



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS**

CONCEIÇÃO DA SILVA MARTINS

**ALTERAÇÕES INDUZIDAS PELA TOXINA A DO *Clostridium difficile* NA VIA
WNT/ β -CATENINA *IN VIVO* E PAPEL DO RAC-1 NA SUA INIBIÇÃO EM
CÉLULAS EPITELIAIS INTESTINAIS**

**FORTALEZA
2018**

CONCEIÇÃO DA SILVA MARTINS

**ALTERAÇÕES INDUZIDAS PELA TOXINA A DO *Clostridium difficile* NA VIA
WNT/ β -CATENINA *IN VIVO* E PAPEL DO RAC-1 NA SUA INIBIÇÃO EM
CÉLULAS EPITELIAIS INTESTINAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Morfofuncionais. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais.
Orientadora: Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito e Co-orientador José Garcia Ribeiro Abreu Júnior.

**FORTALEZA
2018**

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)

- M1a MARTINS, CONCEIÇÃO DA SILVA.
ALTERAÇÕES INDUZIDAS PELA TOXINA A DO *Clostridium difficile* NA VIA WNT/B-CATENINA IN VIVO E PAPEL DO RAC-1 NA SUA INIBIÇÃO EM CÉLULAS EPITELIAIS INTESTINAIS / CONCEIÇÃO DA SILVA MARTINS. – 2018.
109 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2018.
Orientação: Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito.
Coorientação: Profa. Dra. José Garcia Ribeiro Abreu Júnior.
1. *Clostridium difficile*. . 2. Rac1.. 3. Wnt.. 4. B-catenina.. 5. Intestino. I. Título.

CDD 611

CONCEIÇÃO DA SILVA MARTINS

**ALTERAÇÕES INDUZIDAS PELA TOXINA A DO *Clostridium difficile* NA VIA
WNT/ β -CATENINA *IN VIVO* E PAPEL DO RAC-1 NA SUA INIBIÇÃO EM
CÉLULAS EPITELIAIS INTESTINAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Morfofuncionais. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais.
Orientadora: Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito e Co-orientador José Garcia Ribeiro Abreu Júnior.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Mirna Marques Bezerra Brayner
Universidade Federal do Ceará (UFC) SOBRAL

Prof. Dra. Danielle Abreu Foschetti
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

Prof. Dra. Renata de Carvalho Leitão
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e por me conceder esta realização.

À meu esposo Marlylton de Carvalho Rebouças, pela paciência e amor.

Aos meus pais José Viana e Dos Anjos Martins pelo amor e por tudo que eu sou.

À Professora Dra. Gerly Anne de Castro Brito, pela excelente orientação desde a ideia do trabalho à finalização do mesmo, por ter aberto a porta de seu laboratório e aceitado sem nenhum preconceito uma aluna que nunca tinha conhecimento em pesquisa. Por ter me criado, ensinando-me desde a leitura de artigos a busca de ideias. Agradeço ainda por ter sido agraciada com uma orientadora que é um exemplo de pesquisadora, de professora e de mãe. Agradecerei sempre e direi a quem perguntar que é a responsável pelo que sou hoje.

À Professora Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão, por sua amizade, carinho e seus conselhos contribuições valiosas para o desenvolvimento desse trabalho e por sempre reservar parte de seu tempo para compartilhar seus valiosos conhecimentos. Pelo exemplo de pesquisadora, professora e amiga.

Ao Prof. Dr. José Garcia de Abreu Junior, por ter aberto as portas de seu laboratório para que eu pudesse conhecer outras formas de desenvolver pesquisa, pelo incentivo nessa caminhada.

À minha amiga Doutoranda Deisiane Viana por ter me ajudado, apoiado ao longo dessa caminhada. Além de sua contribuição com os experimentos e de sua amizade que foi fundamental.

À aluna de iniciação científica Angeline Maria Pascoal, Guilherme, Mateus, Leticia por ter me ajudado em todas as etapas deste trabalho.

As amigas da pós-graduação Dainesy, Fátima, Mariana, Gildênio, Alceu, Rodolfo, Vanessa, Luciane, Ketyma, Lauro, Dvison, Cecília, pela amizade e ajuda nos experimentos.

Àos técnicos do laboratório Nempi Flávia, Junior, Socorro, pela contribuição neste trabalho e pela amizade.

