. No entanto, a N-glicosilação em sua alça extracelular aumenta o peso molecular da proteína para cerca de 75-85 kDa. (FENG *et al.*, 2005;

MEHTA *et al.*, 2014; PELEGRIN; BARROSO-GUTIERREZ; SURPRENANT, 2008; VOLONTÉ *et al.* 2012).

Figura 11: Respresentação esquemática do receptor P2X7.



Fonte: Adaptado de Metha *et al.*, 2014. Domínio estrutural (A), proteína de cadeia longa, composta por aminoácidos 595 (N-terminal: 1-25; DTM-1: 26-46; alça extracelular: 47-334; DTM-2: 335-355; C-terminal: 356-595); Topologia na membrana (B), o domínio extracelular contém dez resíduos de cisteína (Cys119, 129, 135, 152, 162, 168, 216, 226, 260 e 269), que formam pontes dissulfeto entre as subunidades. Os aminoácidos K64, K66, K311 e F188 são fundamentais para ativação do receptor pelo ATP. "K" e "F" representa os aminoácidos lisina (Lys) e fenilalanina (Phe), respectivamente o aminoácido Glu496 é importante para a formação dos poros que é atividade do receptor P2X7. DTM, domínio transmembrana; TNFR1, receptor de factor de necrose tumoral-1; LPS, lipopolissacárido.

Conforme Fuller *et al.* (2009), este gene P2X7R é altamente polimórfico, levando muitas vezes a substituições que conferem a perda de função proteica, concordando Adriouch *et al.* (2002) e Le Stunff *et al.* (2004), os quais demonstram que as mutações alélicas e a existência de polimorfismos na extremidade C-terminal do P2X7 ocasionam a perda de função de poro do receptor. Portanto, o receptor P2X7 humano pode sofrer processamento alternativo gerando até 7 variantes diferentes, inclusive uma em que falta quase toda a extremidade do receptor (CHEEWATRAKOOLPONG *et al.*, 2005). Esta variante é altamente expressa em

vários tecidos, demonstrando que nesses locais houve a seleção de um P2X7 com a função restrita de canal iônico. Ao contrário, a oitava variante descrita para o tal receptor apresenta ganho de função em ambas as funções de canal iônico e de formação de poro (NICKE *et al.*, 2009).

Apesar do receptor P2X7 ser ativado pela concentração de ATP, o mesmo apresenta baixa sensibilidade para ATP quando comparado a outros membros da família de receptores P2X, exigindo concentrações submilimolar a milimolar de ATP para a sua ativação, que é muito maior do que a concentração nanomolar necessário para outros receptores P2X (RODRIGUES; TOMÉ; CUNHA, 2015; SOARES-BEZERRA *et al.*, 2015). Essa cadeia extracelular possui o sítio de ligação ao ATP que parece residir nessa região de folhas β pregueadas, uma vez que substituições de aminoácidos nas lisinas 193 e 311 inibem completamente a captação de brometo de etídio e bário (WORTHINGTON *et al.*, 2002). A ativação de P2X7 por ATP extracelular permite a passagem de cation como Ca^{2+} , Na^{+} e K^{+} , através da membrana plasmática (Figura 11) (CHEN; BROSNAN, 2006; CHESSELL *et al.*, 1998; RASSENDREN *et al.*, 1997; SURPRENANT *et al.*, 1996). No entanto, a estimulação prolongada de ATP conduz à formação de um poro maior reversível, o que permite a absorção de íons orgânicos (CHESSELL *et al.*, 1998; RASSENDREN *et al.*, 1997; SURPRENANT *et al.*, 1996). Aliás, estudos bioquímicos sugeriram a existência de múltiplos sítios de ligação ao ATP, a partir dos coeficientes de Hill derivados das curvas de dose de ATP (KLAPPERSTUCK *et al.*, 2001). Juntamente com experimentos que revelaram não haver mudanças na densidade de receptores P2X7 quando há a formação do poro, essas evidências apontam que provavelmente a ativação da permeabilização celular ativada por ATP dependa mais da mudança conformacional do receptor do que do recrutamento de várias subunidades da proteína (SMART *et al.*, 2002).

Dentre os membros da família dos receptores P2X, o subtipo P2X7 apresenta a extremidade C-terminal mais longa, que é essencial para a habilidade de abertura de poros na membrana plasmática (RASSENDREN *et al.*, 1997; SURPRENANT *et al.*, 1996). Inicialmente, achava-se que somente o P2X7 apresentava essa característica de formação de poro, entretanto, desde 1999, sabe-se que também os receptores P2X2, P2X3 e P2X4 podem dilatar poros que permitem a passagem de moléculas grandes, de maneira progressiva e sob exposição prolongada de agonistas, sendo que esses poros são reversíveis e não causam lise celular (EICKHORST *et al.*, 2002; FUJIWARA; KUBO, 2004; VIRGINIO *et al.*, 1999).

As conexinas (Cx) são conhecidas pela formação de junções de hiato entre duas células adjacentes e pela formação de hemicanais, como na Cx43 que podem estar envolvidos na liberação de ATP extracelular (BROWN *et al.*, 2016). Os canais de panexina (Panx), que apresentam estrutura semelhante aos hemicanais de Cx, estes atuam como canal de liberação de ATP, ativando os receptores purinérgicos, dentre estes sendo considerado de alto interesse no processo de inflamação o P2X7, por ser resistente a sensibilização e pode ser ativado por um período de tempo prolongado (BECKEL *et al.*, 2014; DIEZMOS; BERTRAND; LIU, 2016; NORTH, 2002).

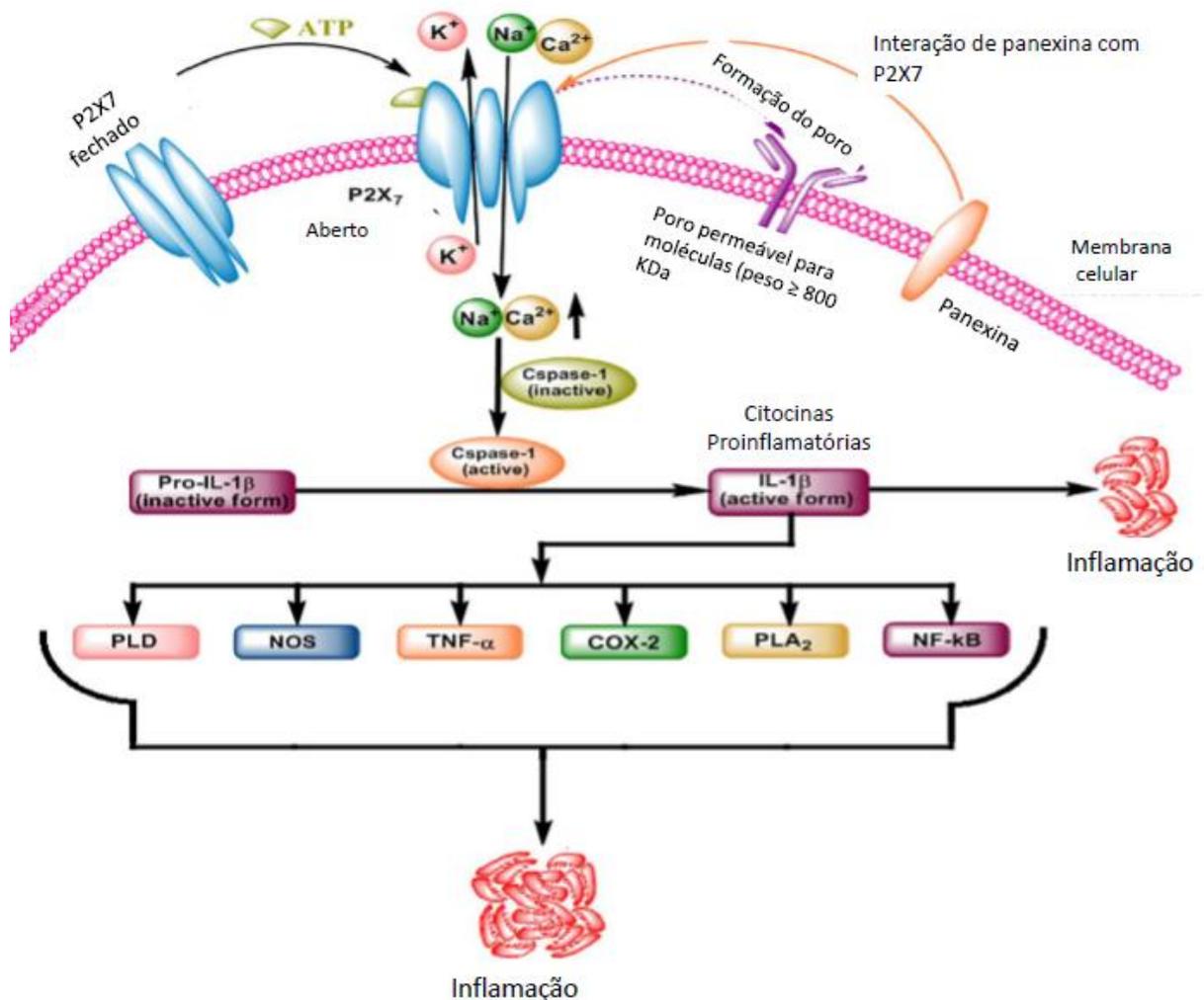
A panexina -1 (Panx-1) mostra interação com P2X7 aumentando a permeabilidade dos poros, indiscriminadamente, para as moléculas que têm peso molecular maior que 800 kDa e brometo de etídio (utilizado como marcador para a atividade de poro)(figura 12) (VIRGINIO *et al.*, 1999). Estudos DIEZMOS; BERTRAND; LIU, 2016; GULBRANSEN *et al.*, 2012; IGLESIAS *et al.*, 2008; MEHTA *et al.*, 2014; PELEGRIN; SUPRENTANT, 2006)mostram que inibidores miméticos de Panx-1 bloqueiam a fase inicial de formação dos poros sem interferir no fluxo de íons, sendo importante a sua atuação na formação dos mesmos, que ao sofrerem uma estimulação prolongada podem ser citotóxicos, além de atuarem em processos fisiológicos de fusão celular e fagocitose.

Em macrófagos (Figura12), por exemplo, a ativação de P2X7 está ligada a abertura dos canais de íons, fazendo com que o efluxo de K^+ seja compensado pelo influxo de Ca^{2+} e o aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular atua ativando caspase 1, que em seguida propicia a ativação de IL-1 β , que desencadeia a inflamação induzindo também outros mediadores inflamatórios como: óxido nítrico sintase (NOS), ciclooxigenase-2 (COX-2), TNF- α , fosfolipase-D (PLD), fosfolipase A2 (PLA2), NF- κ B e proteína-quinases ativada por mitogénio (MAPK) (BURNSTOCK, 2006; DIVIRGILIO, 2006; KAHLENBERG; DUBYAK, 2004; MEHTA *et al.*, 2014; SOLLE *et al.*, 2001). O LPS ativa o TLR-4, induzindo uma produção maciça de componentes inflamatórios, como as citocinas citadas acima, produzindo um inflamassoma, que é secretado no espaço pericelular (DIVIRGILIO 2006; LAFFERTY *et al.*, 2010; METHA *et al.*, 2014).

Marques e colaboradores (2014) e Gulbransen e colaboradores (2012) mostraram que em um modelo de colite induzida por TNBS, os níveis de P2X7 encontram-se elevados e ao fazer uso de um inibidor do receptor P2X7, observou-se uma diminuição nas células T e no infiltrado de macrófagos da *lâmina própria*, além da redução na gravidade global da

inflamação. Diante dos mecanismos relatados e a crescente importância do receptor P2X7 nas doenças inflamatórias intestinais, isquemia intestinal, colite ulcerativa e doença de Chron (GULBRANSEN *et al.*, 2012; PALOMBIT *et al.*, 2013), estudou-se a relação da TcdA do *C. difficile* com o receptor P2X7.

Figura 12: Esquema de sinalização do receptor P2X7.



Adaptada de Shaper, Debetto e Giusti, 2010 e Metha *et al.*, 2014.

1.4 JUSTIFICATIVA

O *Clostridium difficile* é um bacilo gram positivo, anaeróbico e formador de esporos, considerado a maior causa de diarreia nosocomial e infecção; que ocorre principalmente em indivíduos em uso de antibióticos de largo espectro como fluoroquinonas e cefalosporinas (BLOSSOM; MACDONALD, 2007; DIAL *et al.*, 2005). O aumento da incidência foi relevante desde do surgimento da cepa hipervirulenta NAP1/BI/027, que tem coincidido com o uso de antibióticos de amplo espectro (MUTO *et al.*, 2005; SMITS *et al.*, 2016).

Segundo Lessa, Winston e McDonald (2015) apenas no ano de 2015 nos Estados Unidos, o *C. difficile* foi responsável por cerca de 500.000 infecções e 30.000 mortes por ano e paradoxalmente houve 83.000 casos de reincidência, aumentando bastante os custos hospitalares. Estudo de Dial *et al.* (2005) demonstrou o surgimento de casos na comunidade sem estar relacionado ao uso prévio de antibióticos. Sugere-se sobre esses casos que alimentos possam estar envolvidos na transmissão do bacilo de animais para humanos. No Brasil, estudo realizado por Palaciano *et al.*, (2009) durante o período de um ano mostrou que 28,5% dos pacientes internados em um hospital do Rio de Janeiro apresentaram DACD ativa e tiveram a bactéria isolada em 66,7% de suas amostras de fezes. Costa (2014) mostrou que em um hospital de referência para o tratamento de câncer no Ceará observou-se a elevada incidência de DACD (46,3%), sendo a cepa circulante NAP4, encontrada em outros países como Estados Unidos e Canadá, presentes em hospitais e em casos na comunidade.

Nosso grupo de pesquisa vem a alguns anos se dedicando ao estudo do papel da TcdA na patogênese da doença induzida pelo *C. difficile*, bem como sua possível modulação farmacológica, tendo publicado vários trabalhos nesta área (BARRETO *et al.* 2008; BRITO *et al.*, 2002a; BRITO *et al.*, 2002b; BRITO *et al.*, 2005; CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2006; CAVALCANTE *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2016; COSTA *et al.*, 2014; JUNQUEIRA *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2014; MACIEL *et al.*, 2007; MEDEIROS *et al.*, 2011; NASCIMENTO *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2013).

Em estudo realizado por Mantyh, McVey e Vigna (2000) mostrou que ao realizar a deservação extrínica da alça ileal de animais que foram injetados com TcdA observou-se uma melhora de todos os parâmetros inflamatórios analisados. E um estudo de contratilidade realizado por Lima *et al.* (2008) concluiu que, dependendo da dose de TcdA administrada, a motilidade intestinal pode sofrer um pequeno aumento transitório e em seguida sofrer uma depressão podendo extinguir a motilidade espontânea.

O SNE e as CGE tem se destacado no papel central de regulação da homeostase intestinal, bem como suas implicações nas doenças inflamatórias intestinais, pois o SNE é responsável pela regulação de quase todas funções intestinais como motilidade, absorção de nutrientes, resposta imune e fluxo sanguíneo, e as CGE, semelhantes as células gliais do SNC, tem funções relacionadas ao sistema imune (NEUNLIST *et al.*, 2014).

No SNE tem sido reportada a presença do receptor P2X7, cuja a ativação conduz a mudanças rápidas nas concentrações intracelulares de Ca^{2+} , liberação das citocinas pró-inflamatórias, sugerindo papel específico em estados inflamatórios, neuropáticos, na sinalização nociceptiva, em estados crônicos da dor e seu potencial terapêutico (DONNELLY-ROBERTS *et al.*, 2007), em processos pós-infecciosos, na doença inflamatória intestinal (GULBRANSEN *et al.*, 2012) e na isquemia intestinal (PALOMBIT *et al.*, 2013), desempenhando um papel central na inflamação intestinal e são um gatilho para o desenvolvimento de uma hipersensibilidade visceral e processo de apoptose (SOUZA *et al.*, 2012). Tendo em vista o aumento da incidência e da gravidade dos casos de DACD e a perspectiva de modulação do SNE e das CGE através dos receptores purinérgico em processos inflamatórios intestinais, como os estudos relatam, despertou-se o interesse de estudar as possíveis correlações entre a lesão induzida pela TcdA do *C.difficile* e as alterações geradas SNE e nas CGE, e o papel do receptor P2X7 e seus inibidores nessa lesão, com finalidade de contribuir para esclarecimento da patogênese da DACD e proporcionar uma base promissora para desenvolvimento de terapêutica para DACD e outras disfunções intestinais.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Analisar o papel do receptor P2X7 no modelo de enterite induzida pela toxina A do *Clostridium difficile* em camundongos

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a expressão do receptor P2X7 no tecido ileal na enterite induzida pela TcdA.
- Analisar o efeito da TcdA do *C. difficile* na densidade neuronal do plexo mioentérico.
- Avaliar a densidade dos neurônios imunorreativos a NOS, ChAT e Calr e sua colocalização com P2X7 no preparado de membrana, na enterite induzida pela TcdA
- Analisar o efeito da TcdA na morfometria neuronal baseada na área do perfil do pericário dos neurônios imunorreativos ao receptor P2X7, NOS, ChAT e Calr no preparado de membrana.
- Avaliar o efeito da TcdA na marcação de HU, GFAP e S100 no tecido ileal na enterite induzida pela TcdA, através de imunohistoquímica
- Investigar o efeito dos inibidores do receptor P2X7, BBG (inibidor inespecífico) e A438079 (inibidor específico), na enterite induzida pela TcdA, através dos parâmetros histológicos, citocinas e marcação para morte neuronal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Drogas e reagentes

TcdA (cedida pelo professor Dr. Carlos Quezada, da Universidade de Costa Rica), Brilliant Blue G (BBG) (Sigma cedida pela professora Dra. Patrícia Castelucci)- inibidor específico de P2X7, A438079 (Abcam cedida pelo professor Dr. Henning Ulrich, da Universidade de São Paulo) – inibidor específico de P2X7, GFAP (DAKO); S-100 (DAKO), P2X7 (Invitrogen); HuC/D (Invitrogen).

3.2 Animais utilizados para o modelo de enterite induzida por TcdA

Foram utilizados camundongos Swiss fêmeas, com peso variando entre 20 a 25g, procedentes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da UFC, os quais foram mantidos em gaiolas, sob condições de temperatura e umidade, sendo oferecido água e ração *ad libitum*. Os protocolos experimentais estão de acordo com os padrões de uso de animais experimentais e esse projeto foi apreciação pelo comitê de Ética em Pesquisa animal da UFC e aprovado conforme protocolo31/2015.

3.3 Modelo de alça ileal

Os camundongos Swiss, 20-25g, ficaram 12h em jejum, depois foram anestesiados com a mistura de cetamina (100 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg) e em seguida submetidos a cirurgia a abdominal com a finalidade de isolar 5 cm de alça do ileo intestinal conforme descrito por Cavalcante *et al.*, (2006) e Junqueira *et al.*, (2008). Na alça ileal foi injetada salina (cloreto de sódio 0,9%- grupo controle) e /ou toxina A do *C. difficile* (50ug/ alça – grupo TcdA) e nos grupos tratados: receberam, via intraperitoneal (i.p.), BBG (50 mg/kg) (PALOMBIT, 2015) ou A438079 (10 µM sendo injetado 200µL) (GLASER *et al.*, 2014) 1h antes da injeção de salina ou TcdA. Em seguida, todos os animais foram sacrificados, com overdose de xilasina após 4h da injeção com a TcdA ou salina. Foi retirado o íleo destes camundongos para posterior avaliação dos parâmetros inflamatórios, RT-PCR, morfométricos e preparados de membrana.

Os animais foram divididos em seis grupos experimentais: Controle, TcdA, BBG, TcdA+BBG, A438079 e TcdA+A438079. Primeiramente foram anaestesiados apenas os grupos: controle e TcdA e, de acordo com os resultados preliminares, foram adicionados os outros grupos onde há a utilização de um inibidor inespecífico de P2X7, o BBG, e um inibidor específico de P2X7, o A438079.

3.4. Análise histopatológica da lesão induzida pela TcdA do *C. difficile*

Após a eutanásia dos animais de todos os grupos, a alça ileal foi retirada e fixada em formol 10% tamponado e, posteriormente, foram processados para coloração pelo método HE. Essa análise teve o objetivo de avaliar o grau de inflamação, infiltrado neutrofílico e o dano celular, através dos escores histológicos, conforme descrito por Cavalcante e colaboradores (2006), sendo: 0 (ausência de alterações), 1 (alterações brandas), 2 (alterações moderadas) e 3 (alterações severas); além de fazer avaliação da densidade neuronal no plexo mioentérico. No primeiro momento este experimento foi realizado apenas com os grupos controle e TcdA, e em seguida com os demais perfazendo todos os grupos: Controle, BBG, A438079, TcdA, TcdA+BBG e TcdA+ A438079.

3.5 Imunofluorescência do plexo mioentérico na da lesão induzida pela TcdA do *C. difficile*

3.5.1 Preparação do material para imunofluorescência

O segmento intestinal de camundongos do grupo TcdA, com enterite intestinal induzido por TcdA, bem como do grupo controle foram removidos e colocados em tampão fosfato-salina (PBS: 0,15M NaCl em tampão fosfato de sódio 0,01M, pH7,2). Os segmentos intestinais foram abertos e limpos de seus conteúdos, e foram colocados e esticados por meio de alfinetes em uma balsa fina de madeira, com a túnica mucosa para baixo. Após este procedimento, o material foi imerso no fixador com formaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0,2M pH7,3 *overnights* e refrigerado à 4 °C. No dia seguinte, os tecidos foram clareados com 03 lavagens, de 10 minutos cada, em dimetilsulfóxido (DMSO), seguido por 03 lavagens de 10 minutos em PBS. Após este procedimento, os tecidos foram estocados em PBS contendo

0,1% sódio-azida em 4°C (CASTELUCCI *et al.*, 2002b; CASTELUCCI *et al.*, 2003; POOLE *et al.*, 2002).

3.5.2 Método da dupla marcação com imunofluorescência do receptor P2X7 com anti-NOS, ChAT ou Calr

De acordo com o protocolo utilizado por Palombit e colaboradores (2013), após a fixação e o clareamento, os tecidos de cada animal foram seccionados em cerca de 1cm² e dissecados para a confecção dos preparados de membranas. Nesta fase, os preparados de membrana foram obtidos com o auxílio da lupa estereoscópica (ZM800 Nikon), onde removeu-se as camadas mucosa, submucosa e a muscular circular, mantendo somente a camada muscular longitudinal com o plexo mioentérico. Com o preparado de membrana pronto, este foi novamente seccionado para obtenção de 02 pedaços de 0,5cm². Em seguida, os preparados foram imersos em uma solução contendo 10% de soro normal de cavalo, 1,5% de Triton-X (Sigma) e PBS durante 45 minutos em temperatura ambiente. Após este período, os tecidos foram incubados em anticorpos primários (descritos na tabela 1) durante 48 horas a 4 °C e em seguida lavados em PBS por três vezes de 10 minutos cada. Obteve-se as duplas marcações, usando as combinações do anticorpo primário do receptor P2X7 com anticorpos primários da NOS, Calr e ChAT (Tabela 1).

Tabela 1 - Características dos anticorpos primários

Antígeno	Hospedeiro	Diluição	Referência
NOS	Carneiro	1:2000	EMSO
ChAT	Cabra	1:50	Chemicon
P2X7	Coelho	1:100	Molecular Probes
Calretinina	Cabra	1:100	Swant

Após a incubação com os anticorpos primários, os tecidos foram lavados 03 vezes durante 10 minutos cada em PBS e incubados em anticorpos secundários por 1h à temperatura ambiente (Tabela 2). Em seguida, as amostras foram, novamente, submetidas à 03 lavagens de

10 minutos cada em PBS e montados em glicerol tamponado com tampão carbonato de cálcio 0,5M pH8,6 (PALOMBIT *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2015)

Tabela 2 - Características dos anticorpos secundários

Anticorpo	Diluição	Fonte
Burro anti-coelho IgG 594	1:200	Molecular Probes
Burro anti-carneiro IgG 488	1:400	Molecular Probes

3.5.3 Análises qualitativas dos neurônios imunorreativos ao receptor P2X7, NOS, ChAT e Calr

As análises qualitativas do receptor P2X7 nos neurônios entéricos dos grupos de animais submetidos à enterite induzida por TcdA ou salina foram realizadas no microscópio confocal Olympus acoplado ao analisador de imagem. O aparelho é equipado com filtros para discriminar as fluorescências 488 (coloração vermelha) e 594 (coloração verde). Para 488, foi usado o filtro 10 (450-490 nm de filtro de excitação e 515-565 nm de filtro de emissão) e para 594, o filtro 00 (530-585 nm de filtro de excitação e 615 nm de filtro para emissão). As imagens foram capturadas e analisadas através do suporte lógico de imagens *Image Flowview*. Para a confecção das figuras, utilizou-se somente uma secção da projeção da imagem dos neurônios mioentéricos imunorreativos ao receptor P2X7, NOS, ChAT e Calr (PALOMBIT *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2015).

3.5.4 Análises quantitativas dos neurônios imunorreativos ao receptor P2X7, NOS, ChAT e Calr

3.5.4.1 Análise do código químico

As análises quantitativas do código químico dos neurônios entéricos imunorreativos realizaram-se através da contagem de neurônios imunorreativos ao receptor P2X7 com dupla marcação para NOS, ChAT ou Calr no microscópio confocal Olympus. Para esta análise, primeiramente, os neurônios foram localizados segundo a presença do fluoróforo que marcou um determinado antígeno e, após a localização deste neurônio, o filtro foi mudado para determinar se o neurônio foi ou não imunomarcado para o segundo antígeno, que foi localizado

pelo fluoróforo de cor diferente. Assim, a percentagem de neurônios imunofluorescentes para um marcador particular foi também imunorreativo para um segundo marcador. Analisou-se 100 neurônios de cada preparado de membrana, e cada animal dos grupos tratados TcdA ou salina. Os dados foram expressos em percentagem e erro padrão (PALOMBIT *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2015).

3.5.4.2 Análise da densidade e da área do perfil neuronal

A obtenção das densidades dos neurônios imunorreativos (neurônios/cm²) ao receptor P2X7, NOS, ChAT e Calr do plexo mioentérico foi realizada utilizando a objetiva de 100X do microscópio confocal Olympus, acoplado ao analisador de imagem equipado com filtros para discriminar entre a fluorescência 488 e 594. A densidade foi realizada através da contagem do número de neurônios em 20 campos microscópicos, em dois preparados de membrana de cada animal de cada grupo experimental. Com os valores obtidos, foi realizado o cálculo para a conversão do número de neurônios por cm². Na morfometria, analisou-se imagens capturadas de 100 neurônios imunorreativos ao receptor P2X7, NOS, Calr e ChAT, com um total de 200 neurônios por cada grupo experimental. As imagens foram analisadas através do programa *Image J*, onde foi possível selecionar item de mensuração como a área do perfil neuronal (PALOMBIT *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2015).

3.6 Imunohistoquímica para marcadores gliais (GFAP e S-100), pan neuronal HuC/D e receptor P2X7 na lesão induzida pela TcdA do *C. difficile*

Este experimento foi realizado para os grupos controle e TcdA. Os tecidos fixados foram processados em banhos crescentes de álcool (70%, 95% e absoluto) e de xilol e incluídos em parafina. Cortes de 3 µm de espessura do material foram deixadas por 24 h em estufa à 60°C. Os cortes foram desparafinizados, hidratados e mergulhados em PBS (solução tampão fosfato-salino).

Para a recuperação antigênica, as lâminas foram imersas em tampão citrato (*EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH; pH=6.1; Dako Denmark A/S*) ou tris/EDTA (*EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH; pH=9; Dako Denmark A/S*) sob aquecimento em banho maria a 90°C, de 20 a 40 minutos. Em seguida, as lâminas foram esfriadas em temperatura ambiente por 20 minutos e lavadas em água destilada e PBS.

O bloqueio da peroxidase endógena foi realizada com o peróxido de hidrogênio contendo tampão fosfato (*EnVision™FLEX Peroxidase-BlockingReagent; Dako*), diretamente sobre os cortes por 20 minutos e depois foram lavadas em PBS. As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários: P2X7 e HuC/D diluídos em solução tris tamponada (*EnVision™FLEX antibodydiluent; Dako*) nas concentrações de 1:100, GFAP, S100 (anticorpos invionflex pronto para uso) e incubados por 4 horas. Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas, com o polímero (*EnVision™FLEX/HRP; Dako*) e em seguida lavados em PBS novamente.

A revelação das lâminas foi realizada com solução 3,3' diaminobenzidinatetrahydroclorido (DAB) (*EnVision™FLEX DAB+ Chromogen; Dako Denmark A/S*) e monitoradas em microscópio óptico. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente e destilada. A contra coloração foi realizada com Hematoxilina de Mayer por 8 minutos e lavadas em água corrente e destilada. Em seguida procedeu-se a imersão das lâminas em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio 0,5%) e lavadas, em seguida, em água corrente e destilada.

Por fim, realizou-se a desidratação das amostras e montagem das lâminas. Os controles negativos foram processados simultaneamente como descrito anteriormente, sendo que o anticorpo primário foi substituído pela solução diluente do anticorpo (*EnVision™FLEXantibodydiluent; Dako*). A montagem das lâminas foi realizada em *Entellan new (MerckGAA, Alemanha)*. As análises foram realizadas de forma quantitativa em 30 campos em cada grupo experimental. As imagens foram realizadas em aumento 200X, no microscópio de luz 3,5 (LEICA DM100, Alemanha).

Para quantificar a área imunomarcada para P2X7, S100, GFAP, ou HuC/D utilizou-se o programa Adobe Photoshop 8.0 para obter a área total do tecido e área imunomarcada. Em seguida, para mensurar a porcentagem (%) de área marcada, efetuou-se o seguinte cálculo: % da área imunomarcada (pixels) x100 sobre área total (pixels).

3.7 Quantificação da expressão gênica de P2X7 pelo *Polymerase Chain Reaction (PCR)* em tempo real na da lesão induzida pela TcdA do *C. difficile*

Inicialmente, as amostras de intestino dos grupos controle e TcdA foram trituradas mediante homogeneização vigorosa em 300 mg de glass beads de 0,1 mm (BioSpec, Bartlesville, OK, EUA) utilizando MiniBeadBeater (BioSpec). O RNA total foi isolado em cada uma das amostras utilizando o kit de extração *Aurum™ Total RNA Fatty and Fibrous Tissue* (Bio-Rad, CA, USA). A quantidade e a qualidade do RNA extraído foram determinadas por espectrofotometria (NanoDrop™ 2000, Thermo Scientific) utilizando 260 nm e a razão 260/280nm, respectivamente. Em seguida, foi realizada a síntese do DNA complementar (cDNA) a partir de 1 µg de RNA total por meio da reação da Transcriptase reversa utilizando o kit de síntese iScript™ (Bio-Rad) no termociclador C1000 Touch™.

O *primer* utilizado para o receptor de P2X7 foi *foward* GCACGAATTATGGCACCGTC e *reverse* CCCCACCCTCTGTGACATTCT (Glaser *et al.*, 2014). Ensaios de PCR em tempo real foram realizadas em um volume final de 20 µL contendo 10 µL de supermix iQ™ SYBR® Green, 2 µL de cada primers (200 nM), 1µL de cDNA das amostras e 5 µL de água livre de RNAase. Controles negativos também foram testados, com o cDNA sendo substituídos por água livre de RNAase. Todas as amostras foram processadas em duplicata. As condições de PCR foram as seguintes: um período de desnaturação inicial a 95°C/7min, seguido por 45 ciclos de amplificação gênica. Cada ciclo consistiu de uma fase de desnaturação inicial a 95°C/20s, seguida por uma fase de anelamento a 60°C/20s e por fim uma fase de extensão a 72°C/45s. As amostras foram então submetidas a uma etapa de extensão a 72°C/3min. Para garantir a especificidade do produto de PCR, foi realizada a curva de Melting, após cada reação, em que a temperatura da reação foi posteriormente aumentada 0,5°C a cada 15s, com início na temperatura de anelamento de um *primer* e terminando em 95°C. Foi utilizada como gene de referência a β -actina. Todas as amplificações foram analisadas pelo sistema de detecção de PCR em tempo real CFX96 Touch™ (Bio-Rad). A expressão gênica relativa foi determinada usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak) (Glaser *et al.*, 2014).

3.8 Método TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick end-labeling)

O método TUNEL, realizado para os grupos: Controle, BBG, A438079, TcdA, TcdA+BBG e TcdA+ A438079, mostra positividade nuclear para as células em morte celular. Foram realizados cortes com 4µm de espessura e montagem em lâminas cobertas de L-

polilisina, apropriadas para a realização de imunohistoquímica. Utilizou-se para a detecção de células TUNEL positivas, como indicativo de morte celular, o kit *ApopTagR S 7100* (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha). Os cortes histológicos foram desparafinizados com xilol e reidratados com concentrações decrescentes de álcool (absoluto, 95% e 70%). Em seguida, lavados PBS e incubados em temperatura ambiente com proteinase K por 15 minutos, a fim de promover a recuperação antigênica. Depois de lavado com água destilada, o material foi tratado com peróxido de hidrogênio 3% (v/v) em PBS durante 15 minutos, para bloquear a peroxidase endógena. Seguiu-se nova lavagem com PBS e incubação com o tampão de equilíbrio por 10 segundos e, imediatamente depois, com a enzima TDT (*terminal desoxinucleotidil transferase*) associada aos nucleotídeos marcados com digoxigenina (*reaction buffer*), os quais se ligam às hidroxilas livres do DNA fragmentado das células apoptóticas. O controle negativo não recebeu a enzima. Após incubação em estufa a 37°C por 1h, a reação foi bloqueada pela solução *stop* e as lâminas lavadas em PBS. Seguiu-se a adição do conjugado antidigoxigenina e nova incubação à temperatura ambiente por 30 minutos. Após nova lavagem com PBS, seguiu-se a coloração com o cromógeno DAB, seguida por contra coloração com *methyl green*. Por fim, foi feita nova lavagem com água destilada, imersão em N-butanol a 100% e xilol e, em seguida, montagem das lâminas.

A análise do TUNEL foi realizada de forma quantitativa por grupo onde foram selecionados 20 campos em cada grupo experimental.

3.9 Dosagem de citocinas na lesão induzida pela TcdA do *C.difficile*

As concentrações de IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α foram medidos no segmento intestinal íleo dos animais dos grupos Controle, BBG, A438079, TcdA, TcdA+BBG e TcdA+ A438079, usando técnica de ELISA. Os segmentos intestinais foram coletados e estocados em tampão para citocinas contendo anti-proteases em freezer -80°C. Os tecidos foram homogenizados com PBS, contendo anti-proteases. As amostras foram centrifugadas por 10 min a 3000 *rpm* e o sobrenadante foi imediatamente usado para detecção das citocinas pelo ensaio de ELISA com anticorpos específicos do Kit R&D systems (SOUZA *et al.*, 2001). As análises foram realizadas em triplicata.

3.10 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média±erro padrão da média. Para comparação entre dois grupos foi utilizado Teste t, para vários grupos de ensaios foi utilizado ANOVA e teste de Bonferroni.

Nas análises histológicas, os dados foram expressos como mediana seguida de valores extremos e os testes estatísticos aplicados foram ANOVA e teste de Bonferroni.

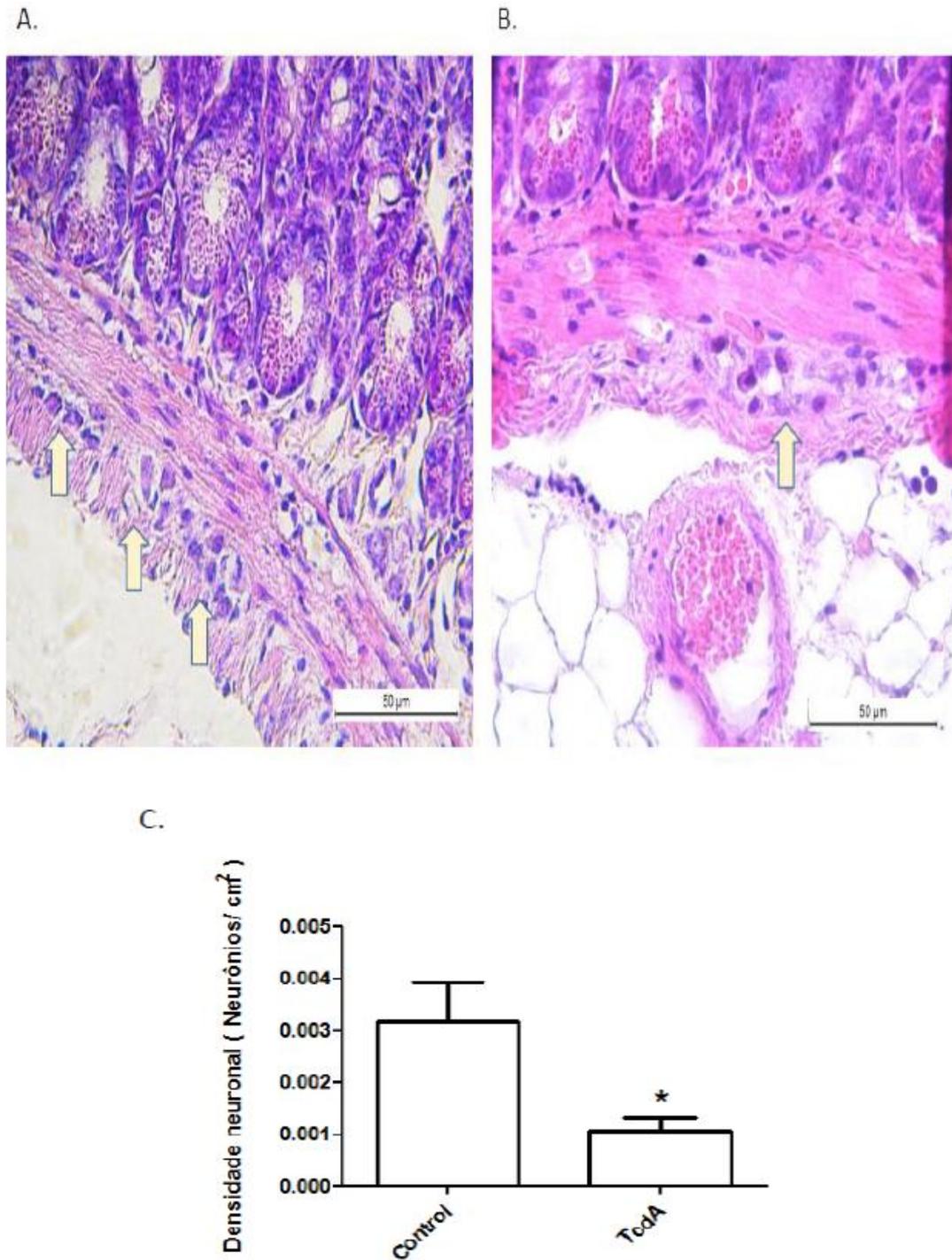
Os cálculos estatísticos foram realizados através de um microcomputador, utilizando-se o programa de *software* em estatística *GraphPad Prism*. O *n* diz respeito ao número de amostras em cada grupo estudado onde, foram utilizados de quatro a sete animais para os experimentos *in vivo*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

4 RESULTADOS

4.1 Efeito da TcdA do *C. difficile* sobre a densidade neuronal e a expressão de P2X7 no plexo mioentérico

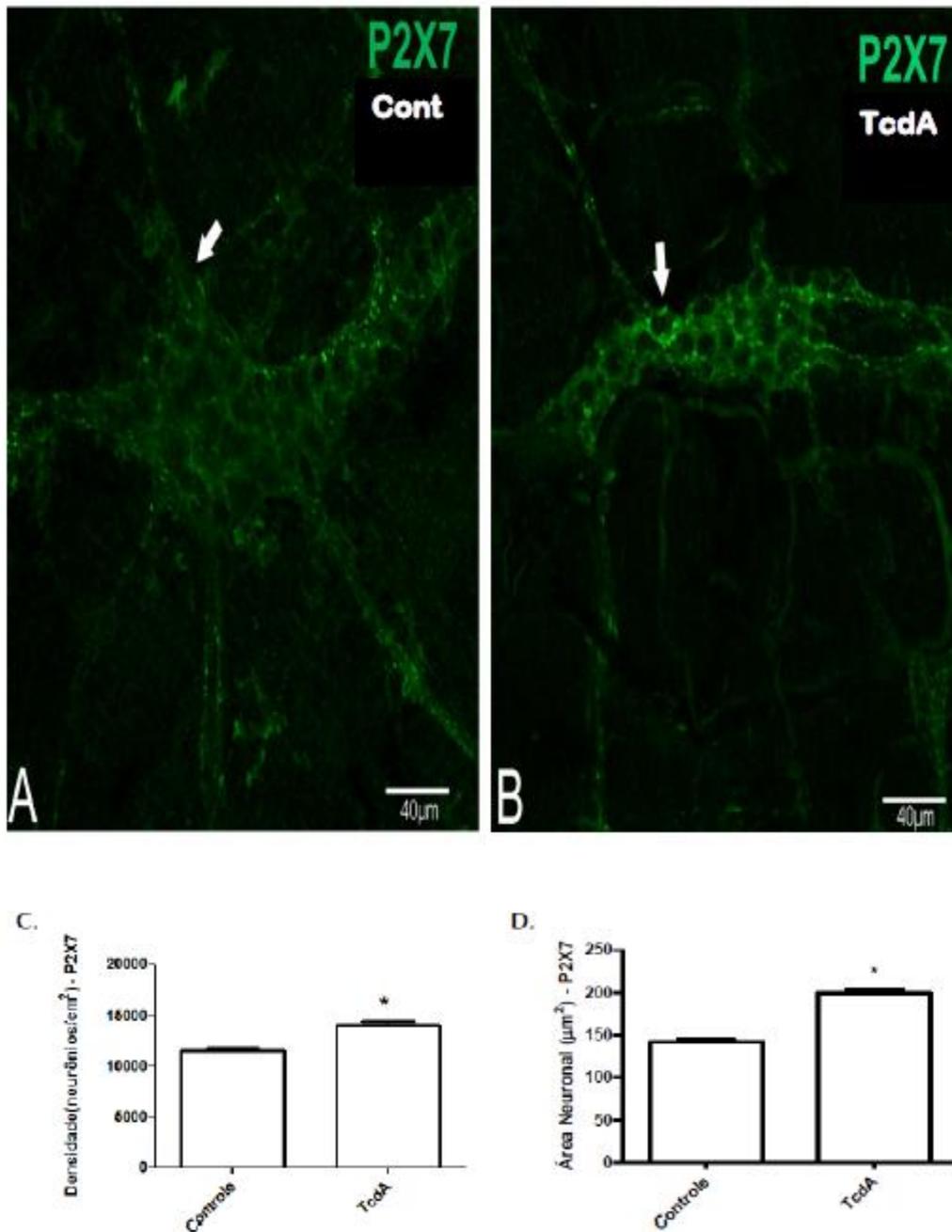
Ao realizar-se uma coloração de HE, observou-se uma redução de 66,42% na densidade de neurônios como mostrado na Figura 13B e C, quando se compara o grupo controle com o TcdA (Figura 13A). A partir desses dados procurou-se demonstrar quais grupos neuronais sofreriam alterações na enterite induzida pela TcdA. Em seguida, no estudo do plexo mioentérico do SNE, foi realizado a marcação para o receptor P2X7 (Figura 14), onde foi observado um aumento da fluorescência dos neurônios imunorreativos a P2X7 no grupo TcdA (Figura 14 B) quando comparado ao grupo controle (Figura 14 A). Esse resultado é corroborado com os dados da densidade de neurônios positivos para P2X7, que se mostrou aumentado em 21,23% no grupo TcdA ($14050 \pm 461,70$ neurônios/cm²) em comparação ao grupo controle ($11590 \pm 319,51$ neurônios/cm²) (Figura 14 C) acompanhado de um aumento também da área neuronal de 32,12% no grupo TcdA ($197,15 \pm 5,25$ μm²) em relação ao grupo controle ($149,22 \pm 3,43$ μm²) (Figura 14D). Tal achado discorda inicialmente do que foi observando na Figura 13, onde se tem uma redução do número de neurônios totais, sugerindo portanto um aumento da expressão de receptores P2X7.

Figura 13: Efeito da TcdA do *C. difficile* sobre a densidade neuronal no plexo mioentérico.



Fonte: Próprio autor. A alça ileal dos camundongos foi injetada com salina (Cloreto de Sódio 0,9%; Controle-A) ou TcdA (50 μg/alça - B). Coloração HE mostra nas setas os gânglios do plexo mioentérico, no aumento de 40X. Gráfico da densidade neuronal (número de neurônios por cm²) (C), sendo contado 20 campos de cada grupo. * p<0,05 em relação ao controle. Teste *t* student. Todas as figuras foram obtidas na escala de 50μm.

Figura 14: Efeito da TcdA do *C. difficile* sobre a expressão do receptor P2X7 no plexo mioentérico.