Àos professores da Morfologia em especial Dra. Virginia Girão, Dra. Antonielli Gomes, Dra. Paula Goes.

Muito obrigada!

“Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso ou pessoas fracassadas. O que existem são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles.”

Augusto Cury

RESUMO

Alterações induzidas pela toxina A do *Clostridium difficile* na via Wnt/ β -catenina *in vivo* e papel do RAC-1 na inibição dessa via em cultura de células epiteliais

O *Clostridium difficile*, agente causador de diarreia e colite, produz toxina A (TcdA) e B, duas potentes enterotoxinas. Ambas as toxinas reduzem a proliferação e apoptose em células epiteliais intestinais. A via Wnt/ β -catenina quando ativada estimula a proliferação e diferenciação de células epiteliais. *In vitro*, foi demonstrado que TcdA do *Clostridium difficile* inibe a via Wnt/ β -catenina, mesmo na presença de agonistas da via. TcdA, assim como a toxina B, inativam Rho GTPases, inclusive Rac1. Rac1 tem importante função na translocação de β -catenina para o núcleo, que por sua vez estimula a transcrição de genes envolvidos na proliferação celular. Portanto, o objetivo desse trabalho foi estudar as alterações induzidas pela TcdA do *Clostridium difficile* na via Wnt/ β -catenina em camundongos e investigar o papel de Rac-1 na atividade inibitória dessa toxina na via Wnt/ β -catenina *in vitro*. Injetou-se TcdA do *Clostridium difficile* (10 ou 50 μ g/alça) ou PBS (200 μ l; controle) na alça ileal de camundongos C57BL/6 e Swiss. Os animais foram eutanasiados sob anestesia 4 h depois e segmentos do íleo foram coletados para realizar a análise histopatológica e avaliar os componentes da via Wnt/ β -catenina por imunohistoquímica (β -catenina e Wnt 3a ciclina D1), Western Blotting (β -catenina) e RT-qPCR (LGR5, cMYC, ciclina D1 e Wnt-3a, Rac1), proliferação celular (imunohistoquímica para Ki67 e ciclina D1) e expressão de Rac1 por RT-qPCR. Células epiteliais intestinais de rato (IEC-6) foram transfectadas com **pcDNA3-EGFP-Rac1-Q61L** ou pcDNA3 e incubadas com TcdA (50 ng/mL) na presença ou ausência de meio condicionado com Wnt-3a. Após 24h de incubação, avaliou-se a ativação da via Wnt/ β -catenina (por meio do ensaio TOP/FOPflash luciferase), a translocação nuclear β -catenina por imunofluorescência e proliferação celular (imunocitoquímica para Ki67). *In vivo*, a TcdA do *Clostridium difficile* induziu acentuada destruição das vilosidades intestinais e intenso infiltrado de células inflamatórias no íleo de ambas as espécies. No íleo de camundongos Swiss, a TcdA do *Clostridium difficile* aumentou a expressão proteica de β -catenina e reduziu a expressão gênica de ciclina D1, enquanto que nos camundongos C57BL/6 reduziu a expressão gênica de β -catenina e cMYC, além de aumento da imunomarcagem e expressão gênica de Wnt-3a e LGR5. Em adição, TcdA diminuiu a proliferação celular nas criptas intestinais e não alterou a expressão de Rac1 no íleo de ambas as espécies. Em células epiteliais intestinais (IEC-6), TcdA diminuiu a ativação da via Wnt/ β -catenina pelo agonista da via (Wnt-3a), reduziu a translocação de β -catenina para o núcleo e diminuiu a proliferação. Enquanto que a transfecção de IEC-6 com pcDNA3-EGFP-Rac1-Q61L reverteu os efeitos da TcdA do *Clostridium difficile* na presença de Wnt-3a. Concluímos que TcdA do *Clostridium difficile* inibe a via Wnt/ β -catenina em camundongos Swiss e C57BL/6, apesar do nível aumentando de agonista endógeno da via, sendo que os principais genes alterados foram os envolvidos na proliferação celular. Adicionalmente, os resultados *in vitro* mostram um importante papel da inativação de Rac1 pela TcdA do *Clostridium difficile* na inibição da via Wnt/ β -catenina por essa toxina.

Palavras-chave: *Clostridium difficile*. Rac1. Wnt. β -catenina. Intestino.