Fonte: Próprio autor. A alça ileal dos camundongos foi injetada com salina (Cloreto de Sódio 0,9%; Controle- A) ou TcdA (50 $\mu\text{g}/\text{alça}$ - B). A imunofluorescência foi realizada no preparado de membrana, com a finalidade de expor o plexo mioentérico. O receptor P2X7 foi marcado utilizando como fluoróforo alexia flúor 488 (A e B). Gráfico da densidade neuronal (número de neurônios por cm^2) sendo contado 40 campos de cada grupo (C). Análise da área neuronal, através da morfometria, sendo analisados 100 neurônios imunorreativos a P2X7 (D) * $p < 0,05$ em relação ao controle. Teste *t* student. Todas as figuras foram obtidas na escala de 40 μm .

4.2 Efeito da TcdA do *C. difficile* sobre os neurônios imunorreativos a NOS, ChAT e Calr no plexo mioentérico

A marcação para ChAT (Figura 15) mostrou uma redução no quantitativo e um aumento na área, sugerindo um processo de intumescimento dos neurônios imunorreativos a ChAT no grupo TcdA. Apesar dessa redução, observa-se que a TcdA causou um aumento daqueles que tiveram a marcação dupla com P2X7 (Figura 15B'), além da presença de varicosidades imunoreativas a ChAT.

Na análise quantitativa, em relação a densidade neuronal no plexo mioentérico, observou-se uma redução de 23,21% no número de neurônios imurreativos ao ChAT do grupo TcdA ($9169 \pm 345,30$ neurônios/cm²) em relação ao grupo controle ($11940 \pm 537,90$ neurônios/cm²) (figura 15C) e um aumento da área neuronal em 27,48% no grupo TcdA ($186,4 \pm 5,23$ μm²) em comparação ao grupo controle ($146,6 \pm 3,43$ μm²) (figura 15D). Além de verificar que não houve alteração na colocalização, onde contou-se 100 neurônios ChAT.

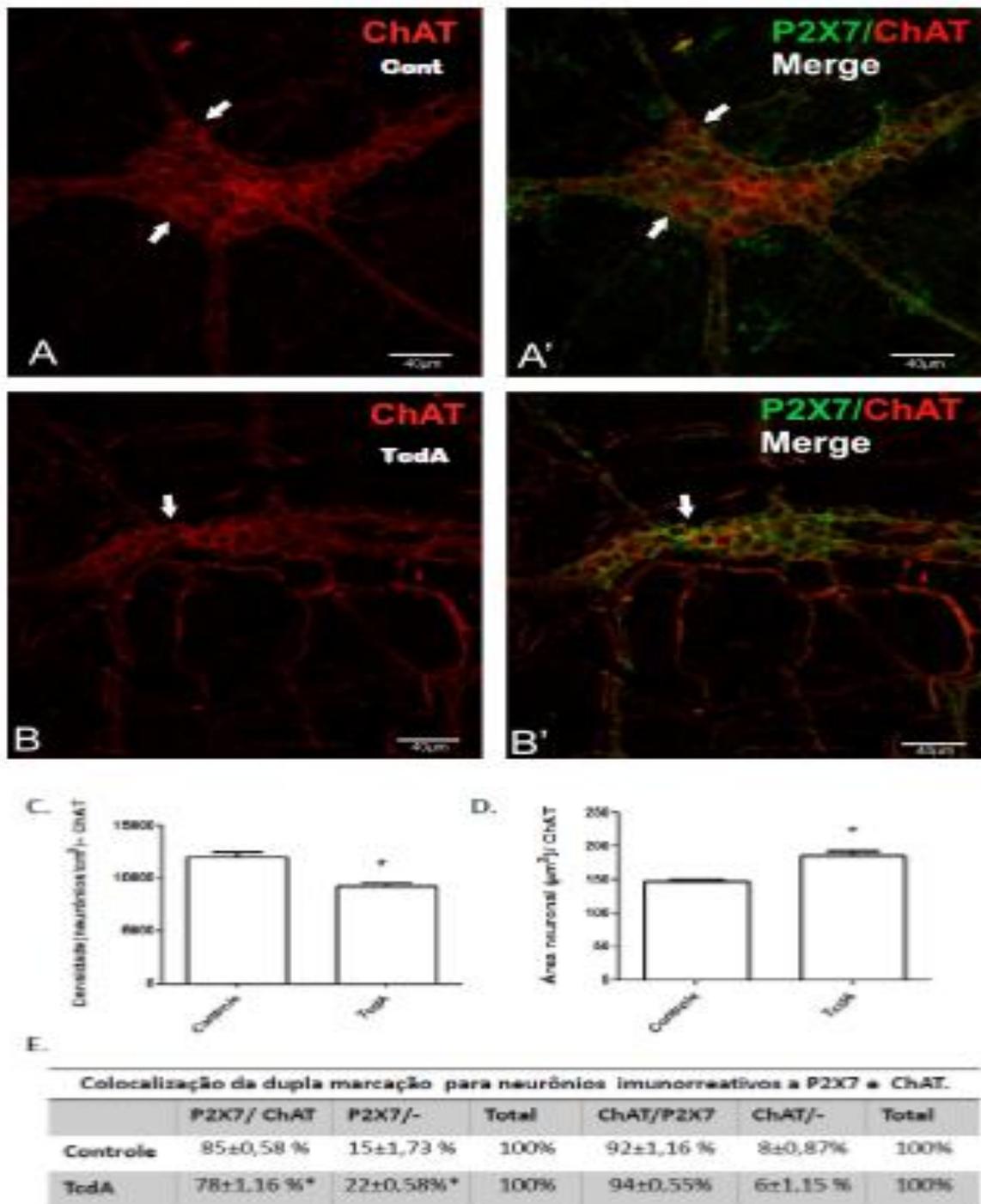
Em relação a marcação para Calr e P2X7 (Figura 16), observou-se uma redução dos neurônios imunorreativos a Calr (Figura 16B' e B''), e verificou-se também o aumento da colocalização Calr/P2X7 (Figura 16B'') ambas no grupo TcdA. E não há alterações morfométricas entre os neurônios marcados para Calr em ambos os grupos, (Figura 16D), na qual o grupo TcdA e controle apresentaram as seguintes medidas: $115,5 \pm 3,06$ μm² e $114,74 \pm 2,97$ μm² respectivamente. Já em relação aos neurônios que reagiram positivamente a Calr, demonstrou-se que mesmo com a redução de 28,17% no número de neurônios por cm² no grupo TcdA ($3518 \pm 517,10$ neurônios/cm²) em relação ao grupo controle ($4898 \pm 146,10$ neurônios/cm²) (Figura 16C), observou-se também um aumento da colocalização, onde contou-se 100 neurônios Calr, desses $86 \pm 1,44\%$ eram duplamente marcados para Calr/P2X7 no grupo TcdA enquanto apenas $75 \pm 0,78\%$ tinham essa marcação no grupo controle (Figura 15E).

Enquanto a marcação para NOS (Figura 17) não mostrou alteração no quantitativo de neurônios NOS em ambos os grupos (Figura 17A' e B'), porém houve um pequeno aumento na área neuronal dos marcados NOS positivamente. Conforme a análise quantitativa dos neurônios imunorreativos a NOS, não verificou-se diferença significativa na densidade neuronal no plexo mioentérico no grupo controle ($3480 \pm 352,06$ neurônios/cm²) e TcdA ($3960 \pm 150,61$ neurônios/cm²) (Figura 17C), porém houve um aumento da área neuronal em 12,44% do grupo TcdA ($96,38 \pm 2,06$ μm²) em comparação ao grupo controle ($85,72 \pm 2,51$ μm²) (Figura 17D). Verificou-se também um aumento da colocalização, onde contou-se 100 neurônios NOS,

desses $75 \pm 2,60\%$ eram duplamente marcados para NOS/P2X7 no grupo TcdA enquanto $66 \pm 2,89\%$ tinham essa marcação no grupo controle (Figura 18E), corroborando com as imagens das Figuras 17A" e B".

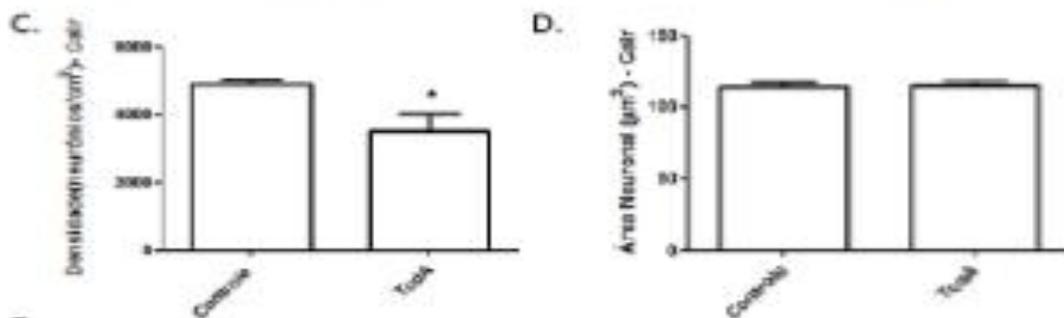
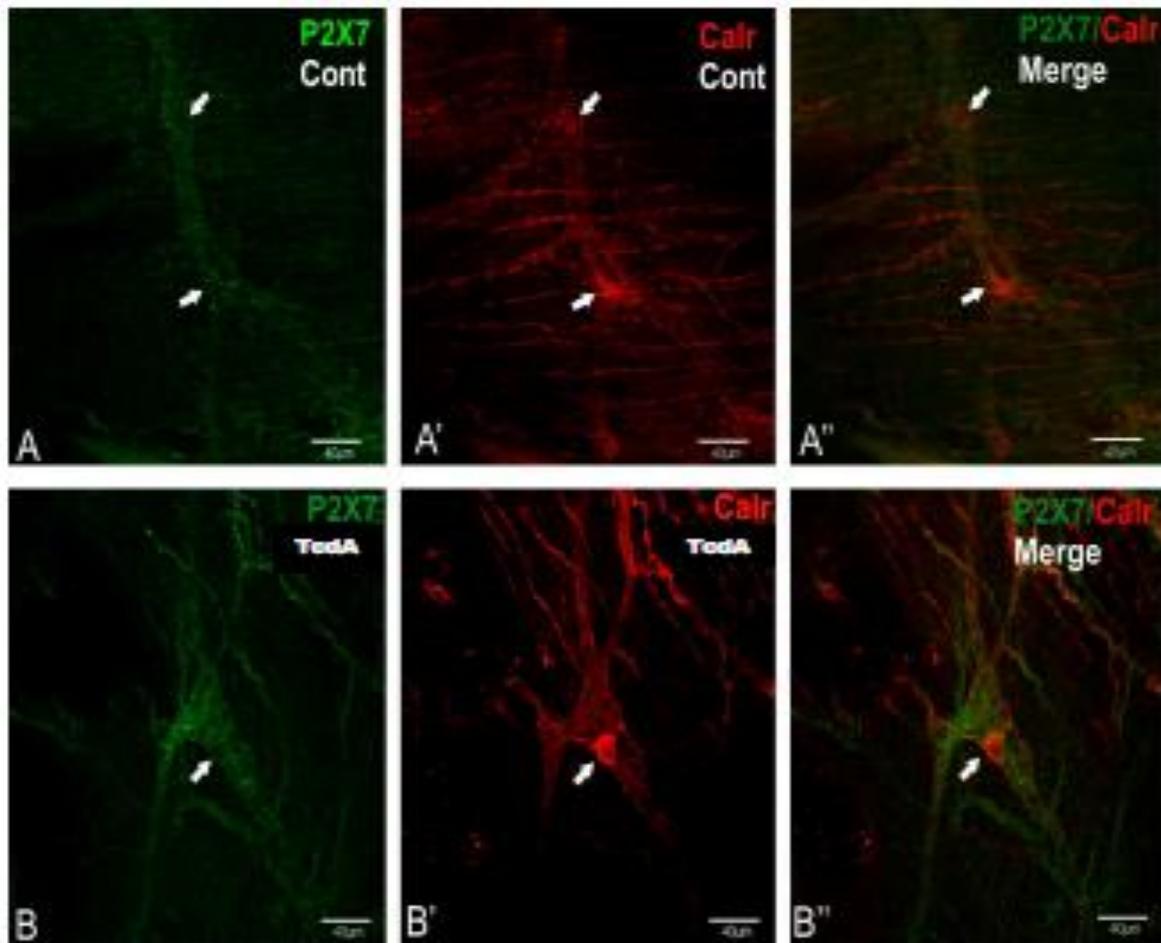
Portanto, ao se fazer uma análise geral dos neurônios imunorreativos aos códigos químicos ChAT, NOS e Calr, mostrou-se uma redução no quantitativo de neurônios no plexo mioentérico concordando com os dados da Figura 13, com exceção dos neurônios reativos ao receptor P2X7 onde se observou um aumento, o qual é justificado ao analisar-se os dados das tabelas de colocalização (Figuras 15E, 16E e 17E). Nos resultados observa-se também um redução na colocalização, quando se conta 100 neurônios P2X7, da dupla marcação P2X7/ChAT, respectivamente $78 \pm 1,16\%$ do grupo TcdA e $85 \pm 0,58\%$ no grupo controle, concordando com o que foi visto na figura 15B', demonstrando que o receptor P2X7 está aumentando no SNE mesmo tendo uma redução no quantitativo de neurônios, portanto se fazendo necessário detalhar o papel deste receptor na patogênese da DACD induzida pela TcdA.

Figura 15: Efeito da TcdA do *C. difficile* sobre os neurônios imunorreativos ao ChAT no plexo mioentérico.



Fonte: Próprio autor. A alça ileal dos camundongos foi injetada com salina (Cloreto de Sódio 0,9%; Controle- A e A') ou TcdA 50 µg/alça -B e B'). A imunofluorescência foi realizada no preparado de membrana, expondo o sistema nervoso entérico e fluorófilo alexia flúor 488 e 594 respectivamente para P2X7 e ChAT (A, A', B e B'). Gráfico da densidade neuronal (número de neurônios por cm²), sendo contados 40 campos de cada grupo (C.). Análise da área neuronal, através da morfometria, sendo analisados 100 neurônios imunorreativos a ChAT (D.). Tabela de colocalização, sendo para relações P2X7/ChAT e P2X7/- contado 100 imunorreativos a P2X7 e para relações ChAT/P2X7 e ChAT/- contado 100 imunorreativos a ChAT (E.). * p<0,05 em relação ao controle. Teste t student. Todas as figuras foram obtidas na escala de 40µm.

Figura 16: Efeito da TcdA do *C. difficile* sobre os neurônios imunorreativos ao Calr no plexo mioentérico.



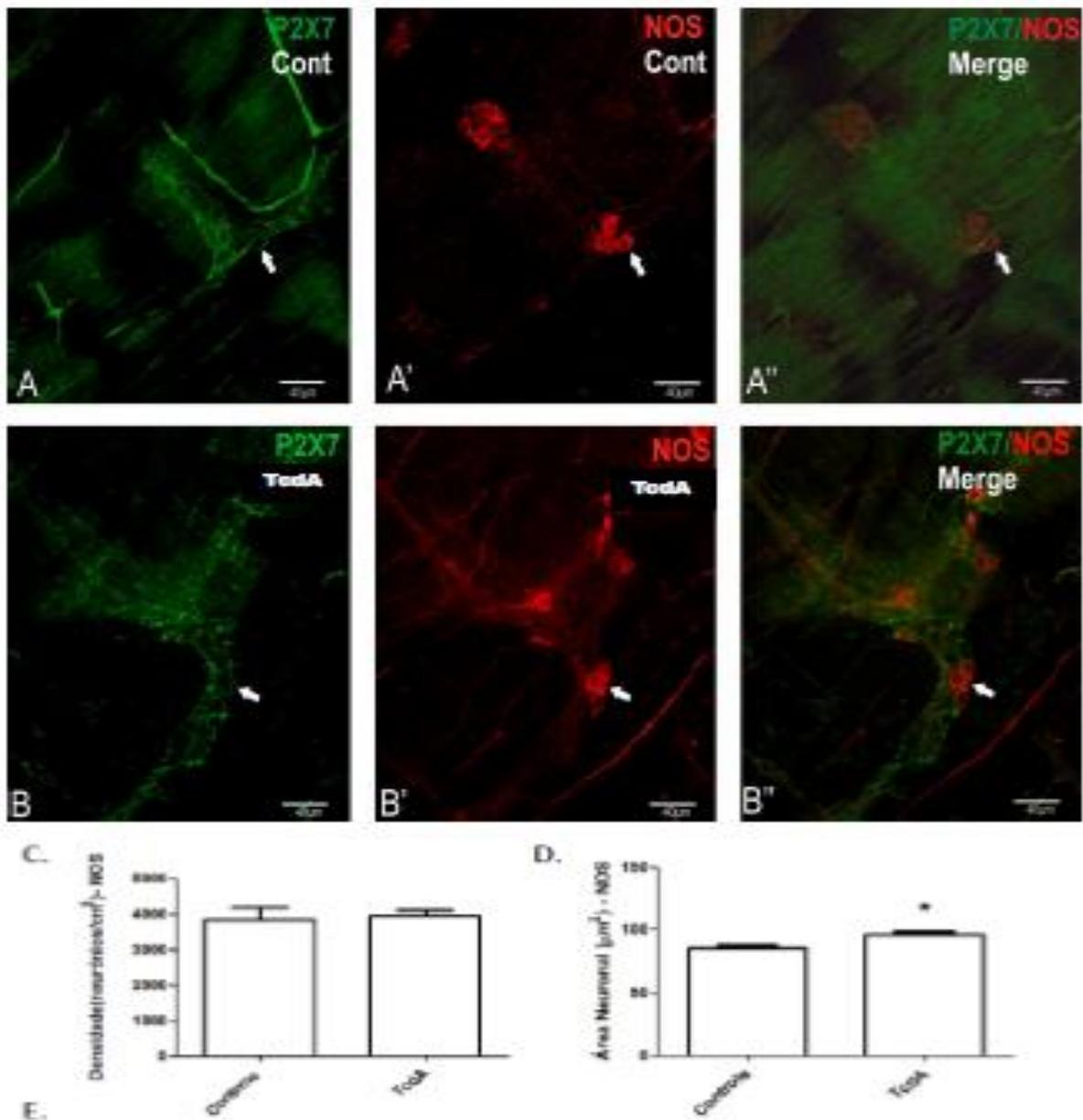
E.

Colocalização da dupla marcação para neurônios imunorreativos a P2X7 e Calr.						
	P2X7/ Calr	P2X7/-	Total	Calr/P2X7	Calr/-	Total
Controle	60±0,87%	40±1,16 %	100%	75±0,78%	25±1,73%	100%
TcdA	59±1,73 %	41±1,72%	100%	86±1,44%*	14±1,46 %*	100%

Fonte: Próprio autor. A alça ileal dos camundongos foi injetada com salina (Cloreto de Sódio 0,9%; Controle- A, A' e A'') ou TcdA (50 µg/alça - B, B' e B''). A imunofluorescência foi realizada no preparado de membrana, expondo o sistema nervoso entérico e fluorófilo o alexia flúor 488 e 594 respectivamente para P2X7 e Calr (A, A', A'', B, B' e B''). Gráfico da densidade neuronal (número de neurônios por cm²), sendo contado 40 campos de cada grupo (C.). Análise da área neuronal, através da morfometria, sendo analisados 100 neurônios imunorreativos a

Calr (D.). Tabela de colocalização, sendo para relações P2X7/Calr e P2X7/- contado 100 imunorreativos a P2X7 e para relações Calr/P2X7 e Calr/- contado 100 imunorreativos a Calr (E.). * $p < 0,05$ em relação ao controle. Teste *t* student. Todas as figuras foram obtidas na escala de 40 μ m.

Figura 17: Efeito da TcdA do *C. difficile* sobre os neurônios imunorreativos ao NOS no plexo mioentérico.



Colocalização da dupla marcação para neurônios imunorreativos a P2X7 e NOS.						
	P2X7/ NOS	P2X7/-	Total	NOS/P2X7	NOS/-	Total
Controle	58±1,76%	42±2,31%	100%	66±2,89%	34±2,17%	100%
TcdA	53±1,16%	47±1,73%	100%	75±2,60%*	25±2,58%*	100%

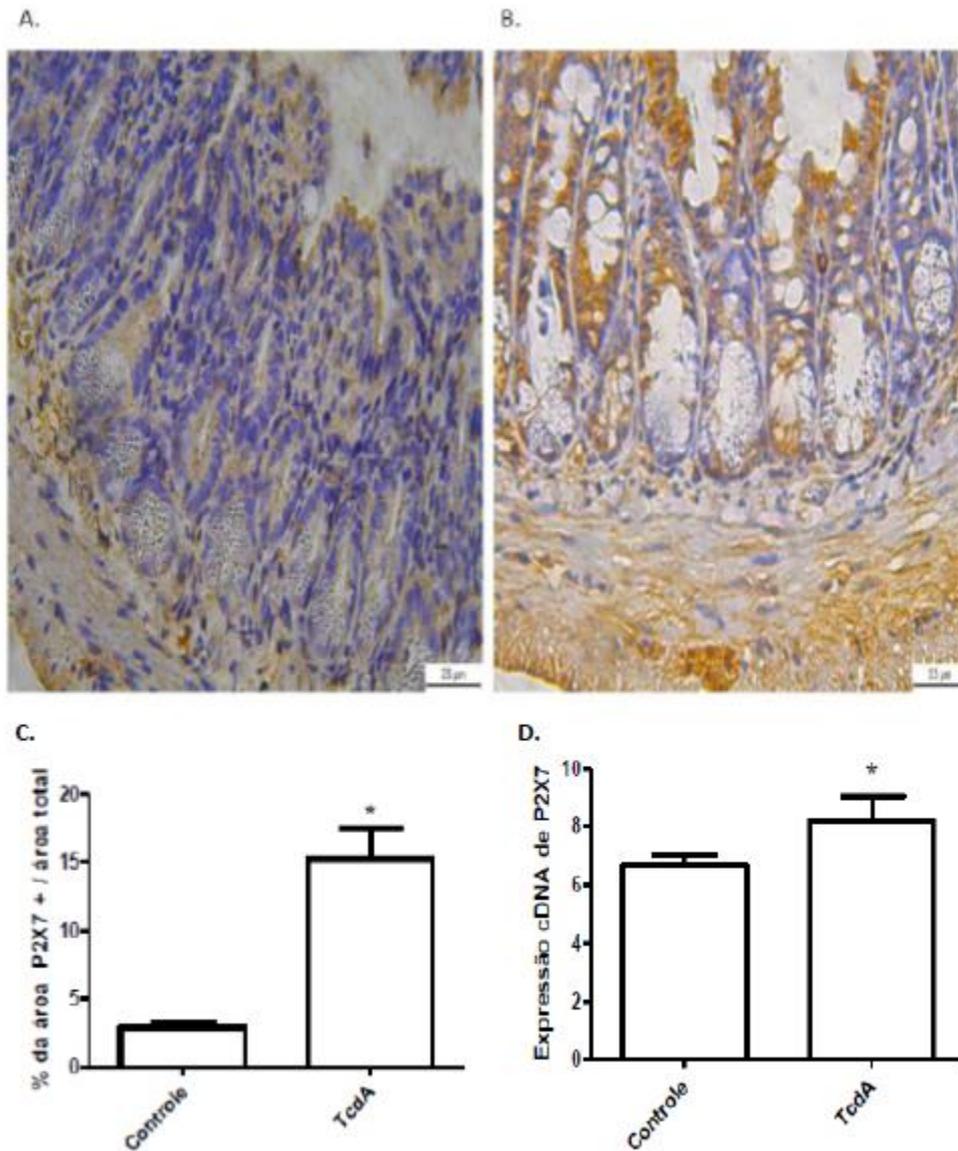
Fonte: Próprio autor. A alça ileal dos camundongos foi injetada com salina (Cloreto de Sódio 0,9%; Controle- A, A' e A'') ou TcdA (50 μ g/alça - B, B' e B''). A imunofluorescência foi realizada no preparado de membrana,

expondo o sistema nervoso entérico e fluorófilo alexia flúor 488 e 594 respectivamente para P2X7 e NOS (A, A', A'', B, B' e B''). Gráfico da densidade neuronal (número de neurônios por cm^2), sendo contado 40 campos de cada grupo (C.). Análise da área neuronal, através da morfometria, sendo analisados 100 neurônios imunorreativos a NOS (D.). Tabela de colocalização, sendo para relações P2X7/NOS e P2X7/- contado 100 imunorreativos a P2X7 e para relações NOS/P2X7 e NOS/- contado 100 imunorreativos a NOS (E.). * $p < 0,05$ em relação ao controle. Teste *t* student. Todas as figuras foram obtidas na escala de $40\mu\text{m}$.

4.3 O papel do receptor P2X7 na lesão induzida pela TcdA do *C. difficile*.

Diante da necessidade de aprofundar o estudo sobre o papel do receptor P2X7 e os resultados mostrados anteriormente sobre o aumento de neurônios imunorreativos a este receptor purinérgico, fez-se uma imunohistoquímica em um corte transversal do íleo, no qual pode-se observar que houve um aumento na marcação para P2X7 em todos os tecidos (Figura 18A e B) principalmente no epitélio e no plexo mioentérico do grupo TcdA com incremento da área positiva para P2X7 de 411,95% estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (Figura 18C). A expressão de c-DNA do grupo injetado com TcdA aumentou em 22,4%, em relação ao grupo salina, levando a inferir que a TcdA leva ao aumento dos receptores P2X7, tanto no plexo mioentérico como em outras camadas teciduais da alça ileal como no epitélio, podendo este receptor está envolvido na patogênese de lesão induzida pela TcdA (Figura 18D).

Figura 18: Expressão de P2X7 no tecido ileal de animais injetados com a TcdA do *C. difficile*.



Fonte: Próprio autor. A alça ileal dos camundongos foi injetada com salina (Cloreto de Sódio 0,9%; Controle -A) ou TcdA (50 μ g/alça- B). Foi realizada a imunohistoquímica para P2X7, sendo: Controle (A) e TcdA (B)., Gráfico da quantificação da área positiva para P2X7 em relação a área total, observando o aumentado da área positiva para P2X7, sendo quantificado 30 campos de cada grupo (C). Expressão cDNA de P2X7 por PCR- RT, notando-se também o aumento na expressão de cDNA de P2X7(D). * $p < 0,05$ em relação ao controle. Teste *t* student. Todas as figuras foram obtidas na escala de 25 μ m.

4.4 O papel dos inibidores do receptor P2X7 na lesão induzida pela TcdA do *C. difficile*.

Como foi observado o relevante crescimento da expressão dos receptores de P2X7 na enterite induzida pela TcdA do *C. difficile*, optou-se por utilizar os inibidores desse receptor, sendo o primeiro um inibidor inespecífico, o BBG, e o segundo um inibidor específico, o A438079, e em seguida analisou-se parâmetros inflamatórios, que são consolidados na literatura, como: alterações histológicas, citocinas e morte celular.

Na Figura 19B, ao observar as lâminas de intestino coradas com HE, verificou-se as principais alterações morfológicas induzidas pela TcdA (Figura 19B), como: destruição das vilosidades, diminuição das criptas, a presença de infiltrado inflamatório, edema e hemorragia (congestão). Ao se fazer a análise dos escores histológicos (Figura 19G), observou-se uma diferença significativa entre o grupo tratado com TcdA em relação ao grupo controle (figura 19A). Enquanto nos grupos BBG (Figura 19C) e A438079 (Figura 19E), verificou-se a manutenção da integridade dos tecidos. Nos grupos TcdA+BBG (Figura 19D) e TcdA+A438079 (Figura 19F), demonstrou-se a reversão ou proteção significativa da lesão induzida pela TcdA do *C. difficile*.

Em seguida, realizou-se a técnica TUNEL com a finalidade de verificar o número de células apoptóticas e sua localização (Figura 20). Nos grupos controle ($8,70 \pm 0,99$), BBG ($12,10 \pm 0,89$) e A438079 ($10,00 \pm 0,70$), respectivamente figura 20A, C e E, praticamente apresentaram a mesma distribuição das células TUNEL positivas, dispersa por todas as camadas do corte. Enquanto o grupo TcdA ($23,70 \pm 2,36$), apresentou um acréscimo significativo de 155% em relação ao controle, ressaltando o processo de morte celular por apoptose (Figura 20 B e G), sendo estas células TUNEL positivas distribuídas principalmente nos vilos e no plexo mioentérico, já nos grupos TcdA+BBG ($19,70 \pm 1,78$) e TcdA+A438079 ($16,00 \pm 1,16$) houve uma redução das células TUNEL positivas, respectivamente 16,88% e 32,49%, sendo somente nesta última significativa, quando comparada ao grupo TcdA (Figuras 20D e 20F).

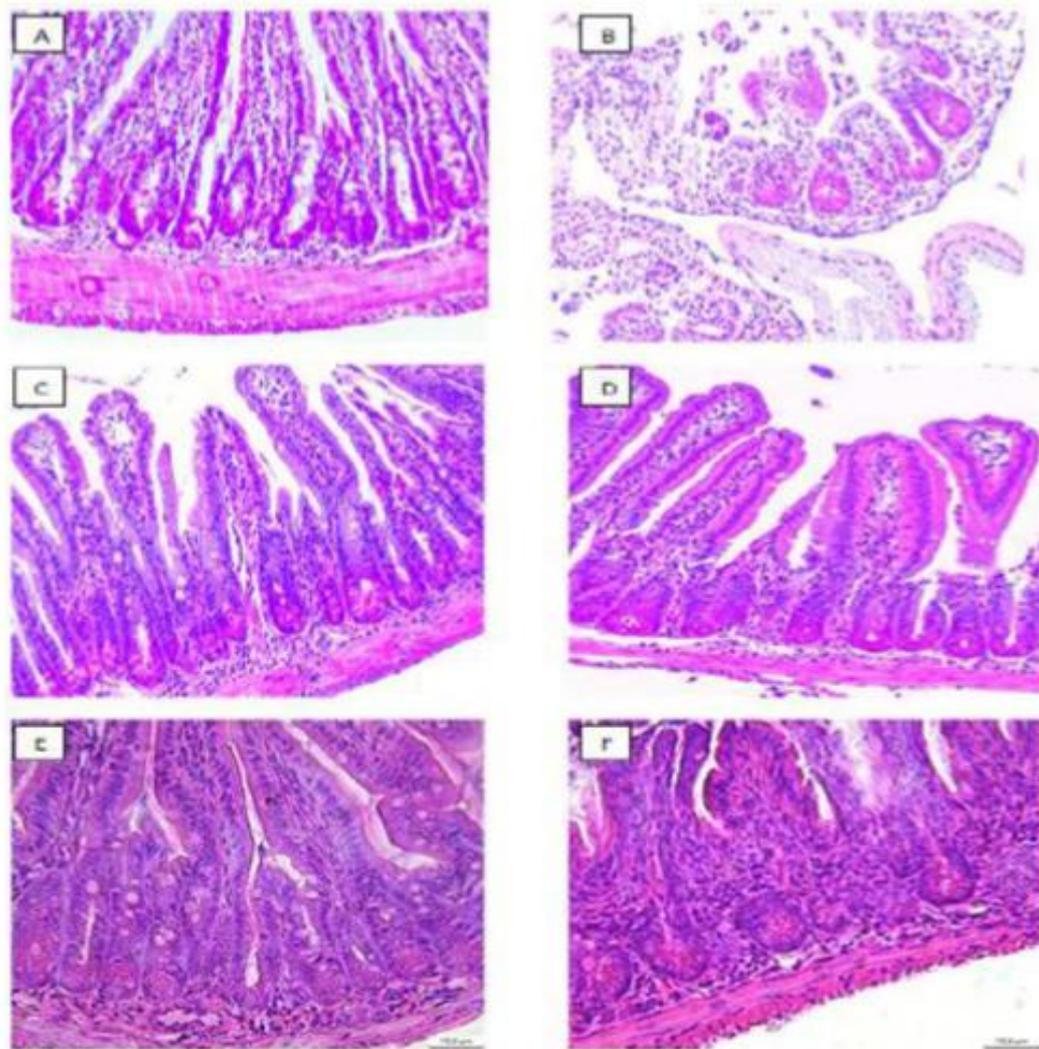
Ao se analisar o efeito dos inibidores BBG e A438079, através da dosagem das citocinas (Figura 21), observou-se uma redução dessas deixando-os semelhantes aos valores normais. Na dosagem de TNF- α (Figura 21A), a TcdA ($974,3 \pm 87,59$) foi capaz de aumentar em 115,36% em relação ao controle ($452,4 \pm 28,80$) que não apresentou diferença para os grupos BBG ($430,2 \pm 85,53$) e A438079 ($337 \pm 52,32$); enquanto nos grupos tratados com inibidores e TcdA, comparado ao grupo TcdA, mostrou-se uma redução de 46,03% e 71,32%, respectivamente, TcdA+BBG ($525,8 \pm 22,47$) e TcdA+A438079 ($279,4 \pm 51,30$). Enquanto na

dosagem IL-1 β (Figura 21B), verificou-se um acréscimo significativo de 130,18% do grupo TcdA (132,4 \pm 23,18) em comparação ao controle (57,52 \pm 5,69), já nos grupos BBG (39,81 \pm 9,48), A438079 (41,40 \pm 14,39), TcdA+BBG (59,18 \pm 11,41) e TcdA+A438079 (66,06 \pm 20,61), o único que demonstrou-se uma redução significativa de 55,30% no grupo TcdA+BBG comparado a TcdA.

A TcdA (2589 \pm 467,5) promoveu aumento relevante, quando comparado ao controle (449,6 \pm 143,0), de 475,84% na dosagem da citocinas IL-6 (Figura 21C), que não apresentou diferença para os grupos BBG (622,5 \pm 188,9) e A438079 (203,3 \pm 37,48), enquanto os grupos tratados com inibidores e TcdA causaram uma redução significativa de 55,81% e 93,50%, respectivamente TcdA+BBG (1144 \pm 412,2) e TcdA+A438079 (168,2 \pm 84,07). Na dosagem de IL-8 (Figura 21D), verificou-se um acréscimo significativo de 72,18% no grupo TcdA (6016 \pm 231,0) em comparação ao controle (3494 \pm 350,7); já nos grupos BBG (4642 \pm 296,6), A438079 (3747 \pm 180,5), TcdA+BBG (5045 \pm 63,95) e TcdA+A438079 (4140 \pm 50,05), o único que demonstrou uma redução significativa de 31,18% em relação a TcdA foi o grupo TcdA+A438079.

Com a finalidade de verificar o efeito do BBG e A438079 sobre os neurônios foi realizado a imunohistoquímica para HuC/D (pan neuronal) em corte transversal da alça ileal. Observou-se no controle (Figura 22A) a marcação para HuC/ D no plexo mioentérico e em grande quantidade, se comparada ao grupo TcdA (0,87 \pm 0,07), que apresentou redução no número de neurônios de 61,3%. Nos grupos BBG (1,25 \pm 0,12) (Figura 22C) e A438079 (2,02 \pm 0,24) (Figura 22E) verificou-se a marcação do HuC/D semelhante ao grupo controle (2,25 \pm 0,16), contudo no grupo TcdA +BBG (0,74 \pm 0,08) (Figura 22D) não houve melhora, diferente do grupo TcdA+A438079 (1,47 \pm 0,03) (Figura 22F), no qual observou-se um aumento significativo de 68,79% na área positiva para HuC/D em relação ao grupo TcdA, como mostrado na figura 22G, tanto na região do plexo mioentérico, quanto do plexo submucoso. Portanto a partir desses resultados podemos inferir que o receptor P2X7 tem um papel na patogênese da DACD induzida pela TcdA podendo estar envolvido na perda neuronal.

Figura 19: Efeito dos inibidores de P2X7 sobre o tecido ileal de animais injetados com a TcdA do *C. difficile* através da coloração HE.

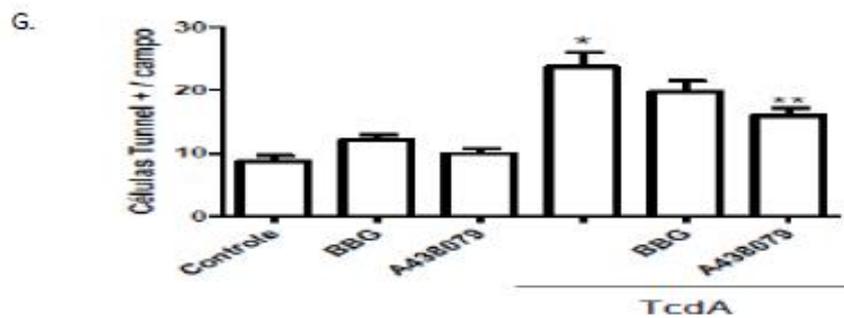
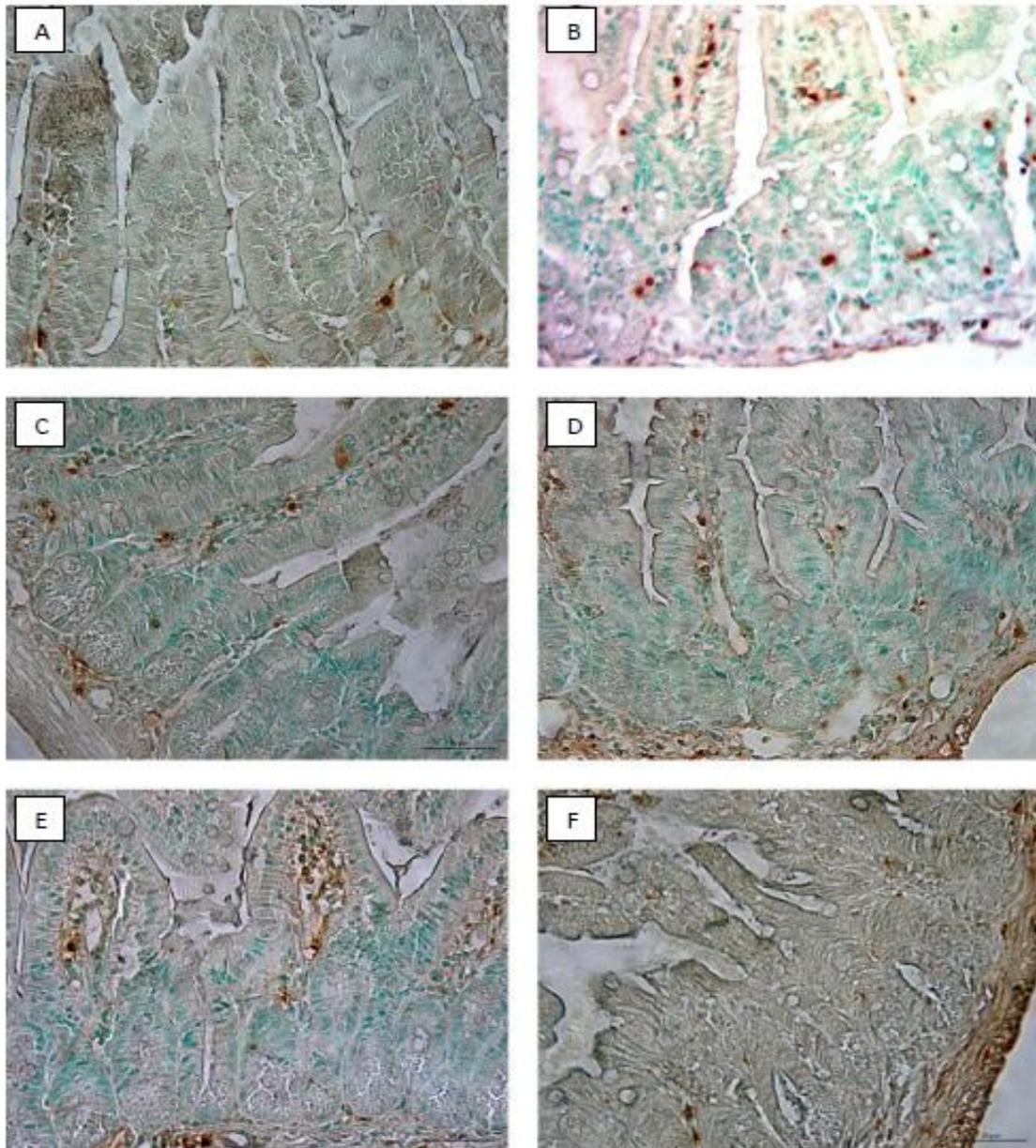


G.

Escores histológicos	Controle	BBG	A438079	TcdA		
				-	BBG	A438079
	0(0-1)	0(0-1)	0(0-1)	3(2-3)*	1(1-2)**	1(0-2)**

Fonte: Próprio autor. A alça ileal dos camundongos foi injetada com salina (Cloreto de Sódio 0,9%- Controle) ou TcdA (50 µg/alça) em camundongos previamente tratados, com os inibidores: BBG (50 mg/kg) ou A438079 (10 µM) via intraperitoneal 1h antes da injeção com a TcdA (TcdA+BBG; TcdA+A438079) ou salina, e eutanaziados após 4h para coleta da alça ileal. Coloração HE: Controle (A.), TcdA (B.), BBG (C.), TcdA+BBG (D.), A438079 (E.) e TcdA+A438079 (F.)., aumento de 20x. Tabela com os escores histológicos (G), os escores variando de 0 a 3 de acordo com os parâmetros inflamatórios apresentados na lesão (CAVALCANTE *et al.*, 2006). * p<0,05 em relação ao controle. **p<0,05 em relação ao TcdA. Teste ANOVA e pós teste Bonferroni. Todas as figuras foram obtidas na escala de 12,5µm.

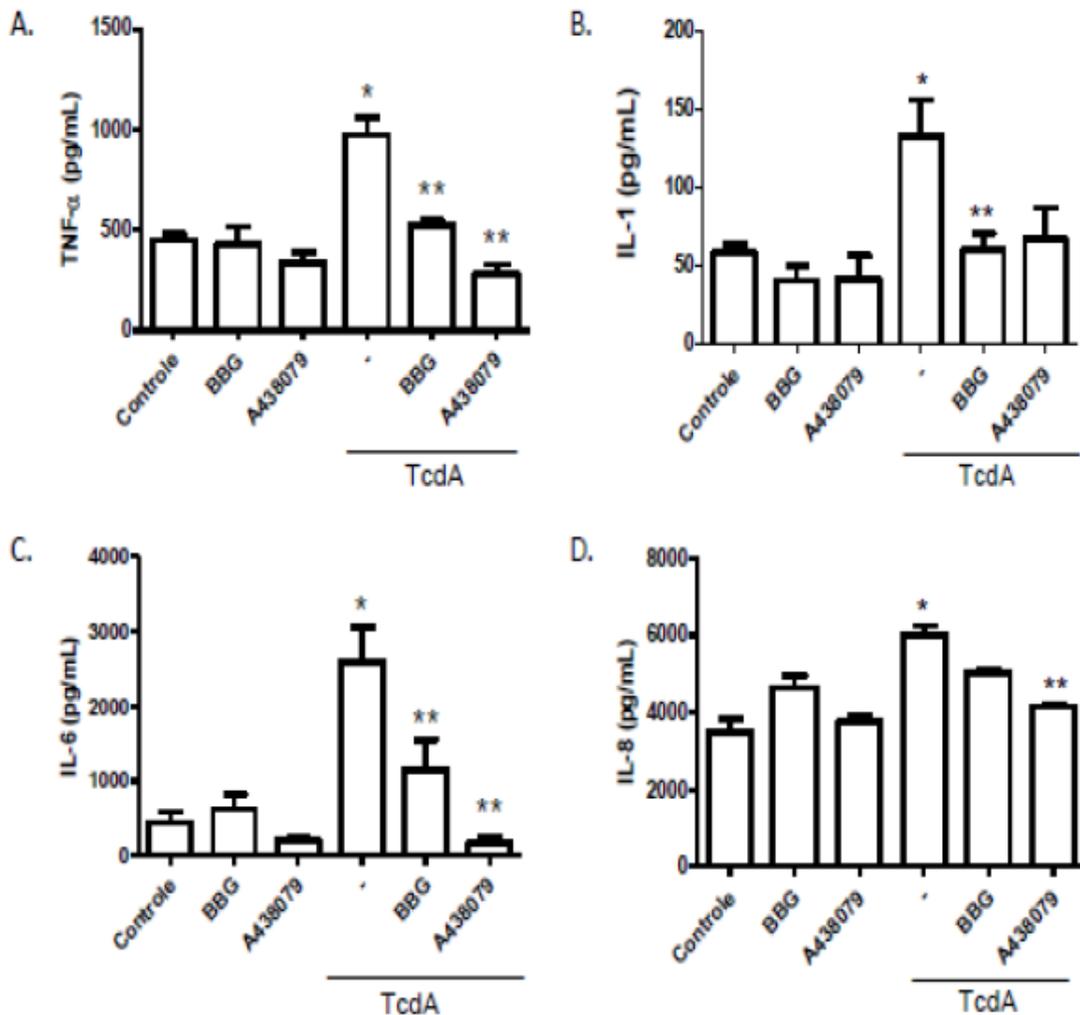
Figura 20: Efeito dos inibidores de P2X7 sobre os animais injetados com a TcdA do *C. difficile* através do método de TUNEL.