SUMMARY

***Clostridium difficile* toxin A-induced changes in the Wnt / β -catenin pathway in vivo and role of RAC-1 in inhibiting this pathway in epithelial cell culture**

Clostridium difficile, an agent that causes diarrhea and colitis, produces toxin A (TcdA) and B, two potent enterotoxins. Both toxins reduce proliferation and apoptosis in intestinal epithelial cells. The Wnt- β -catenin pathway, when activated, stimulates the proliferation and differentiation of epithelial cells. *In vitro*, *Clostridium difficile* TcdA has been shown to inhibit the Wnt/ β -catenin pathway, even in the presence of pathway agonists. TcdA, as well as toxin B, inactivate Rho GTPases, including Rac1. Rac1 has an important role in the translocation of β -catenin to the nucleus, which stimulates the transcription of genes involved in cell proliferation. Therefore, the objective of this study was to evaluate the changes induced by the *Clostridium difficile* TcdA in the Wnt/ β -catenin pathway in mice and to investigate the role of Rac1 in the inhibitory activity of this toxin in the Wnt/ β -catenin pathway *in vitro*. TcdA of *Clostridium difficile* (10 or 50 μ g/loop) or PBS (200 μ l; control) were injected on the ileal loop of C57BL/6 and Swiss mice. The animals were euthanized under anesthesia 4h later and segments of the ileum were collected to perform the histopathological analysis and to evaluate the components of the Wnt / β -catenin pathway by immunohistochemistry (β -catenin and Wnt-3a and cyclin D1), Western Blotting (β -catenin) and RT-qPCR (LGR5, cMYC, cyclin D1 and Wnt-3a), cell proliferation (by immunohistochemistry for Ki67 and cyclin D1) and Rac1 expression by RT-qPCR. Mouse intestinal epithelial cells (IEC-6) were transfected with pcDNA3-EGFP-Rac1-Q61L or pcDNA3 and incubated with TcdA (50 ng/ml) in the presence or absence of Wnt-3a conditioned medium. After 24h incubation, the activation of the Wnt/ β -catenin pathway (through the TOP/FOPflash luciferase assay), nuclear β -catenin translocation by immunofluorescence and cell proliferation (immunocytochemistry for Ki67) were evaluated. *In vivo*, TcdA of *C. diff* induced marked destruction of intestinal villi and intense inflammatory cell infiltration in the ileum tissue of both species. In the ileum of Swiss mice, the TcdA of *Clostridium difficile* increased the protein expression of β -catenin and reduced the gene expression of cyclin D1, while in the C57BL/6 mice, this toxin reduced β -catenin and cMYC gene expression, as well as increased gene expression of Wnt-3a and LGR5. In addition, TcdA decreased cell proliferation in the intestinal crypts and did not alter the expression of Rac1 in the ileum of both species. In intestinal epithelial cells (IEC-6), TcdA decreased the activation of the Wnt- β -catenin pathway by the pathway agonist (Wnt-3a), reduced β -catenin translocation to the nucleus and decreased proliferation, while transfection of IEC-6 with pcDNA3-EGFP-Rac1-Q61L reversed the TcdA of *Clostridium difficile* effects in the presence of Wnt-3a. We conclude that TcdA of *Clostridium difficile* inhibits the Wnt/ β -catenin pathway in Swiss and C57BL/6 mice, despite the increasing level of endogenous agonist of the pathway, with the main altered genes being those involved in cell proliferation. In addition, the *in vitro* results show an important role of Rac1 inactivation by TcdA of *Clostridium difficile* in the Wnt/ β -catenin pathway inhibition.

Key words: *Clostridium difficile*. Rac1. Wnt / β -catenin. Intestin.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Incidência da infecção por <i>Clostridium difficile</i> em pacientes hospitalizados no Brasil (2000-2014).....	21
Quadro 2 – Sequência de oligonucleotídeos dos Primers usados no ensaio de Qpcr.....	48
Quadro 3 – Número total de células por experimento	53