Fonte: Próprio autor. A alça ileal dos camundongos foi injetada com salina (Cloreto de Sódio 0,9% - Controle) ou TcdA (50 µg/alça) em camundongos previamente tratados, com os inibidores: BBG (50 mg/kg) ou A438079 (10 µM) via intraperitoneal 1h antes da injeção com a TcdA (TcdA+BBG; TcdA+A438079) ou salina, e eutanaziados

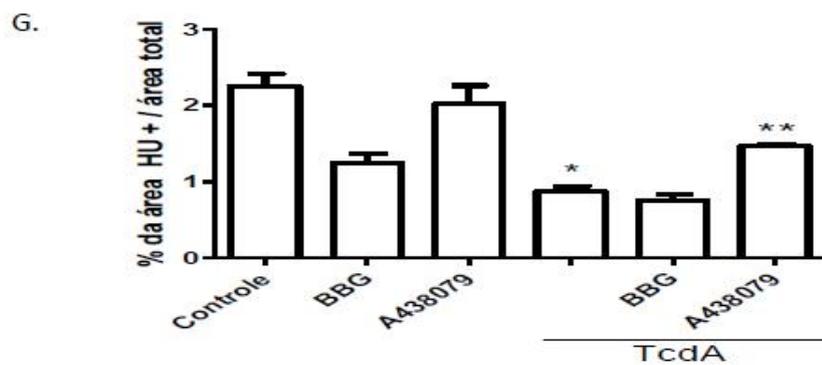
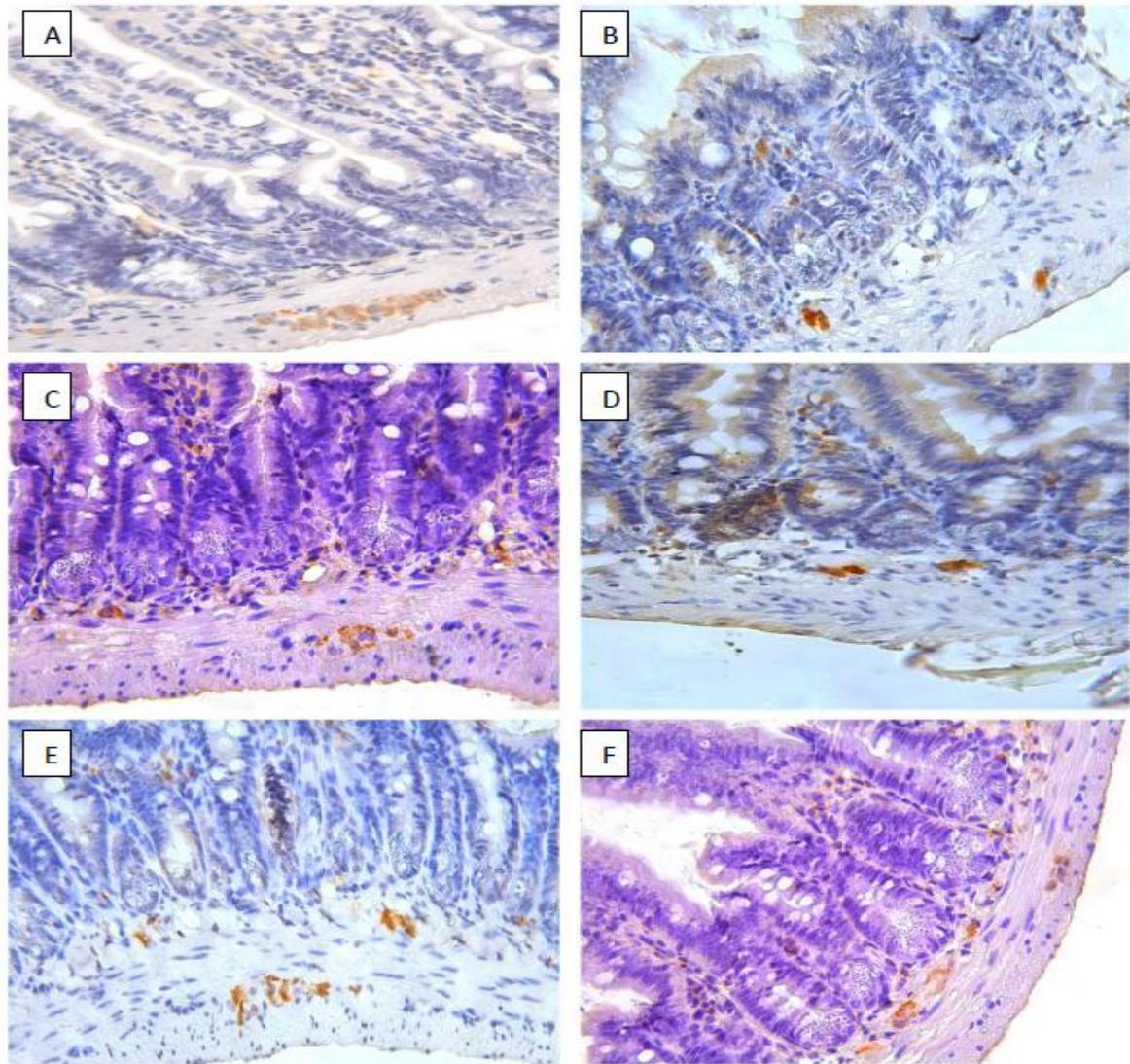
após 4h para coleta da alça ileal. Marcação das células TUNEL positivas: Controle (A.), TcdA (B.), BBG (C.), TcdA+BBG (D.), A438079 (E.) e TcdA+A438079 (F.). Aumento (40X). Gráfico com quantificação da marcação das células TUNEL positivas, sendo quantificado 20 campos de cada grupo (G). * $p < 0,05$ em relação ao controle. ** $p < 0,05$ em relação ao TcdA. Teste ANOVA e pós teste Bonferroni. Todas as figuras foram obtidas na escala de 50 μ m.

Figura 21: Dosagem das citocinas: TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 na alça ileal de animais injetados com salina ou TcdA do *C. difficile*, tratados ou não com inibidores de P2X7.



Fonte: Próprio autor. A alça ileal dos camundongos foi injetada com salina (Cloreto de Sódio 0,9%- Controle) ou TcdA (50 μ g/alça) em camundongos previamente tratados, com os inibidores: BBG (50 mg/kg) ou A438079 (10 μ M) via intraperitoneal 1h antes da injeção com a TcdA (TcdA+BBG; TcdA+A438079) ou salina, e eutanaziados após 4h para coleta da alça ileal. Dosagem de TNF- α (A), dosagem de IL-1 β (B), dosagem de IL-6 (C) e dosagem de IL-8(D). * $p < 0,05$ em relação ao controle. ** $p < 0,05$ em relação ao TcdA. Teste ANOVA e em seguida teste Bonferroni.

Figura 22: Efeito dos inibidores de P2X7 sobre a expressão do marcador o pan neuronal HuC/D em os animais injetados com a TcdA do *C. difficile*.



Fonte: Próprio autor. A alça ileal dos camundongos foi injetada com salina (Cloreto de Sódio 0,9% - Controle) ou TcdA (50 µg/alça) em camundongos previamente tratados, com os inibidores: BBG (50 mg/kg) ou A438079 (10 µM) via intraperitoneal 1h antes da injeção com a TcdA (TcdA+BBG; TcdA+A438079) ou salina, e eutanaziados

após 4h para coleta da alça ileal. Imunohistoquímica para HuC/D: Controle (A.), TcdA (B.), BBG (C.), TcdA+BBG (D.), A438079 (E.) e TcdA+A438079 (F.). Aumento (40X). Gráfico mostrando a área neuronal positiva para HuC/D em comparação a área neuronal total, sendo quantificado 30 campos de cada grupo (G). * $p < 0,05$ em relação ao controle. ** $p < 0,05$ em relação ao TcdA. Teste ANOVA e pós teste Bonferroni. Todas as figuras foram obtidas na escala de 50 μ m.

4.5 O Efeito da TcdA do *C. difficile* e dos inibidores de P2X7 sobre as células Gliais

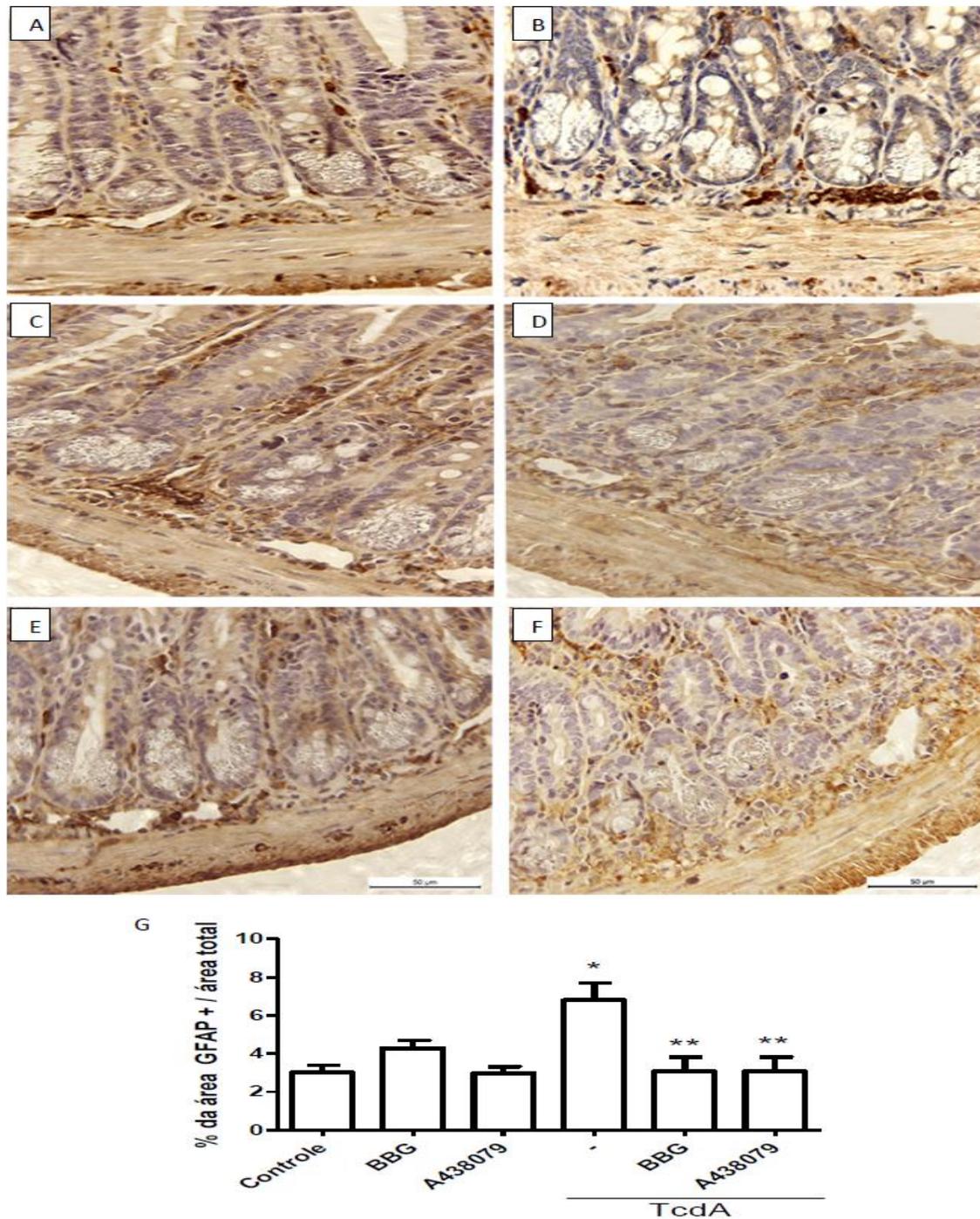
Dando sequência aos experimentos, foi realizado imunohistoquímica para os marcadores de células gliais; GFAP e S100, nos quais observou-se um aumento dos dois marcadores no grupo TcdA conforme as Figuras 23B e 24B, no caso do GFAP observa-se que esse aumento da marcação ocorre principalmente na região do plexo submucoso e no S100 β o aumento ocorre tanto na região dos plexos submucoso e mioentérico como na região próxima ao epitélio.

Na Figura 23 mostra-se a marcação para GFAP em todos os grupos experimentais, sendo observado um aumento significativo de 125,71% da área positiva para GFAP no grupo TcdA ($6,80 \pm 0,89$) em relação ao controle ($3,02 \pm 0,36$). Os inibidores BBG e A438079 reduziram significativamente em 54,85% a área marcada para GFAP quando comparado ao grupo TcdA: TcdA+ BBG ($3,07 \pm 0,75$) (Figura 23D) e TcdA+ A438079 ($3,05 \pm 0,76$) (Figura 23F). Nos grupos BBG ($4,28 \pm 0,36$) (Figura 23C) e A438079 ($2,97 \pm 0,35$) (Figura 23E) observou-se no primeiro um leve aumento na marcação e no segundo uma redução quando comparados ao controle, mas essas diferenças não foram significativas (Figura 23G).

Observa-se no grupo TcdA ($7,50 \pm 1,11$) (Figura 24B) a marcação para S100 β no plexo mioentérico e no epitélio em grande quantidade se comparada ao grupo controle ($3,07 \pm 0,65$), sendo o aumento na área positiva para S100 β é de 144,30%. Nos grupos BBG ($4,30 \pm 0,41$) (Figura 24C) e A438079 ($2,95 \pm 0,37$) (Figura 24E) verifica-se a marcação semelhante ao grupo controle, porém nos grupos TcdA +BBG ($4,54 \pm 0,34$) (Figura 22D) e TcdA+A438079 ($3,16 \pm 0,75$) (Figura 22F), houve uma redução significativa de 39,47% e 57,86% na área positiva para S100 em relação ao grupo TcdA, respectivamente, como mostrado na Figura 24G.

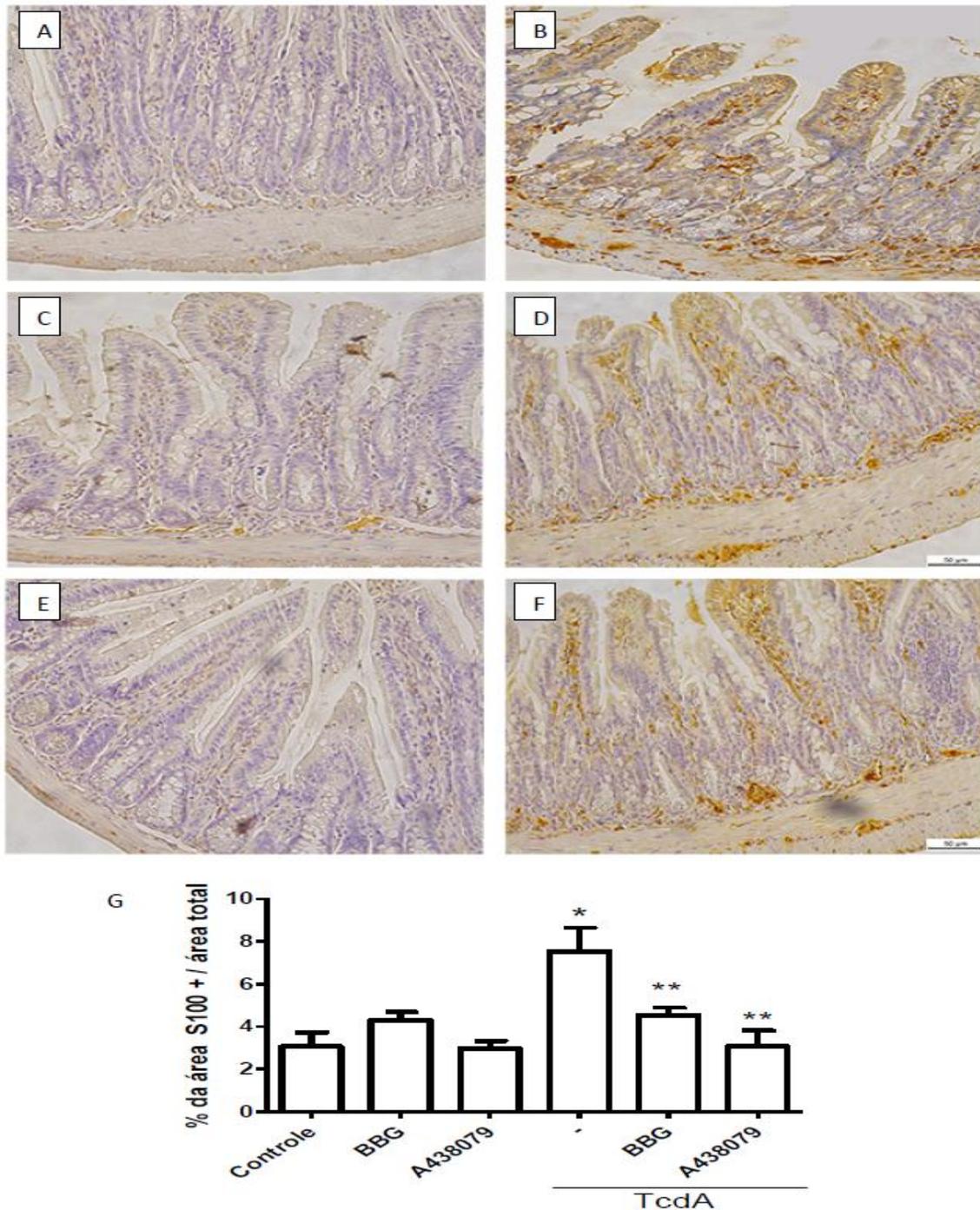
Portanto, a inibição dos receptores de P2X7 resultou na redução dos marcadores S100 β e GFAP, mostrando que a via ativada pelo receptor P2X7 pode estar relacionada com os efeitos da TcdA no hospedeiro. Ressaltando também que a TcdA do *C. difficile* promove alterações no SNE e nas células gliais.

Figura 23: Efeito dos inibidores de P2X7 sobre a expressão de GFAP em os animais injetados com a TcdA do *C. difficile*.



Fonte: Próprio autor. A alça ileal dos camundongos foi injetada com salina (Cloreto de Sódio 0,9%- Controle) ou TcdA (50 μ g/alça) em camundongos previamente tratados, com os inibidores: BBG (50 mg/kg) ou A438079 (10 μ M) via intraperitoneal 1h antes da injeção com a TcdA (TcdA+BBG; TcdA+A438079) ou salina, e eutanaziados após 4h para coleta da alça ileal. Imunohistoquímica para GFAP: Controle (A.), TcdA (B.), BBG (C.), TcdA+BBG (D.), A438079 (E.) e TcdA+A438079 (F.). Aumento (40X). Gráfico mostrando a área neuronal positiva para HuC/D em comparação a área neuronal total, sendo quantificado 30 campos de cada grupo (G). * $p < 0,05$ em relação ao controle. ** $p < 0,05$ em relação ao TcdA. Teste ANOVA e pós teste Bonferroni. Todas as figuras foram obtidas na escala de 50 μ m.

Figura 24: Efeito dos inibidores de P2X7 sobre a expressão de S100 β em os animais injetados com a TcdA do *C. difficile*.



Fonte: Próprio autor. A alça ileal dos camundongos foi injetada com salina (Cloreto de Sódio 0,9%- Controle) ou TcdA (50 μ g/alça) em camundongos previamente tratados, com os inibidores: BBG (50 mg/kg) ou A438079 (10 μ M) via intraperitoneal 1h antes da injeção com a TcdA (TcdA+BBG; TcdA+A438079) ou salina, e eutanaziados após 4h para coleta da alça ileal. Imunohistoquímica para S100 β : Controle (A.), TcdA (B.), BBG (C.), TcdA+BBG (D.), A438079 (E.) e TcdA+A438079 (F.). Aumento (40X). Gráfico mostrando a área neuronal positiva para HuC/D em comparação a área neuronal total, sendo quantificado 30 campos de cada grupo (G). * p < 0,05 em relação ao controle. **p < 0,05 em relação ao TcdA. Teste ANOVA e pós teste Bonferroni. Todas as figuras foram obtidas na escala de 50 μ m.

5 DISCUSSÃO

Diante, dos resultados encontrados mostrou-se que a TcdA do *C. difficile* reduz a densidade neuronal, tanto de uma forma geral como ao ser analisado os códigos químicos específicos. No SNE observou-se uma redução nos números dos neurônios imunorreativos a ChAT e a Calr e não houve alteração significativa naqueles imunorreativos a NOS.

Estudo realizado por Brito e colaboradores (2016) mostrou que em camundongos durante o processo de envelhecimento ocorrem grandes perdas dos neurônios do SNE, havendo um possível envolvimento da regulação da função gastrointestinal, além das alterações nas junções ileocecais, onde ocorrem também nos padrões das fibras colágenas, levando a distúrbios intestinais como a diminuição da motilidade. Esta informação é relevante pois a enterite induzida pela TcdA do *C. difficile* leva a uma redução de neurônios entéricos, como foi demonstrado neste estudo, além de alterar as junções oclusivas das células epiteliais pela desorganização no citoesqueleto (SANTOS *et al.*, 2013).

Estudos realizados por Mantyh, McVey e Vigna (2000) e Lima *et al.* (2008), mostraram-se que TcdA diminuía as alterações morfológicas e os danos inflamatórios, respectivamente, quando havia deservação extrínseca, ou seja, ausência de uma parte do SNE; e no experimento de contratilidade observou-se um aumento transitório da motilidade para em seguida reduzir ou mesmo extinguir a motilidade espontânea, podendo estar relacionado à morte neuronal, que foi observado no presente estudo.

No presente trabalho verificou-se que a densidade de neurônios NOS não apresentou alterações entre os grupos controle e TcdA, diferente do encontrado no modelo de colite ulcerativa (SILVA *et al.*, 2015) e no modelo de isquemia e reperfusão (PALOMBIT *et al.*, 2013), onde houve redução significativa desses tipos de neurônios. Os neurônios imunorreativos NOS têm um importante papel na função motora inibitória do intestino, pois o óxido nítrico é o maior mediador do relaxamento do músculo liso não adrenérgico e não colinérgico (AIMI *et al.*, 1993).

A marcação para os ChAT é expressa em neurônios motores excitatórios, interneurônios e neurônios aferentes intrínsecos (PHILLIPS; KIEFFER; ILLES, 2006), e Calr, que é uma proteína ligada ao Ca²⁺ envolvida no processo de sinalização do mesmo e está presente nos neurônios colinérgicos excitatórios (BAIMBRIDGE; CELIO; ROGERS, 1992). Neste trabalho observou-se uma redução significativa de neurônios positivos para ChAT e para

Calr corroborando com o descrito por Palombit e colaboradores (2013) e Silva e colaboradores (2015). Porém esses achados diferem dos dados relatados no modelo de desnutrição, no qual houve um aumento da densidade neuronal de todos os códigos neuroquímicos testados neste trabalho (GIROTTI *et al.*, 2013).

Devido a diminuição dos neurônios imunorreativos ChAT e Calr, que marcam neurônios motores excitatórios, infere-se que TcdA altera a motilidade intestinal promovendo a paralisia desta musculatura. Portanto a diarreia (BLOSSOM; MACDONALD, 2007; DIAL *et al.*, 2005; KEEL *et al.*, 2007), característica da patologia, provavelmente seria de origem inflamatória e resultado de destruição de mucosa podendo estar relacionada também ao aumento transitório da motilidade descrito por Lima e colaboradores (2008), seguida de dismotilidade que é comum em modelos de colite (ROBERTS *et al.*, 2012).

A literatura mostra que modelos de isquemia e reperfusão, colite ulcerativa e desnutrição não se alteraram a codificação neuroquímica para colocalização dos marcadores utilizados: P2X7, ChAT, NOS e Calr (GIROTTI *et al.*, 2013; PALOMBIT *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2015). Em Silva e colaboradores (2015) foi demonstrado que 100% dos neurônios expressavam P2X7 nas colocalizações, supondo-se que morte neuronal estaria relacionada com o fato de em condições patológicas aumenta-se a concentração de ATP levando a ativação de P2X7 ligado a Panx-1, e por consequência aumenta o influxo de Ca^{2+} (GULBRANSEN *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2015; YENARI; KAUPENIN; SWANSON, 2010). Encontrou-se uma expressão aumentada de P2X7 nos neurônios avaliados $75 \pm 2,60\%$ e $86 \pm 1,44\%$ respectivamente NOS/P2X7 e Calr/P2X7, mostrando conjuntamente com os dados da densidade, um aumento na marcação para P2X7, que pode ser justificado pela expressão deste receptor em todos os tipos de neurônios, para os quais não foram utilizados marcadores e também pelo aumento da marcação para P2X7 em outros tecidos como epitélio e musculatura longitudinal, mostrando que existe uma provável relação entre P2X7 e a lesão induzida pela TcdA.

Em relação a morfometria, verificou-se um aumento na área dos neurônios marcados positivamente para ChAT e NOS, podendo estar relacionado ao aumento do influxo Ca^{2+} intracelular relacionada ao receptor P2X7, levando a produção de óxido nítrico e a morte celular pelo processo de necrose, onde se percebe o intumescimento celular (DONG *et al.*, 2006). Estes resultados diferem do efeito da TcdA nas células epiteliais intestinais, no qual observa-se a redução da área celular devido ao colapso do citoesqueleto (SANTOS *et al.*, 2013) mas concordam com Genth e colaboradores (2008), no qual afirmam que a morte celular por

necrose pode ser mais relevante que a apoptose na DACD. Acredita-se que a Calr está envolvida na regulação do Ca^{2+} intracelular, por isso os neurônios reativos a esta proteína não sofreram alterações na área neuronal segundo estudos de Girotti *et al.*, 2013; Palombit *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2015.

Os dados de imunofluorescência no SNE, imunohistoquímica, PCR do corte transversal da alça ileal revelaram um incremento acentuado da distribuição do receptor P2X7 no grupo TcdA em relação ao controle, principalmente ao nível dos gânglios mioentéricos, que ocorreu em concomitância com o aparecimento de imunopositividade do receptor no músculo longitudinal e epitélio. Estes resultados estão de acordo com dados que indicam aumento da expressão do receptor de P2X7, em modelos de colite (ANTONIOLI *et al.*, 2014; KURASHIMA; GOTO; KIYONO, 2013; MARQUES *et al.*, 2014; NEVES *et al.*, 2014).

Antonioli e colaboradores (2014), em um modelo de colite induzida por DNSB forneceu evidências de que, em condições normais, uma pequena parte dos receptores P2X7, expresso nos gânglios mioentéricos, age ao nível neuronal em um controle inibitório tônico sobre a motilidade colinérgica excitatória. A indução de inflamação colônica está associada com um aumento das concentrações de ATP extracelular. A presença de inflamação do intestino, leva ao aumento da marcação do receptor P2X7, e uma ação reforçada na modulação destes receptores, sendo evidente, as alterações na neuromotilidade do cólon. Estas observações suportam a ideia de que, na presença de inflamação do intestino, receptores P2X7 assumem um papel de destaque no controle inibitório da motilidade do cólon de ratos, modulando as vias excitatórias colinérgicas através da ativação de neurônios nitrérgicos inibitórios. Em concordância com este conceito, como foi previamente descrito por Hu *et al.* (2001), ocorreu a colocalização dos receptores P2X7 com NOS no plexo mientérico do íleo de animais experimentais, corroborando com os dados encontrados nesta pesquisa, nos quais a colocalização NOS/P2X7 aumentou no grupo TcdA em relação ao controle. Nesse contexto, os níveis aumentados de P2X7 encontrado nas camadas musculares, apesar de ser indeterminado a sua função, acredita-se na possibilidade de que a indução do receptor P2X7 no compartimento muscular do intestino inflamado pode cumprir atividades reguladoras independentes para a via colinérgica ou ligados a outros mecanismos inflamatórios não relacionados com as funções motoras entéricos (ANTONIOLI *et al.*, 2014; HU *et al.*, 2001; METHA *et al.*, 2014).

A ativação do receptor P2X7 por ATP induz o influxo Ca^{2+} e Na^+ e efluxo de K^+ , o que provoca uma alteração da permeabilidade celular, originando a formação de um grande poro da membrana (RASSENDREN *et al.*, 1997; SURPRENANT *et al.*, 1996), o qual

eventualmente leva a morte celular (GULBRANSEN *et al.*, 2012; METHA *et al.*, 2014). Sob condições fisiopatológicas, o ATP liberado a partir de células mortas pode aumentar a ativação do receptor P2X7 e ativar o NLRP3, levando o inflamassoma a secretar citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina 18 (IL-18) (DIVIRGILIO 2006; MEHTA *et al.*, 2014). Embora o P2X7 seja expresso por uma grande variedade de tipos de células, a atividade de P2X7 é melhor descrito em células do sistema imunológico (BURNSTOCK, 2006; DIVIRGILIO, 2006; KAHLENBERG; DUBYAK, 2004; MEHTA *et al.*, 2014; SOLLE *et al.*, 2001).

Acredita-se que o ATP é liberado por canais Panx-1 e possivelmente hemicanais Cx43. O ATP atua de forma autócrina e/ou parácrina, em conjunto com os receptores P2X7. No contexto da inflamação, a ativação do complexo Panx-1 / P2X7 pode levar à formação do inflamassoma envolvendo a caspase-1, o qual por sua vez conduz à liberação de IL-1 β . O mecanismo pelo qual isto ocorre, porém, é desconhecido (SURPRENANT; NORTH, 2009). Panx-1 está envolvida na regulação da liberação de ATP que, em conjunto com P2X1, P2X4 e P2X7, media as respostas das células T, tais como a entrada de Ca²⁺ e da síntese de IL-2 (WOEHRLE *et al.*, 2010). Em astrócitos, a expressão de Panx-1 é necessária para a liberação de IL-6, IL-8 e glutamato (WEI *et al.*, 2016). Lohman e colaboradores (2015) mostraram que a ativação de células endoteliais vasculares por TNF- α provoca a liberação de ATP mediada pelo hemicanal Panx-1, conduzindo à migração de leucócitos durante a inflamação.

O ATP extracelular é um sinal de perigo que alerta o sistema imunológico da ameaça de morte celular anormal. Huang e colaboradores (2016) demonstraram *in vivo*, que os receptores P2X7 em células epiteliais tem um papel crítico na detecção de danos induzidos pela infecção, incluindo a ativação de P2X7 em macrófagos e células dendríticas associada à ativação do inflamassoma, mediando caspase-1-e maturação de IL-1 β e IL-18, dados que concordam com o presente estudo, no qual observou-se um aumento do P2X7 em células epiteliais e das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α nos animais injetados com TcdA.

A glia entérica é um relevante componente do SNE, estando ativamente envolvida no controle da motilidade, barreira epitelial, além de atuar como ponte celular e molecular entre os nervos entéricos, células enteroendócrinas e células do sistema imunológico dependendo da localização (SHARKEY, 2015). As células da glia entérica (CGE) encontram-se distribuídas no SNE, no plexo mioentérico e submucoso, e abaixo do epitélio, muito próximo a borda epitelial, ao longo da mucosa intestinal e na camada muscular (GULBRANSEN; SHARKEY, 2012; SAVIDGE *et al.*, 2007). Essas células expressam marcadores como S100 β e a GFAP

(BOESMAN *et al.*, 2014), que foram os marcadores utilizados neste estudo, no qual mostramos que a TcdA do *C. difficile* induz o aumento na marcação de área positiva para esses marcadores, quando comparado ao grupo controle.

Esse aumento de GFAP, corrobora com os dados encontrados por Von Boyen e colaboradores (2011) que mostraram níveis elevados de GFAP na mucosa intestinal de pacientes com colite ulcerativa inflamada e na colite infecciosa por *C. difficile* em comparação a pacientes controle e portadores de colite ulcerativa não inflamada. Costa *et al.* (2016) relatou o aumento dos níveis de GFAP em animais, onde foi induzida a mucosite por 5-FU. Em contrapartida, Cornet e colaboradores (2001) revelaram que o GFAP estava reduzido em pacientes com Doença de Chron não inflamados. Apesar das funções desta proteína ainda não serem claras, a sua quantidade se relaciona com o estado funcional da CGE (BRAUDY *et al.*, 2012).

Em pacientes com colite ulcerativa e infecciosa ocorre um aumento da expressão de GFAP e imunorreatividade ao S100 β associado ao aumento da produção de óxido nítrico através da estimulação da via do iNOS através da ativação da RAGE, levando a hipótese que as CGE são ativadas durante a colite, contribuindo para propagação do processo inflamatório (CIRILLO *et al.*, 2009; 2011; OCHOA-CORTES *et al.*, 2016; VON BOYEN *et al.*, 2011). Esse aumento do S100 β ratifica os dados encontrados nesta pesquisa, levando a conjectura de que as CGE assumem um fenótipo reativo, aumentando a sua proliferação, a expressão de proteínas gliais, alteração de funções e a expressão de fatores neurotróficos, atuando na patogênese da DACD (COELHO-AGUIAR *et al.*, 2015; VON BOYEN *et al.*, 2011).

A proteína S100 β é especificamente expressa pelas CGE, sendo uma proteína que em baixas concentrações, nanomolares, regula a homeostase microambiental e em concentrações maiores, micromolares, relaciona-se com o processo patológico inflamatório através da ativação de MAP quinase e fator de ativação nuclear- κ B (NF- κ B), levando à transcrição de diferentes citocinas (OCHOA-CORTES *et al.*, 2016; RÜHL, 2005). A expressão da mesma está aumentada nos processos inflamatórios, em resposta aos primeiros sinais de destruição da barreira epitelial intestinal, ocorrendo também em pacientes celíacos, sugerindo que essa regulação positiva faz com que a CGE participe diretamente da inflamação (CIRILLO *et al.*, 2009). As células glias no SNE tais como no cérebro, expressam receptores TLR regulando a imunidade inata, através de mecanismos moleculares e de sinalização. As CGE regulam a homeostase intestinal, sendo capazes de liberar uma gama de fatores de proteção (GNSO e GNDF) e fatores destrutivos (IL-1 β , TNF- α e IL-6), entre outros sinalizadores

(OCHOA-CORTES *et al.*, 2016; RÜHL, 2005). Segundo Neunlist e colaboradores (2007), as CGEs secretam TGF- β 1 afetando negativamente a proliferação das células epiteliais, sendo esta via também ativada pela TcdA, como mostrado por Veras (2015), enfatizando o papel do fenótipo reativo das CGE na patogênese da DACD, pois a TcdA também eleva a concentração de citocinas, além de ativar a imunidade inata, através dos receptores TLR-4, NOD1 e IL-1 β (SMITS *et al.*, 2016).

Conforme Liu e colaboradores (2015), o P2X7 desempenha um papel importante na resposta inflamatória, no processo de transmissão da dor nociceptiva e no modelo de hiperalgésia visceral, em que se observa um aumento da expressão gênica e proteica do P2X7 e uma colocalização com o GFAP, que estimula a excitabilidade neuronal liberando ATP, que pode fazer a supregulação da expressão de P2X7, afetando o processo nociceptivo, como uma alça de retroalimentação.

A citocina próinflamatória IL-1 β , ativada em macrófagos e micróglia do sistema nervoso central (SNC), estava elevada conjuntamente com marcadores gliais nos animais que foram injetados com TcdA e apresentaram uma redução dos seus níveis nos grupos onde foram utilizados inibidores do receptor P2X7. A liberação de IL-1 β depende da função do receptor P2X7, que necessita da formação dos poros, sendo este independente de citólise. Vale lembrar que essa interleucina acelera a resposta das células tróficas gliais e ciclos deletérios de neuroinflamação e neurodegeneração; quanto maior o número de receptores P2X7, maior o número de poros, e por consequência maior a ativação da micróglia do SNC, o que resulta no aumento da liberação IL-1 β (MONIF *et al.*, 2016; SLUYTER; SHERMAN; WILEY, 2004). Essa informação corrobora com dados encontrados, podendo inferir que o receptor P2X7 exerce o mesmo efeito na CGE.

A manipulação deste receptor pode ser uma terapia promissora tanto para patologias como Alzheimer e Parkinson quanto a DACD (GU *et al.*, 2001; MONIF *et al.*, 2016; SLUYTER; SHERMAN; WILEY, 2004).

As purinas geradas durante o processo inflamatório induzem a morte de neurônios entéricos pela ativação do receptor P2X7, o qual promove a liberação de ATP, através dos canais de Panx-1, que em seguida recruta Ca⁺² intracelular, o qual responde a CGE próximas. O fenótipo reativo CGE, segundo estudo realizado por Brown e colaboradores (2016), induz a morte dos neurônios entéricos através de um mecanismo dependente do hemicanal Cx43, que

está relacionado aos mediadores ATP e óxido nítrico. Por conseguinte, entende-se que este mecanismo tem relevância para doença inflamatória intestinal (DII) como na patogênese das alterações induzidas pela TcdA do *C. difficile*, pois justifica-se os dados aqui apresentados, nos quais demonstraram a elevação dos marcadores gliais e a morte dos neurônios entéricos e a elevação do receptor P2X7.

Huang e colaboradores (2016), relataram que na ausência ou bloqueio de P2X7, respostas à infecção epiteliais *in vivo* e *in vitro*, foram também reduzidos, sugerindo um papel regulador para o P2X7 no reconhecimento do patógeno-padrão de sinalização pró-inflamatória mediada por este receptor. Além disso, o mesmo promove a redução da infiltração precoce das células dendríticas demonstrando o papel pró-inflamatório do P2X7 como um sensor de potencial de danos nos tecidos para iniciar a inflamação. Na presente pesquisa, mostrou-se que ao utilizar os inibidores do receptor P2X7, BBG e A438079, tem-se a melhora do processo inflamatório, como a redução na secreção de citocinas pró-inflamatórias, a diminuição das lesões morfológicas e de células TUNEL positivas, além da redução na quantidade de marcadores de células gliais.

Marques e colaboradores (2014) mostraram que em um modelo de colite induzida por TNBS, o bloqueio do receptor P2X7 resultou na diminuição das células T e do infiltrado de macrófagos na *lâmina própria*, além da redução na gravidade global da inflamação, o que corrobora com os resultados do presente estudo da análise histológica e da citocinas. Enquanto Gulbransen e colaboradores (2012), no modelo de colite, mostraram que a inibição de P2X7, Panx-1 e a atividade da caspase atenua o processo inflamatório. Brito e colaboradores (2002a) mostraram que a TcdA tem o seu processo de ativação de apoptose reduzido quando se faz bloqueio de caspases 1, 3, 6, 8 e 9. Antonioli *et al* (2014) também mostraram que em doenças inflamatórias intestinais, o uso de bloqueadores de P2X7 melhora a atividade motora intestinal.

Os dados do presente trabalho sugerem que o receptor P2X7 está envolvido na patogênese da lesão induzida por TcdA do *C. difficile*, e que seu bloqueio pode inibir as alterações histológicas, a inflamação, a gliose reativa e a morte neuronal.

6 CONCLUSÕES

- A TcdA induz o aumento da expressão do receptor P2X7, que está relacionado com o processo inflamatório promovido pela patologia.
- A TcdA promove alterações no sistema nervoso entérico, principalmente promovendo a morte neuronal, ligada a ativação do receptor P2X7.
- Em relação as células gliais, TcdA ativa o fenótipo reativo dessas células, que interage com os receptores P2X7, também na promoção desse processo inflamatório.
- Ao ser utilizado os inibidores de P2X7, observa-se uma melhora desse quadro inflamatório, mostrando que o mesmo é importante na patogenese da DACD e pode ser uma via para desenvolvimento de terapias medicamentosas eficientes tanto para esta patologia como para outras doenças inflamatórias intestinais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADRIOUCH, S; DOX, C; WELGE, V; SEMAN, M; KOCH-NOLTE, F; HAAG, F. Cutting AGA, M; JOHNSON, CJ; HART, AP; GUADARRAMA, AG; SURESH, M; SVAREN, J; BERTICS, PJ; DARIEN, BJ. Modulation of monocyte signaling and pore formation in response to agonists of the nucleotide receptor P2X(7). **J Leukoc Biol.** v.72, n.1, p.222-32. 2002
- AIMI, Y; KIMURA, H; KINOSHITA, T; MINAMI, Y; FUJIMURA, M; VINCENT, SR. Histochemical localization of nitric oxide synthase in rat enteric nervous system. **Neuroscience.** v.53, n.2, p.553-60. 1993.
- Allen, S. J. The potential of probiotics to prevent *Clostridium difficile* infection. **Infect. Dis. Clin. North Am.** 29, 135–144 (2015).
- ANDERSON, RJ; RAY, CJ; POPOFF, MR. Evidence for rho protein regulation of renal tubular epithelial cell function. **Kidney Int.**v.58, p.1996–2006. 2000
- ANLAUF, M; SCHÄFER, MK; EIDEN, L; WEIHE, E. Chemical coding of the human gastrointestinal nervous system: cholinergic, VIPergic, and catecholaminergic phenotypes. **J Comp Neurol.** v.21, n.459(1), p.90-111. 2003.
- ANTONIOLI, L; GIRON, MC; COLUCCI, R; PELLEGRINI, C; SACCO, D; CAPUTI, V; ORSO, G; TUCCORI, M; SCARPIGNATO, C; BLANDIZZI, C; FORNAI, M. Involvement of the P2X7 Purinergic Receptor in Colonic Motor Dysfunction Associated with Bowel Inflammation in Rats. **PLoS ONE.** v.9, n.12, p. e116253. 2014
- ARTEAGA, A; SANTA-OLALLA, P; SIERRA, MJ; LIMIA, A; CORTÉS, M; AMELA, C. Riesgo epidémico de la enfermedad asociada a una nueva cepa de *Clostridium difficile*. **Enferm Infecc Microbiol Clin.**v.27, n.5, p. 278–284.2009
- ASSIS, T. O., **Análise da virulência de cepas de Clostridium difficile isoladas de pacientes com diarreia no hospital Haroldo Juaçaba do ICC.** 102f. tese (DINTER em Ciências Morfológicas- UFC/UFRJ) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Fortaleza -Ceará, 2015.
- AUSIELLO, CM; CERQUETTI, M; FEDELE, G; SPENSIERI, F; PALAZZO, R; NASSO, M; FREZZA, S; MASTRANTONIO, P. Surface layer proteins from *Clostridium difficile* induce inflammatory and regulatory cytokines in HuC/Dman monocytes and dendritic cells. **Microbes Infect.**v.8, p. 2640–2646. 2006.
- BAIMBRIDGE, KG; CELIO, MR; ROGERS, JH. Calcium-binding proteins in the nervous system. **Trends Neurosci.**v.15, p.303–308. 1992.
- BALASSIANO, IT; MIRANDA, KR; BOENTE, RF; PAUER, H; OLIVEIRA, ICM, SANTOS-FILHO, J; AMORIM, ELT; CANINÉ, GA; SOUZA, CF; GOMES, MZR; FERREIRA, EO; BRAZIER, JS; DOMINGUES, RMCP. Characterization of *Clostridium difficile* strains isolated from immunosuppressed in patients in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Anaerobe.** v.15, p. 61–64. 2009

BALASSIANO, IT *et al.*, *Clostridium difficile*: a problem of concern in developed countries and still a mystery in Latin America. **J. Med. Microbiol.** v.61, p.169-179. 2012.

BARRETO, AR; CAVALCANTE, IC; CASTRO, MV; JUNQUEIRA, AF; VALE, MR; RIBEIRO, RA; SOUZA, MH; BRITO, GA. Funcoidin prevents *Clostridium difficile* toxin-A-induced ileal enteritis in mice. **Dig. Dis. Sci.** v. 53, n.4, p. 990-6, 2008.

BARTH, H; PFEIFER, G; HOFMANN, F; MAIER, E; BENZ, R; AKTORIES, K. Low pH-induced formation of ion channels by *Clostridium difficile* toxin B in target cells. **J Biol Chem.** v.276, p.10670-10676. 2001

BARTLETT, J.G.; GERDING, D.N. Clinical recognition and diagnosis of *Clostridium difficile* infection. **Clin. Infect. Dis.**v. 46 , p. S12–S18. 2008.

BECKEL, JM; ARGALL, AJ; LIM, JC; XIA, J; LU,W; COFFEY, EE *et al.*(2014). Mechanosensitive release of adenosine 5'-triphosphate through pannexin channels and mechanosensitive upregulation of pannexin channel sin optic nerve head astrocytes: a mechanism for purinergic involvement in chronic strain. **Glia** 62,1486–15015. 2014

BELLA, SD; ASCENZI, P; SIARAKAS, S; PETROSILLO, N; MASI, AD. Clostridium difficile Toxins A and B: Insights into Pathogenic Properties and Extraintestinal Effects. **Toxins.**v.8, n. 134, p.1-25. 2016.

BHATTACHARJEE, D. *et al.* Reexamining the germination phenotypes of several *Clostridium difficile* strains suggests another role for the CspC germinant receptor. **J. Bacteriol.** v.198, p. 777–786. 2015.

BLOSSOM, DB; MCDONALD, LC. The challenges posed by reemerging *Clostridium difficile* infection. **Emerg Infect Dis.** v.45, p.222-227. 2007

BOESMANS, W; ROCHA, NP; REIS, HJ; *et al.* The astrocyte marker Aldh1L1 does not reliably label enteric glial cells. **Neurosci Lett.**v.566, p.102–105. 2014.

BORGMANN, S; KIST, M; JAKOBIAK, T; SCHOLZ, E; VON EICHEL-STREIBER, C; GRUBER, H; BRAZIER, JS; SCLTE, B. Increased number of *Clostridium difficile* infections and prevalence of *Clostridium difficile* PCR ribotype 001 in southern Germany. **Euro Surveill.**v.13, pii: 19057. 2008.