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Imagens de <i>Clostridium difficile</i> e pseudomembranas formadas pela infecção.....	18
Figura 2: Representação esquemática do locus de patogenicidade (Paloc).	26
Figura 3: Relação estrutura-função das toxinas do <i>Clostridium difficile</i>	27
Figura 4: Mecanismo de internalização e ação das toxinas do <i>Clostridium difficile</i> ..	29
Figura 5: Funções da Rho GTPases.	30
Figura 6: Via de Wnt/ β -catenina e sua relação com as Rho GTPases.....	34
Figura 7: Via Wnt/ β -catenina e seus reguladores.....	37
Figura 8: Manutenção da barreira epitelial intestinal pela sinalização Wnt.	39
Figura 9: Modelo de ileíte induzida pela toxina A do <i>Clostridium difficile</i> em camundongos.....	43
Figura 10: Plasmídeo de Rac1 mutante constitutivamente ativo (pcDNA3-EGFP-Rac1-Q61L).....	51
Figura 11: Ensaio de TOPFlash/FOPFlash.	54
Figura 12: Alterações histológicas no íleo de camundongos submetidos à enterite induzida pela Toxina A do <i>Clostridium difficile</i>	57
Figura 13: Efeito da toxina A do <i>Clostridium difficile</i> na imunomarcação e expressão gênica de β -catenina no óleo de camundongos.	59
Figura 14: Efeito da toxina A do <i>Clostridium difficile</i> na expressão proteica de β -catenina no óleo de camundongos Swiss.	60
Figura 15: Efeito da toxina A do <i>Clostridium difficile</i> na expressão gênica de LGR5, cMYC e ciclina D1 no óleo de camundongos Swiss.....	62
Figura 16: Efeito da toxina A do <i>Clostridium difficile</i> na expressão gênica de LGR5, cMYC e ciclina D1 no óleo de camundongos C57BL/6.	63
Figura 17: Efeito da toxina A do <i>Clostridium difficile</i> na imunomarcação de Wnt-3a no óleo de camundongos.	65
Figura 18: Efeito da toxina A do <i>Clostridium difficile</i> na expressão gênica de Wnt-3a no óleo de camundongos C57BL/6.	66
Figura 19: Efeito da toxina A do <i>Clostridium difficile</i> na imunomarcação de Ki67 no óleo de camundongos.	67
Figura 20: Toxina A do <i>Clostridium difficile</i> diminui a imunomarcação de Ki67 no óleo de camundongos Swiss e C57BL6.....	68

Figura 21: Efeito da toxina A do <i>Clostridium difficile</i> na imunomarcação de ciclina D1 no óleo de camundongos.	69
Figura 22: Efeito da toxina A do <i>Clostridium difficile</i> na expressão gênica de Rac1 no óleo de camundongos.	70
Figura 23: Toxina A do <i>Clostridium difficile</i> reduz a viabilidade de IEC-6 de forma dose-dependente.	72
Figura 24: IEC-6 transfectadas com o plasmídeo pcDNA3-EGFP-Rac1-Q61L.	73
Figura 25: Transfec�o de IEC-6 com o plasmídeo pcDNA3-EGFP-Rac1-Q61L, na presença de agonista da via, reverte a inibi�o da via Wnt/ β -catenina induzida pela toxina A do <i>Clostridium difficile</i>	74
Figura 26: Transfec�o de IEC-6 com o plasmídeo pcDNA3-EGFP-Rac1-Q61L, na presença de Wnt-3a, reverte a inibi�o da transloca�o nuclear de β -catenina induzida pela toxina A do <i>Clostridium difficile</i>	76
Figura 27: Transfec�o de IEC-6 com o plasmídeo pcDNA3-EGFP-Rac1-Q61L, na presença de Wnt-3a, reverte a inibi�o da prolifera�o celular induzida pela toxina A do <i>Clostridium difficile</i>	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C		Graus centígrados
µL		Microlitro
µg		Micrograma
µmol		Micromol
ANOVA		Análise de variância
	APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
AXIS		Proteína axina
BSA		Albumina sérica bovina
Cdna		Ácido desoxirribonucléico complementar
CDT		Toxina binária do <i>Clostridium difficile</i>
CEPA		Comissão de ética em pesquisa animal
Ca ²⁺		Cálcio
	CK-1	Caseína quinase
Cm		Centímetro
c-MYC		Oncogene da Mielocitomatose celular
	COS-7	Linhagem de fibroblastos
	CTD	<i>Clostridium difficile</i> transferase
	CDAD	Doença induzida por <i>Clostridium difficile</i>
DAB		Diaminobenzidina
DAPI		4,6-diamidino-2-fenilindol
DCP		Domínio cisteína protease
DMSO		Dimetilsulfóxido
	DGT	Domínio glucosiltransferase
	DLR	Domínio de ligação ao receptor
DMEM		Meio essencial de Eagle modificado por Dulbecco

DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase	Desoxirribonuclease
DVL	Proteína Dishevelled
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
eGFP	Proteína verde fluorescente realçada
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EPM	Erro padrão da média
EROS	Espécies reativas de oxigênio
<i>et al</i>	E colaboradores
FZD	Receptor <i>Frizzle</i>
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GFP	Proteína verde fluorescente
GSK-3 β	Glicogênio sintase quinase-3 β
H&E	Hematoxilina e eosina
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
ICD	Incidência de infecção por <i>Clostridium difficile</i>
ICC45	Cepas do <i>Clostridium difficile</i> isoladas no Instituto do Câncer do Ceará
IEC-6	Células epiteliais intestinais-6
IL-1 β	Interleucina -1 β
i.p.	Intraperitoneal
KCl	Cloreto de potássio
Ki67	Anticorpo proliferação
Kg	Kilograma
LEICA	Sistema de aquisição de imagens
LPR5/6	Co-receptor

LGR5	Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5
M	Molar
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
mg	Miligrama
Min	Minuto
mL	Mililitro
MTT	Ensaio de viabilidade celular
N	Número
NAP4	<i>Clostridium difficile</i> North American pulse-field type 4
NAPI	Cepas do <i>Clostridium difficile</i>
NFκB	Fator de transcrição nuclear-Kb
NOS	Óxido nítrico sintase
NO	Óxido nítrico
NOx	Metabólitos de óxido nítrico
NP-40	Tampão de lisado celular
OPRCS	Oligopeptídeos repetitivos combinados
PaLoc	Locus de patogenicidade
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PFA	Paraformaldeído
PCDNA3	Plasmídeo vazio
pH	Potencial hidrogeniônico
PPAR-γ	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma-gama
PTKS	Receptores de tirosina quinase
PRL	Vetor reorter constitutivamente ativo
PVDF	Fluoreto de polivinilideno

Q61LRAC1	Plasmídeo
qPCR	Reação em cadeia de polimerase em tempo real
RAGE	Receptor de produtos finais de glicação avançada
RAS	Proteínas vírus do sarcoma
RHO	Interruptores moleculares
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
RIPA	Tampão de extração de proteínas
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPM	Rotações por minuto
S100 β	Fração beta da proteína S100
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Proteínas em gel de poliacrilamida-SDS
SFB	Soro fetal bovino
sRAGE	Região do RAGE de ligação para o ligante extracelular
TBST	Mistura de solução salina tamponada
TcdA	Toxina A do <i>Clostridium difficile</i>
tcdA	Gene que codifica o RNA _m da Toxina A do <i>Clostridium difficile</i>
TcdB	Toxina B do <i>Clostridium difficile</i>
tcdC	Gene regulador
tcdE	Gene bacteriófago
tcdR	Gene regulador negativo
TCF Fator	Família de proteínas de ligação a DNA que se expressam principalmente em linfócitos T
TK	Timidina quinase
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
UFC	Universidade Federal do Ceará