BRICKER, E; GARG, R; NELSON, R; LOZA, A; NOVAK, T; HANSEN, J. Antibiotic treatment for *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. **Cochrane Database Syst Rev.**v.1, CD004610. 2005

BRITO, GA; FUJII, J; CARNEIRO –FILHO, B; LIMA, AA; OBRIG, T; GUERRANT, RL. Mechanism of *Clostridium Difficile* toxin A – induced apoptosis in T84 cell. **J. Infect. Dis.** v.186, n.10, p.1438-1447.2002a

BRITO, GA; ORIÁ, RB; LIMA, AA; GUERRANT, RL; CARNEIRO-FILHO, B; DESTURA, RV. *Clostridium difficile* toxin A induces intestinal epithelial cell apoptosis and damage: role of Gln and Ala-Gln in toxin A effects. **Dig. Dis. Sci.** v.50, n.7, p. 1271-1278. 2005

BRITO, GA; SULLIVAN, GW; CIESLA, WPJR; CARPER, HT; MANDELL, GL; GUERRANT, RL. *Clostridium difficile* toxin A alters in vitro-adherent neutrophil morphology and function. **J Infect Dis.** v.185, n.9, p.1297-306. 2002b

BRITO, MC; GHOPARD, RP; CURY, DP; WATANABE, IS; MENDES, CE; CASTELUCCI, P. Effects of aging on the architecture of the ileocecal junction in rats. **World J Gastrointest Pharmacol Ther.** v.7, n.3, p.416-427.2016.

BROWN, IA; McCLAIN, JL; WATSON, RE; PATEL, BA; GULBRANSEN, BD. Enteric glia mediate neuron death in colitis through purinergic pathways that require connexin -43 and nitric oxide. **Cell Mol Gastroenterol Hepatol.** v.2, n.1, p.77-91.2016.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling--an overview. **Novartis Found Symp.** v.276, p.26-48.2006.

CARNEIRO-FILHO, BA; FUJJI, J; BRITO, GA; ALCANTARA, C; ORIÁ, RB; LIMA, AA; OBRIG, T; GUERRANT, RL. 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 vitro. **Infect. Immun.** v.74, n.1, p. 81-87. 2006.

CARTER, G; LYRAS, D; ALLEN, DL; MACKIN, KE; HOWARTH, PM; O'CONNOR, JR; ROOD, JI. Binary toxin production in *Clostridium difficile* is regulated by CdtR, a LytTR family response regulator. **J. Bacteriol.** v. 189, 7290-7301, 2007.

CASTELUCCI, P; ROBBINS, HL; FURNESS, JB. P2X2 purine receptor immunoreactivity of intraganglionic lamina propria endings in the mouse gastrointestinal. **Cell Tissue Res.**, v. 312, n. 2, p. 167-174, 2003.

CASTELUCCI, P; ROBBINS, HL; POOLE, DP; FURNESS, JB. The distribution of purine P2X2 receptors in the guinea pig enteric nervous system. **Histochem Cell Biol.** v.117, p.415-422. 2002a.

CASTELUCCI, P; DE SOUZA, RR; DE ANGELIS, RC; FURNESS, JB; LIBERTI, EA. Effects of pre-and postnatal protein deprivation and postnatal refeeding on myenteric neurons of the rat large intestine: a quantitative morphological study. **Cell Tissue Res.**, v. 310, p. 1-7, 2002b.

CAVALCANTE, IC; CASTRO, MV; BARRETO, AR; SULLIVAN, GW; VALE, M; ALMEIDA, PR; LINDEN, J; RIEGER, JM; CUNHA, FQ; GUERRANT, RL; RIBEIRO, RA; BRITO, GA. Effect of novel A2A adenosine receptor agonist ATL 313 on *Clostridium difficile* toxin A- induced murine ileal enteritis. **Infect Immun.** v. 74, n. 5, p. 2606-12, 2006.

CHEEWATRAKOOLPONG, B; GILCHREST, H; ANTHES, JC; GREENFEDER, S. Identification and characterization of splice variants of the human P2X7 ATP channel. **Biochem Biophys Res Commun.** v.332, p.17–27. 2005.

CHEN, L; BROSNAN, CF. Regulation of immune response by P2X7 receptor. **Crit Rev Immunol.** v.26, p. 499–513. 2006.

CHESELL, IP; SIMON, J; HIBELL, AD; MICHEL, AD; BARNARD, EA; HUMPHREY, PPA. Cloning and functional characterisation of the mouse P2X7 receptor. **FEBS Lett.** v. 439, p.26-30. 1998.

CHIOCCHETTI, R; POOLE, DP; KIMURA, H; AIMI, Y; ROBBINS, HL; CASTELUCCI, P; FURNESS, JB. Evidence that two forms of choline acetyltransferase are differentially expressed in subclasses of enteric neurons. **Cell Tissue Res.** v.311, p.11–22. 2003.

CIMOLAI, N. My difficulty with *Clostridium difficile*. **BC medical journal.** v.53, n.1, p. 20-25. 2011

CIRILLO, C; SARNELLI, G; ESPOSITO, G; TURCO, F; STEARDO, L; CUOMO, R. S100B protein in the gut: the evidence for enteroglia-sustained intestinal inflammation. **World J Gastroenterol.** v.17, n.10. p.1261-6. 2011

CIRILLO, C; SARNELLI, G; ESPOSITO, G; GROSSO, M; PETRUZZELLI, R; IZZO, P; CALÌ, G; D'ARMIENTO, FP; ROCCO, A; NARDONE, G; IUVONE, T; STEARDO, L; CUOMO, R. Increased mucosal nitric oxide production in ulcerative colitis is mediated in part by the enteroglia-derived S100B protein. **Neurogastroenterol Motil.** v.21, n.11, p.1209-e112. 2009

COELHO-AGUIAR, JM; BON-FRAUCHES, AC; GOMES, AL; et al. The enteric glia: identity and functions. **Glia.**v.63, p.921–935. 2015

CORNET, A; SAVIDGE, TC; CABARROCAS, J; et al. Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease? **Proc Natl Acad Sci USA.** v.98, p.13306–13311.2001.

COSTA, CL. *Clostridium difficile*: **Incidência da infecção e da caracterização de cepas isoladas de pacientes com diarreia internados em um hospital oncológico em Fortaleza, Ceará.** 80f. dissertação. (Mestrado em Microbiologia Médica) – Departamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza -Ceará, 2014.

COSTA, CL *et al.* Community-acquired diarrhea associated with *Clostridium difficile* in an HIV-positive cancer patient: first case report in Latin America. **International Journal of Infectious Diseases.** v.26, p.138–139. 2014

COSTA, CL *et al.* A MLST Clade 2 *Clostridium difficile* strain with a variant TcdB induces severe inflammatory and oxidative response associated with mucosal disruption. **Anaerobe.** v.40, p.76-84. 2016.

COSTA, M; FURNESS, JB. The origins, pathways and terminations of neurons with VIP-like immunoreactivity in the guinea-pig small intestine. **Neuroscience.** v.8, p. 665–676. 1983

DALLAL, RM; HARBRECHT, BG; BOUJOUKAS, AJ; SIRIO, CA; FARKAS, LM; LEE, KK; SIMMONS, RL. Fulminant *Clostridium difficile* : an underappreciated and increasing cause of death and complications. **Ann Surg** 235: 363-372. 2002

DAVIES, AH; ROBERTS, AK; SHONE, CC; ACHARYA, R. Super toxins from a super bug: structure and function of *Clostridium difficile* toxins. **Biochem. J.** v. 436, p. 517-526, 2011.

DI VIRGILIO, F. Purinergic signalling between axons and microglia. **Novartis Found Symp.** v.276, p.253-8; discussion 259-62, 275-81.2006

DIAL, S; DELANEY, JA; BARKUN, AN; SUISSA, S. Use of gastric acid-suppressive agents and the risk of community-acquired *Clostridium difficile*-associated disease. **Jama.** v. 294, p. 2989-95. 2005

DIEZMOS, EF; BERTRAND, PP; LIU, L. Purinergic Signaling in Gut Inflammation: The Role of Connexins and Pannexins. **Front. Neurosci.** v.10, p.311. 2016.

DINEEN, SS; VILLAPAKKAM, AC; NORDMAN, JT; SONENSHEIN, AL; Repression of *Clostridium difficile* toxin gene expression by CodY. **Mol Microbiol.** v. 66, p. 206-19. 2007

DOGIEL, AS. Uber den Bau der Ganglien in den Gefl echten des Darmes undder Gallenblase des Menschen. 1899.

DONG, Z; SAIKUMAR, P; WEINBERG, JM; VENKATACHALAM, MA. Calcium in cell injury and death. **Annu Rev Pathol Mech Dis.**v.1, p.405–434. 2006.

DONNELLY-ROBERTS, DL; JARVIS, MF. Discovery of P2X7 receptor-selective antagonists offers new insights into P2X7 receptor function and indicates a role in chronic pain states. **Br J Pharmacol.** v.151, n.5, p. 571-9. 2007

DRUDY, D; CALABI, E; KYNE, L; SOUGIOULTZIS, S; KELLY, E; FAIRWEATHER, N; KELLY, CP. HuC/Dman antibody response to surface layer proteins *Clostridium difficile* infection. **FEMS immunolMed. Microbiol.** V41, 273-242. 2004.

DUPUY, B; GOVIND, R; ANTUNES, A; MATAMOUROS, S; *Clostridium difficile* toxin synthesis negatively regulated by Tcdc. **J. Med. Microbiol.** V57. 685-689, 2008.

EICKHORST, AN; BERSON, A; COCKAYNE, D; LESTER, HA; KHAKH, BS. Control of P2X(2) channel permeability by the cytosolic domain. **J Gen Physiol.** v. 120, n.2, p.119-31. 2002

FANG, G; LIMA, AAM; THIELMAN, N; FONTELES, M; YOTSEFF, P; LYERLY, D; GUERRANT, RL. Role of phospholipase A2 in the histologic, epithelial and secretory responses to *Clostridium difficile* toxin A. **Biomedical J.**v. 1, p.1-5, 1994.

FAWLEY, WN; ET AL; Efficacy of Hospital Cleaning agents and germicides against epidemic *Clostridium difficile* strains. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.** V28, 920-925, 2007.

FEKETY, R. Guidelines for the diagnosis and management of *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis. **Am J Gastroenterol.**v.92, p.739-50. 1997

FENG, YH; WANG, L; WANG, Q; LI, X; ZENG, R; GORODESKI, GI. ATP stimulates GRK-3 phosphorylation and beta-arrestin-2-dependent internalization of P2X7 receptor. **Am J Physiol Cell Physiol.**v.288,n.6, p.C1342-56. 2005

FERRARI, D.; LOS, M.; BAUER, M. K.; VANDENABEELE, P.; WESSELBORG, S.; SCHULZE-OSTHOFF, K. P2Z purinoceptor ligation induces activation of caspases with distinct roles in apoptotic and necrotic alterations of cell death. **FEBS Lett.**, v. 447, p. 71-75. 1999.

FERREIRA, CEA; NAKANO, V; DURIGON, EL; AVILA-CAMPOS, MJ. Prevalence of *Clostridium* spp. and *Clostridium difficile* in Children with Acute Diarrhea in São Paulo City, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v.98, n.4, p. 451-454. 2003

FOSCHETTI, D.A., Toxina A e B do *Clostridium difficile* induzem a expressão diferencial de receptores de adenosina em células epiteliais intestinais: Papel do receptor A_{2B} .160f. tese. (Doutorado em Fisiologia e Farmacologia) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza -Ceará, 2014.

FUJIWARA, Y;;KUBO, Y. Density-dependent changes of the pore properties of the P2X2 receptor channel. **J Physiol.** v.1, n.558, p. 31-43. 2004

FULLER, SJ; STOKES, L; SKARRATT, KK; GU, BJ; WILEY, JS. Genetics of the P2X7 receptor and human disease. **Purinergic Signal.** V.5, n.2, p. 257-62. 2009.

FURNESS JB. The enteric nervous system. Blackwell publishing,Victoria. 2006

FURNESS, J. B.; JOHNSON, P. J.; POMPOLO, S.; BORNSTEIN, J. C. Evidence that enteric motility reflexes can be initiated through entirely intrinsic mechanisms in the guinea-pig small intestine. *Neurogastroenterol Motil.*, v. 7, p. 89-96, 1995.

FURNESS, J; COSTA, M. **Enteric Nervous System.** Churchil Livingstone. Edinburgh, London, Mellbourne, New York, 290p, 1987.

FURNESS, JB; ROBBINS, HL; SELMER, IS; HUNNE, B; CHEN, MX; HICKS, GA; MOORE, S; NEYLON, CB. Expression of intermediate conductance potassium channel immunoreactivity in neurons and epithelial cells of the rat gastrointestinal tract. **Cell Tissue Res.** v.314, n.2, p.179-89. 2003.

GENTH, H; DREGER, SC; HUELSENBECK, J; JUST I; *Clostridium difficile* toxin: More than mere inhibitors of Rho proteins. **The international journal of biochemistry & cell biology**, 40: 592-597. 2008

GERDING DN. *Clostridium difficile* 30 years on: what has or has not, changed and why? **International journal of antimicrobial agents**.33:52-58. 2009

GERIC, B; CARMAN, RJ; RUPNIK, M; GENHEIMER, CW; SAMBOL, SP; LYERLY, DM; GERDING, DN; JOHNSON, S. Binary toxin-producing, large clostridial toxin-negative *Clostridium difficile* strains are enterotoxic but do not cause disease in hamsters. **Journal of Infectious Diseases**, 193, 1143–1150. 2006

GERSHON, MD; KIRCHGESSNER, AL. Identification, characterization and projections of intrinsic primary afferent neurones of the submucosal plexus: Activity- induced expression of c-fos immunoreactivity. **J.Auton. Nerv. Syst.** v.33, p.185–187. 1991

GIROTTI, PA; MISAWA, R; PALOMBIT; K, MENDES, CE; BITTENCOURT, JC; CASTELUCCI, P. Differential effects of undernourishment on the differentiation and maturation of rat enteric neurons. **Cell Tissue Res**.v.353, p.367–380. 2013.

GLASER, T; OLIVEIRA, SB; CHEFFER, A; BECO, R; MARTINS, P; FORNAZARI, M; LAMEU, C; JÚNIOR, HMC; COUTINHO-SILVA, R; ULRICH, H. Modulation of Mouse Embryonic Stem Cell Proliferation and Neural Differentiation by the P2X7 Receptor. **PLoS ONE** v. 9, n.5, p. e96281. 2014

GONZÁLEZ-GARCÍA, N; GÓMEZ-PAVÓN, J; MARTÍNEZ-PORRAS, JL; Diagnóstico, tratamiento y control de la infección causada por *Clostridium difficile*. **Rev Esp Geriatr Gerontol**.40(5):310-9 2005

GREGGIO, FM; FONTES, RB; MAIFRINO, LB; CASTELUCCI, P; DE SOUZA, RR; LIBERTI, EA. Effects of perinatal protein deprivation and recovery on esophageal myenteric plexus. **World J Gastroenterol.** v.7, n.16(5), p.563-570. 2010.

GU, BJ; ZHANG, W; WERTHINGTON, RA; SLUYTER, R; DAO-UNG, P; PERROU, S; BARDEN, JA; WILEY, JS. A Glu-496 to Ala polymorphism leads to loss of function of the human P2X7 receptor. **J Biol Chem.** v. 276, p.11135-11142.2001.

GULBRANSEN, BD; BASHASHATI, M; HIROTA, SA; GUI, X; ROBERTS, JA; MACDONALD, JA; MURUVE, DA; MCKAY, DM; BECK, PL; MAWE, GM; THOMPSON, RJ; SHARKEY, KA. Activation of neuronal P2X7 receptor-pannexin-1 mediates death of enteric neurons during colitis. **Nat Med.** v.18, n.4, p.600–604. 2012.

GULBRANSEN, BD; SHARKEY, KA. Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol.** v.9, p.625–632. 2012.

HAFIZ, S; *Clostridium difficile* and its toxins [phD thesis]. Leeds: **Department of Microbiology, university of leeds**; 1974.

HALL, A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. **Science**.v.279, p. 509-14, 1998.

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

HÖKFELT, T; KELLERTH, JO; NILSSON, G; PERNOW, B. Experimental immunohistochemical studies on the localization and distribution of substance P in cat primary sensory neurons. **Brain Res**. v.100, n.2, p. 235-52. 1975

HÖKFELT, T; FRIED, G; HANSEN, S; JOHANSSON, O; LJUNGDAHL, A; LUNDBERG, JM; SCHULTZBERG, M. Nerve cells can have more than one signal substance: coexistence of classical transmitters and peptides. **Lakartidningen**. v.26, n.81(52), p.4933-9. 1984

HOLZER, P; LIVINGSTON, EH; SARIA, A; GUTH, PH. Sensory neurons mediate protective vasodilation in rat gastric mucosa. **Am. J. Physiol**. 260: G363–G370.1991

HU, HZ; GAO, N; LIN, Z; LIU, S; REN, J; XIA, Y; WOOD, JD. P2X7 receptors in the enteric nervous system of guinea-pig small intestine. **J Comp Neurol**. v.440, p.299–310. 2001.

HUANG, SW; WALKER, C; PENNOCK, J; ELSE, K; MULLER, W; DANIELS, MJD; PELLEGRINI, C; BROUGH, D; LOPEZ-CASTEJON, G; CRUICKSHANK, SM. P2X7 receptor-dependent tuning of gut epithelial responses to infection. **Immunology and Cell Biology**. p. 1-11.2016.

HUNDSBERGER, T; BRAUN, V; WEIDMANN, M; LEUKEL, P; SAUERBORN, M; VON EICHEL-STREIBER, C. Transcription analysis of the genes *tcdA-e* of the pathogenicity locus of *Clostridium difficile*. **Eur. J. Biochem**.v. 244, p.735–742. 1997.

IGLESIAS, R; LOCOVEI, S; ROQUE, A; ALBERTO, AP; DAHL, G; SPRAY, DC; SCMES, E. P2X7 receptor-Pannexin1 complex: pharmacology and signaling. **Am J Physiol Cell Physiol** v.295,n.3, p.C752-60. 2008.

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

JANK, T; GIESEMANN, T; AKTORIES, K; Rho-glucosylating *Clostridium difficile* Toxins A and B; New insights into structure and function. **Glycobiology**. V17, 15-22, 2007.

JUNQUEIRA, AFTA; DIAS, AAM; VALE, ML; SPILBORGHS, GMGT; BOSSA, AS; LIMA, BB; CARVALHO, AF; GUERRANT, RL; RIBEIRO, RA; BRITO, GA. Adenosine Deaminase Inhibition Prevents *Clostridium difficile* Toxin A-Induced Enteritis in Mice. **Infect. Immun**. v.79, n. 2, p.653-662, 2011.

JUST, I; WIL, M; SELZER, J; REX, G; VON EICHEL-STREIBER, C; MANN, M; AKTORIES, K; The enterotoxin from *Clostridium difficile* (ToxA) monoglucosylates the Rho proteins. **J Biol Chem.** 270(23):13932-6. 1995

KAHLENBERG, JM; DUBYAK, GR. Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7 receptor-mediated K⁺ release. **Am J Physiol Cell Physiol.**v.286, p. C1100–8. 2004

KEEL, K; BRAZIER, JS; POST, KW; WEESE, JS; SONGER, JG. Prevalence of PCR ribotypes among *Clostridium difficile* isolates from pigs, calves, and other species. **J ClinMicrobiol.** v.45. p.1963e4. 2007.

KELLY, CP; LAMONT, JT; *Clostridium difficile* infection. **Annu Rev Med.** 49: 375-390. 1998

KIM, H; RHEE, SH; POTHOUKAKIS, C; LAMONT, JT; Inflammation and apoptosis in *Clostridium difficile* enteritis is mediated by PGE₂-stimulation of FasL. **Gastroenterology**133:875-886. 2007

KLAPPERSTÜCK, M; BÜTTNER, C; SCHMALZING, G; MARKWARDT, F. Functional evidence of distinct ATP activation sites at the human P2X(7) receptor. **J Physiol.** v.534, p..25-35. 2001

KUEHNE, SA; CARTMAN, ST; HEAP, JT; KELLY, ML; COCKAYNE, A; MINTON, NP. The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection. **Nature.** v. 467, p. 711-713. 2010.

KUIJPER, EJ; BARBUT, F; BRAZIER, JS; KLEINKAUF, N; ECKMANNS, T; LAMBERT, ML; DRUDY, D; FITZPATRICK, F; WIUFF, C; BROWN, DJ; COIA, JE; PITUCH, H; REICHERT, P; EVEN, J; MOSSONG, J; WIDMER, AF; OLSEN, KE; ALLERBERGER, F; NOTERMANS, DW; DELMÉE, M; COIGNARD, B; WILCOX, M; PATEL, B; FREI, R; NAGY, E; BOUZA, E; MARIN, M; AKERLUND, T; VIROLAINEN-JULKUNEN, A; LYYTIKAINEN, O; KOTILA, S; INGEBRETSEN, A; SMYTH, B; ROONEY, P; POXTON, IR; MONNET, DL. Update of *Clostridium difficile* infection due to PCR ribotype 027 in Europe, 2008. **Euro Surveill.** v.13, pii: 18942. 2008.

KUIJPER, EJ; COIGNARD, B; TULLI, P. Emergence of *Clostridium difficile* associated disease in North America and Europe. **Clin. Microbiol, Infect.** V12 (Suppl. 6), 2-18, 2006.

KURASHIMA, Y; GOTO, Y; KIYONO, H. Mucosal innate immune cells regulate both gut homeostasis and intestinal inflammation. **Eur J Immunol.** v. 43, p. 3108–3115. 2013.

LAFFERTY, EI; QURESHI, ST; SCHNARE, M. The role of toll-like receptors in acute and chronic lung inflammation. **J. Inflamm.** v. 7, n. 57.2010.

LANIS, JM; BARUA, S; BALLARD, JD. Variations in TcdB activity and the hypervirulence of emerging strains of *Clostridium difficile*. **PLoS Pathog.** v.6, e1001061. 2010

LARSON, HE; PARRY, JV; PRICE, AB; DAVIES, DR; DOLBY, J; TIRELL, DA; Undescribed toxin in pseudomembranous colitis. **Br Med. J.** vol 1, 1246-1248, 1977.

LE STUNFF, H; AUGER, R; KANELLOPOULOS, J; RAYMOND, MN. The Pro-451 to Leu LEE, HY; BARDINI, M; BURNSTOCK, G. P2X receptor immunoreactivity in the male genital organs of the rat. **Cell Tissue Res.**v. 300, n.2, p. 321–330. 2000.

LEWIS, T. The Blood Vessels of the Human Skin and their Responses. Shaw & Sons Ltd, London. 1927

LESSA, FC; WINSTON, LG; MCDONALD, LC. Burden of *Clostridium difficile* infection in the United States. Emerging Infections Program *C. difficile* Surveillance. **TeamN Engl J Med.** v. 372, p.2369-70. 2015.

LI, Q; LUO, X; ZENG, W; MUALLEM, S. Cell-specific Behavior of P2X7 Receptors in Mouse Parotid Acinar and Duct Cells. **J. Biol. Chem.** v.278, p. 47554-47561. 2003.

LIMA, AA; INNES, DJJR; CHADEE, K; LYERLY, DM; WILKINS, TD; GUERRANT, RL. *Clostridium difficile* toxin A interactions with mucus and early sequential histopathologic effects in rabbit small intestine. **Lab Invest.** v. 61, n.4, p.419-25, 1989.

LIMA, BB; FONSECA, BF; AMADO, NG, LIMA,DM; RIBEIRO, RA; BRITO, GAC. *Clostridium difficile* Toxin A Attenuates Wnt/_-Catenin Signaling in Intestinal Epithelial Cells. **Infection and Immunity.** v,28, n.7; p. 2680–2687 .2014

LIU, S; SHI, Q; ZHU, Q; ZOU, T; LI, G; HUANG, A; PENG, L; SONG, M; WU, Q; XIE, Q; LIN, W; XIE, W; WEN, S; ZHANG, Z; LY, Q; ZOU, L; ZHANG, X; YING, M; LI, G; LIANG, S. P2X7 receptor of rat dorsal root ganglia is involved in the effect of moxibustion on visceral hyperalgesia. **Purinergic Signalling.** v.11, p.161-169. 2015.

LOHMAN, AW; LESKOV, IL; BUTCHER, JT; JOHNSTONE, SR; STOKES, TA; BEGANDT, D; DELALIO, LJ; BEST, AK; PENUELA, S; LEITINGER, N; RAVICHANDRAN, KS; STOKES, KY; ISAKSON, BE. Pannexin 1 channels regulate leukocyte emigration through the venous endothelium during acute inflammation. **Nat Commun.**v.5, n.6, p.7965. 2015.

LOO VG, POIRIER L, MILLER MA, OUGHTON M, LIBMAN MD, MICHAUD S, BOURGAULT AM, NGUYEN T, FRENETTE C, KELLY M, VIBIEN A, BRASSARD P, FENN S, DEWAR K, HUDSON TJ, HORN R, RENÉ P, MONCZAK Y, DASCAL A. A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. **N Engl J Med.**353(23):2442-9. 2005

LYERLY, DM; BALL, DW; TOTH, J; WILKINS, TD. Characterization of crossreactive proteins detected by Culturette Brand Rapid Latex Test for *Clostridium difficile*. **J Clin Microbiol.** v. 26, n. 3, p. 397-400, 1988.

LYRAS, D; O'CONNOR, JR; HOWARTH, PM; SAMBOL, SP; CARTER, GP; PHUMOONNA, T; POON, R; ADAMS, V; VEDANTAM, G; JOHNSON, S; GERDING, DN; ROOD JI. Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. **Nature**. v458, 1176-1179, 2009.

MACIEL, AAFL; ORIÁ, RB; BRAGA-NETO, MB; BRAGA, AB; CARVALHO, EB; LUCENA, HBM; BRITO, GAC; GUERRANT, RL; LIMA, AAM; Role of retinol in protecting epithelial cell damage induced by *Clostridium difficile* toxin A. **Toxicon**. 50: 1027-1040. 2007

MANI, N; DUPUY, B. Regulation of toxin synthesis in *Clostridium difficile* by an alternative RNA polymerase sigma factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v.98, p.5844–5849. 2001

MANTYH, CR; McVEY, DC; VIGNA, SR. Extrinsic surgical denervation inhibits *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis in rats. **Neuroscience Letters**. v.292, p.95-98. 2000.

MARQUES, CC; CASTELO-BRANCO, MT; PACHECO, RG; BUONGUSTO, F; ROSARIO, AJ; SCHANAIDER, A; COUTINHO-SILVA, RD; SOUZA, HP. Prophylactic systemic P2X7 receptor blockade prevents experimental colitis. **Biochim. Biophys. Acta**. v.1842, p.65–78. 2014.

MARTIN-VERSTRAETE, I; PELTIER, J; DUPUY, B. The regulatory networks that control *Clostridium difficile* toxin synthesis. **Toxins**. v.8, n.153, p.1-24. 2016.

MATAMOUROS, S; ENGLAND, P; DUPUY, B. *Clostridium difficile* toxin expression is inhibited by the novel regulator TcdC. **Mol Microbiol**. v. 64, p.1274-88. 2007

MCCULLOCH, CA; DOWNEY, GP; EL-GABALAWY, H. Signalling platforms that modulate the inflammatory response: new targets for drug development. **Nat Rev Drug Discov**. v.5 n.10, p.864-76. 2006.

MCKAY, DM; FAIRWEATHER, I. A role for the enteric nervous system in the response to helminth infections. **Parasitol Today**. v.13, n.2, p.63-69. 1997

MEDEIROS, CA; WARREN, CA; FREIRE, R; VIEIRA, CA; LIMA, BB; VALE, ML; RIBEIRO, RA; SOUZA, MH; BRITO, GA. Role of the haem oxygenase/carbon monoxide pathway in *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis in mice. **Journal of medical microbiology**. v. 60, p. 1146-1154, 2011.

MERRIGAN, MM; GERDING, DN; VEDANTAM, G. Hypervirulent *Clostridium difficile* strains have altered protein expression and host-cell adherence; in Eighth Biennial Conference of the Anaerobe Society of America. Pi-12, **Boise, Idaho**, 2006.

METHA, N. *et al.* Purinergic receptor P2X7: A novel target for anti-inflammatory therapy. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 22, p.54–88. 2014.

MOLLER, B.; VILLIGER, P. M. Inhibition of IL-1, IL-6, and TNF-alpha in immune-mediated inflammatory diseases. **Springer Semin Immunopathol**. v.27, n.4, p.391-408. 2006.

MONIF, M; REID, CA; POWELL, KL; DRUMMOND, KJ; O'BRIEN, TJ; WILLIAMS, DA. Interleukin -1 β has trophic effects in microglia and its release is mediated by P2X7R pore. **Journal of Neuroinflammation**. v.13, n.173, p.1-15. 2016.

MUTO, CA; POKRIWKA, M; SHUTT, K; MENDELSON, AB; NOURI, K; POSEY, K; ROBERTS, T; CROYLE, K; KRISTOFIAK, S; PATEL-BROWNS, S; PASCULLE, AW; PANTERSON, DL; SAUL, M; HARRISON, LH; A large outbreak of *Clostridium difficile*-associated disease with an unexpected proportion of deaths and colectomies at a teaching hospital following increased fluoroquinolone use. **Infect Control Hosp Epidemiol**. v.26, n.3, p.273-280.2005

NA, X; KIM, H; MOYER, MP; POHOULAKIS, C; LAMONT, TJ; Gp96 is a human colonocyte plasma membrane binding protein for *Clostridium difficile* toxin A. **Infect.Immune**. v.76, p.2862-2871, 2008.

NASCIMENTO, SB; SOUSA, RB; MARTINS, MJB; GOMES, AS; SOUZA, MHL; GUERRANT, RL; CUNHA, FQ; RIBEIRO, RA; BRITO, GAC. Glutamine depletion potentiates leucocyte-dependent inflammatory events induced by carrageenan or *Clostridium difficile* toxin A in rats. **Immunology**. v. 116, p. 328-336, 2005.

NEUNLIST, M; ROLLI-DERKINDEREN, M; LATORRE, R; LANDEGHEM, LV; CORON, E; DERKINDEREN, P; GIORGIO, RD. Enteric Glial Cells: Recent Developments and Future Directions. **Gastroenterology**.v.147, p.1230–1237. 2014.

NEVES, AR; CASTELO-BRANCO, MT; FIGLIUOLO, VR; BERNARDAZZI, C; BUONGUSTO, F; YOSHIMOTO, A. et al. Over expression of ATP- activated P2X7 receptor in the intestinal mucosa is implicated in the pathogenesis of Crohn's disease. **Inflamm.Bowel Dis**. v.20, p.444–457.2014.

NICKE, A; KUAN, YH; MASIN, M; RETTINGER, J; MARQUEZ-KLAKA, B; BENDER, O; GÓRECKI, DC; MURRELL-LAGNADO, RD; SOTO, F. A functional P2X7 splice variant with an alternative transmembrane domain 1 escapes gene inactivation in P2X7 knock-out mice. **J Biol Chem**. v. 284, p.25813–25822. 2009.

NORTH, R A. Molecular Physiology of P2X Receptors **Physiol. Rev**.v.82, n.4, p. 1013-1067 2002

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

OLLING, A; GOY, S; HOFFMANN, F; TATGE, H; JUST, I; GERHARD, R. The repetitive oligopeptide sequences modulate cytopathic potency but are not crucial for cellular uptake of *Clostridium difficile* toxin A. **PLoS ONE**. v.6, e17623. 2011

O'REILLY, BA; KOSAKA, AH; CHANG, TK; FORD, AP; POPERT, R; RYMER, JM; MCMAHON, SB. A quantitative analysis of purinoceptor expression in human fetal and adult bladders. **J Urol.** v.165, p.1730-4. 2001.

PALOMBIT, K; MENDES, CE; TAVARES-DE-LIMA, W; SILVEIRA, MP; CASTELUCCI, P. Effects of ischemia and reperfusion on subpopulations of rat enteric neurons expressing the P2X7 receptor. **Dig Dis Sci.** v.58, p.3429–3439. 2013.

PALOMBIT, K. Papel do antagonista Brilliant Blue G sobre os neurônios mioentéricos imunorreativos ao receptor P2X7 do íleo de ratos submetidos à isquemia/ reperfusão intestinal. 128 f. tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo- São Paulo, 2015.

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

PLANCHE, T.; WILCOX, M.H. Diagnostic pitfalls in *Clostridium difficile* infection. **Infect. Dis. Clin. North Am.** v. 29, p. 63–82. 2015.

PELEGRIN, P; BARROSO-GUTIERREZ, C, SURPRENANT, A. P2X7 receptor differentially couples to distinct release pathways for IL-1beta in mouse macrophage. **J Immunol.** v.180, p.7147–57, 2008.

PELEGRIN, P; SURPRENANT, A. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. **EMBO J.** v.25, n.21, p.5071-82. 2006
PÉPIN J, VALIQUETTE L, ALARY ME, VILLEMURE P, PELLETIER A, FORGET K, PÉPIN K, CHOUINARD D. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. **CMAJ.** 31;171(5):466-472. 2004

PHILLIPS, RJ; KIEFFER, EJ; POWLEY, TL. Aging of the myenteric plexus: neuronal loss is specific to cholinergic neurons. **Auton Neurosci.** v.106, p.69–83. 2003.

PINTO, LJF; ALCIDES, APP; FERREIRA, EO; AVELAR, KES; SABRÁ, A; DOMINGUES, RMCP; FERREIRA, MCS; Incidence and importance of *Clostridium difficile* in paediatric diarrhoea in Brazil. **Journal of Medical Microbiology** . v.52, p.1095–1099. 2003

POOLE, DP; CASTELUCCI, P; ROBBINS, HL; CHIOCCHETTI, R; FURNESS, JB. The distribution of P2X3 purine receptor subunits in the guinea pig enteric nervous system. **Auton Neurosci.** v.101, p.39-47. 2002.

POTHOULAKIS, C; Effects of *Clostridium difficile* toxins on epithelial cell barrier. **Ann. NY Acad. Sci.** v915, 347-357, 2000.

QA'DAN, M; SPYRES, LM; BALLARD, JD. pH – induced conformational changes in *Clostridium difficile* toxin B. **Infect Immun.** 68: 2470-2474. 2000

RASSENDREN, F; BUELL, GN; VIRGINIO, C; COLLO, G; NORTH, RA; SURPRENANT, A. The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA. **J Biol Chem.** v.272, p.5482–6. 1997.

RIEGLER M, SEDIVY R, POTHOUKAKIS C, HAMILTON G, ZACHERL J, BISCHOF G, COSENTINI E, FEIL W, SCHIESSEL R, LAMONT JT. *Clostridium difficile* toxin B is more potent than toxin A in damaging human colonic epithelium in vitro. **J Clin Invest.** 5:2004-2011. 1995

ROBERTS, JA; LUKEWICH, MK; SHARKEY, KA; FURNESS, JB; MAWE, GM; LOMAX, AE. The roles of purinergic signaling during gastrointestinal inflammation. **Current Opinion in Pharmacology.** v.12, p.659–666. 2012.

RODRIGUES, RJ; TOMÉ, AR; CUNHA, RA. ATP as a multi-target danger signal in the brain. **Front Neurosci.** v. 28, n.9, p.148. 2015.

RÜHL A. Glial cells in the gut. **Neurogastroenterol Motil.** v.17, p.777–790. 2005.

RUPNIK, M; JANEZIC, S. An Update on *Clostridium difficile* Toxinotyping. **J Clin Microbiol.** v.54, p.13–18. 2016

RUPNIK, M; JUST, I; The comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxin 15^d edn (eds Alouf, JA; POPOFF, MR;) **Academic Press, Burlington, Massachusetts, USA,** v20, 409-429, 2006.

RUPNIK, M. Is *Clostridium difficile*-associated infection a potentially zoonotic and foodborne disease? **Clin Microbiol Infect.** v.13.n.5. p.457–459. 2007

RUPNIK, M; WILCOX, MH; GERDING, DN; *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. **Nature,** v7, 526-536, jul, 2009.

SANTER, RM, BAKER, DM. Enteric neuron numbers and sizes in Auerbach's plexus in the small and large intestine of adult and aged rats. **J Auton Nerv Syst.** v.25, n.1, p.59-67. 1988.

SANTER, RM. Survival of the population of NADPH-diaphorase stained myenteric neurons in the small intestine of aged rats. **J Auton Nerv Syst.** v.49, n.2, p.115-121. 1994.

SANTOS, AA; BRAGA-NETO, MB; OLIVEIRA, MR; FREIRE, RS; BARROS, EB; SANTIAGO, TM; REBELO, LM; MERMELSTEIN, C; WARREN, CA; GUERRANT, RL; BRITO, GA. Glutamine and alanyl-glutamine increase RhoA expression and reduce *Clostridium difficile* toxin-a-induced intestinal epithelial cell damage. **Biomed Res Int.** v. 2013, artigo id.152052. 2013.

SAVIDGE, TC; NEWMAN, P; POTHOUKAKIS, C; et al. Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. **Gastroenterology.** v.132, p.1344–1358. 2007.

SAXTON, K; BAINES, SD; FREEMAN, J; O'CONNOR, R; WILCOX, MH; Effects of exposure of *Clostridium difficile* PCR ribotypes 027 and 001 to fluoroquinolones in a human gut model. **Antimicrob. Agents Chemother.** V53, 412-420. 2009.

SAYEGH, AI; RITTER, RC. Cholecystokinin activates specific enteric neurons in the rat small intestine. **Peptides.** v.24, n.2, p.237-44. 2003.

SEMENYUK, E. G. *et al.* Analysis of bacterial communities during *C. difficile* infection in the mouse. **Infect. Immun.** v.83, p. 4383–4391.2015.

SHARKEY, KA. Emerging roles for enteric glia in gastrointestinal disorders. **J Clin Invest.** v.125, n.3, p. 918–925. 2015

SHARKEY, KA; MAWE, GM. Neuroimmune and epithelial interactions in intestinal inflammation. **Curr Opin Pharmacol.** v.2, n.6, p.669-77. 2002

SILVA, MV; MAROSTI, AR; MENDES, CE; PALOMBIT, K; CASTELUCCI, P. Differential effects of experimental ulcerative colitis on P2X7 receptor expression. In enteric neurons. **Histochem Cell Biol.** v.143, p.171–184. 2015.

SLATER, N. M.; BARDEN, J. A.; MURPHY, C. R. Distributional changes of purinergic receptor subtypes (P2X 1-7) in uterine epithelial cells during early pregnancy. **Histochem. J.** 2000, 32, 365. **Histochem J.** v.32, n.6, p.365-72. 2000.

SLUYTER, R; SHEMON, AN; WILLEY, JS. Glu496 to Ala polymorphism in the P2X7 receptor impairs ATP-induced IL-1 beta release from human monocytes. **J Immunol.** v. 172, p. 3399-3405. 2004.

SMART, ML; PANCHAL, RG; BOWSER, DN; WILLIAMS, DA; PETROU, S. Pore formation is not associated with macroscopic redistribution of P2X7 receptors. **Am J Physiol Cell Physiol.** v.283, n.1, p.C77-84. 2002

SMITS, WK. Hype or hypervirulence: a reflection on problematic *C. difficile* strains. **Virulence.** v.4, p. 592–596. 2013.

SMITS, WK; LYRAS, D; LACY, DB; WILCOX, MH; KUJIPER, EJ. *Clostridium difficile* infection. **Nature reviews.** v.2, p.1-20.2016.

SOARES-BEZERRA, RJ; PINHO, RT; BISAGGIO, RC; BENÉVOLO-DE-ANDRADE, TC; ALVES, LA. The Search for New Agonists to P2X7R for Clinical Use: Tuberculosis as a Possible Target. **Cell Physiol Biochem.** v.37, n.2, p.409-18. 2015.

SOLINI, A; CHIOZZI, P; FALZONI, S; MORELLI, A; FELLIN, R; DI VIRGILIO, F.. High glucose modulates P2X7 receptor-mediated function in human primary fibroblasts. **Diabetologia.** v.43, n.10, p.1248-56. 2000.

SOLLE M, LABASI J, PERREGAUX DG, STAM E, PETRUSHOVA N, KOLLER BH, GRIFFITHS RJ, GABEL CA. Altered cytokine production in mice lacking P2X (7) receptors. **J Biol Chem.** v.276, p.125–32. 2001.

SONGER, JG; TRINH, HT; KILLGORE, GE; THOMPSON, AD; MCDONALD, LC; LIMBAGO, BM. *Clostridium difficile* in retail meat products, USA 2007. **Emerg Infect Dis.** v.15, p.819-21. 2009

SOUZA, DG; CASSALI, GD; POOLE, S; TEIXEIRA, MM. Effects of inhibition of PDE4 and TNF-alpha on local and remote injuries following ischaemia and reperfusion injury. **Br. J. Pharmacol.** v. 134, n. 5, p. 985-994. 2001

.SOUZA CO, SANTORO GF, FIGLIUOLO VR, NANINI HF, DE SOUZA HS, CASTELOBRANCO MT, ABALO AA, PAIVA MM, COUTINHO CM, COUTINHO-SILVA R. Extracellular ATP induces cell death in human intestinal epithelial cells. **Biochim Biophys Acta.** v.1820, p. 1867-78. 2012

.SURPRENANT, A; RASSENDREN, F; KAWASHIMA, E; NORTH, RA; BUELL, G. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). **Science.** v.272, p.735–8. 1996.

SURPRENANT, A; NORTH, RA. Signaling at purinergic P2X receptors. **Annu Rev Physiol.** v.71, p.333-59. 2009.

.TAN, KS; WEE, BY; SONG, KP. Evidence for holin function of *tcdE* gene in the pathogenicity of *Clostridium difficile*. **J Med Microbiol.**, v. 50, p. 613–619, 2001.

TASSELL, W; SLATER, NM; BARDEN, JA; MURPHY, CR. Endometrial cell death during early pregnancy in the rat. **Histochem J.**v.32, n.6, p.373-9. 2000

THELESTAM, M; CHAVES-OLARTE, E; Cytotoxic effect of the *Clostridium difficile* toxins. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** V250, 85-96, 2000.

VENUGOPAL, A. A.; JOHNSON, S. Fidaxomicin: a novel macrocyclic antibiotic approved for treatment of *Clostridium difficile* infection. **Clin. Infect. Dis.** v.54, p.568–574. 2012.

VENTURA-MARTINEZ, R; SANTIAGO-MEJIA, J; GOMEZ, C; RODRIGUEZ, R; FORTOUL, TI. Acute morphological changes in guinea-pig ileum myenteric neurons after ischemia in situ with superfusion in vitro. **Pathol Res Pract.**v. 204, n.2, p.121-127. 2008.

VERAS, C.M.T., **Papel da via de sinalização de TGF-β1 na resposta de células epiteliais e da mucosa intestinal à toxina A do *Clostridium difficile*.** 96 f. tese (DINTER em Ciências Morfológicas- UFC/UFRJ) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Teresina- Piauí, 2015.

VIRGINIO, C; MACKENZIE, A; NORTH, RA; SURPRENANT, A. Kinetics of cell lysis, dye uptake and permeability changes in cells expressing the rat P2X7 receptor. **J Physiol.**v.519, n.2, p.335–46. 1999

VISWANATHAN, VK; MALLOZZI, MJ; VENDANTAM, G. *Clostridium difficile* infection: An overview of the disease and its pathogenesis, epidemiology and interventions. **Gut Microbes.** v.4, p. 234-242. 2010.

VOLONTÉ, C; APOLLONI, S; SKAPER, SD; BURNSTOCK, G. P2X7 receptors: channels, pores and more. **CNS Neurol Disord Drug Targets.** v.11, p.705–721. 2012.

VON BOYEN, GB; SCHULTE, N; PFLÜGER, C; SPANIOL, U; HARTMANN, C; STEINKAMP, M. Distribution of enteric glia and GDNF during gut inflammation. **BMC Gastroenterol.**v.11, n.3. p.1-8. 2011.

WEI, L; SHENG, H; CHEN, L; HAO, B; SHI, X; CHEN, Y. Effect of pannexin-1 on the release of glutamate and cytokines in astrocytes. **J Clin Neurosci.** v.23, p.135-41. 2016.

WOEHRLE, T; YIP, L; ELKHAL, A; SUMI, Y; CHEN, Y; YAO, Y; INSEL, PA; JUNGER, WG. Pannexin-1 hemichannel-mediated ATP release together with P2X1 and P2X4 receptors regulate T-cell activation at the immune synapse. **Blood.** v. 4, n.116(18), p.3475-84. 2010.

WORTHINGTON, RA; SMART, ML; GU, BJ; WILLIAMS, DA; PETROU, S; WILEY, JS; BARDEN, JA Point mutations confer loss of ATP-induced human P2X₇ receptor function. **FEBS Lett.** v.512, p.43–46. 2002.

WRIGHT, A; WAIT, R; BEGUM, S; CADSSETT, B; NAGY, J; BROWN, K; FAINWEATHER, N. Proteomic analysis of cell surface proteins from *Clostridium difficile*. **Proteomics**5. 2443-2432, 2005.

YENARI, MA; KAUPINEN, TM; SWANSON, RA. Microglial activation in stroke: therapeutic targets. **Neurotherapeutics.**v.7, p.378–391. 2010.

YUAN, P; ZHANG, H; CAI, C; ZHU, S; ZHOU, Y; YANG, X; HE, R; LI, C; GUO, S; LI, S; et al. Chondroitin sulfate proteoglycan 4 functions as the cellular receptor for *Clostridium difficile* toxin B. **Cell Res.** v.25, p.157–168.2015.