V		Volume
	WIF	Fator inibitório Wnt
Wnt		Wingless
μL		Microlitro
μg		Micrograma

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 CLOSTRIDIUM DIFFICILE: CONSIDERAÇÕES GERAIS E EPIDEMIOLOGIA....	18
1.2. PATOGENICIDADE DO CLOSTRIDIUM DIFFICILE	22
1.3 ASPECTOS CLÍNICOS DA ICD TRANSMISSÃO E MANIFESTAÇÃO CLÍNICA	23
1.4 TOXINAS DO CLOSTRIDIUM DIFFICILE	25
1.5 RHO GTPASES E SUA INIBIÇÃO PELAS TOXINAS DO CLOSTRIDIUM DIFFICILE	29
1.6 WNT/B-CATENINA E SUA RELAÇÃO COM AS RHO GTPASES.....	32
2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	40
3. OBJETIVOS	41
3.1 OBJETIVO GERAL	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1 FÁRMACOS, REAGENTES E SOLUÇÕES UTILIZADAS NO ESTUDO.....	42
4.2 ASPECTOS ÉTICOS.....	42
4.3 ANIMAIS.....	42
4.4 ENTERITE INDUZIDA PELA TOXINA A DO <i>CLOSTRIDIUM DIFFICILE</i>	42
4.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	43
4.6 PARÂMETROS AVALIADOS <i>IN VIVO</i>	44
4.6.1 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	44
4.6.2 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA B-CATENINA, WNT-3A, KI67 E CICLINA D1.	44
4.6.3 EXPRESSÃO GÊNICA DE LGR5, B-CATENINA, CMYC, CICLINA D1, WNT- 3A E RAC1 POR RT-QPCR.....	45
4.6.3.1 EXTRAÇÃO DO RNA.....	45
4.6.3.2 SÍNTESE DO CDNA.....	46
4.6.3.3 PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (RT-QPCR)	47
4.6.4 EXPRESSÃO PROTÉICA DE B-CATENINA	48
4.6.4.1 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	48
4.6.4.2 DOSAGEM DE PROTEÍNA.....	48
4.6.4.3 WESTERN BLOTTING.....	49
4.7 CULTIVO DE CÉLULAS EPITELIAIS INTESTINAIS DE RATOS (IEC-6).....	50
4.8 PLASMÍDEOS UTILIZADOS NO ESTUDO.....	50

4.9 TRANSFECÇÃO DOS PLASMÍDEOS	51
4.10 PARÂMETROS AVALIADOS <i>IN VITRO</i>	52
4.10.1 VIABILIDADE CELULAR.....	52
4.10.2 TRANSFEÇÃO CELULAR DE PLASMÍDEOS E ENSAIO DIRETO DA ATIVAÇÃO DA VIA WNT/B-CATENINA.....	53
4.10.3 IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA	55
4.10.4 IMUNOCITOQUÍMICA PARA KI67	56
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
5. RESULTADOS	57
5.1 ALTERAÇÕES DE COMPONENTES DA VIA WNT/β-CATENINA INDUZIDAS PELA TOXINA A DO CLOSTRIDIUM DIFFICILE NO ÍLEO DE CAMUNDONGOS ..	57
5.1.1 ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS PROMOVIDAS PELA TOXINA A DO CLOSTRIDIUM DIFFICILE NO ÍLEO DE CAMUNDONGOS.	57
5.1.2 EFEITO DA TOXINA A DO CLOSTRIDIUM DIFFICILE NA EXPRESSÃO DE B-CATENINA NO ÍLEO DE CAMUNDONGOS.....	58
5.1.3 EFEITO DA TOXINA A DO CLOSTRIDIUM DIFFICILE NA EXPRESSÃO DE GENES ALVOS DA VIA WNT/B-CATENINA NO ÍLEO DE CAMUNDONGOS.	61
5.1.4 EFEITO DA TOXINA A DO CLOSTRIDIUM DIFFICILE NA EXPRESSÃO DE WNT-3A NO ÍLEO DE CAMUNDONGOS.	64
5.1.5 EFEITO DA TOXINA A DO CLOSTRIDIUM DIFFICILE NA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS EPITELIAIS DAS CRIPTAS DO ÍLEO DE CAMUNDONGOS.....	66
5.1.6 EFEITO DA TOXINA A DO CLOSTRIDIUM DIFFICILE NA EXPRESSÃO DE RAC1 NO ÍLEO DE CAMUNDONGOS.	70
5.2 PAPEL DO RAC-1 NA INIBIÇÃO DA VIA WNT/B-CATENINA PELA TOXINA A DO CLOSTRIDIUM DIFFICILE EM CÉLULAS EPITELIAIS INTESTINAIS (IEC-6) ..	71
5.2.1 EFEITO DA TOXINA A DO CLOSTRIDIUM DIFFICILE NA VIABILIDADE DE IEC-6	71
5.2.2 EFEITO DA TRANSFEÇÃO DE IEC-6 COM PCDNA3-EGFP-RAC1-Q61L NA MODULAÇÃO DA VIA WNT/B-CATENINA EM CÉLULAS EXPOSTAS A TOXINA A DO CLOSTRIDIUM DIFFICILE	72
5.2.3 EFEITO DA TRANSFEÇÃO DE IEC-6 COM PCDNA3-EGFP-RAC1-Q61L NA TRANSLOCAÇÃO NUCLEAR DE B-CATENINA EM CÉLULAS EXPOSTAS A TOXINA A DO CLOSTRIDIUM DIFFICILE.....	75

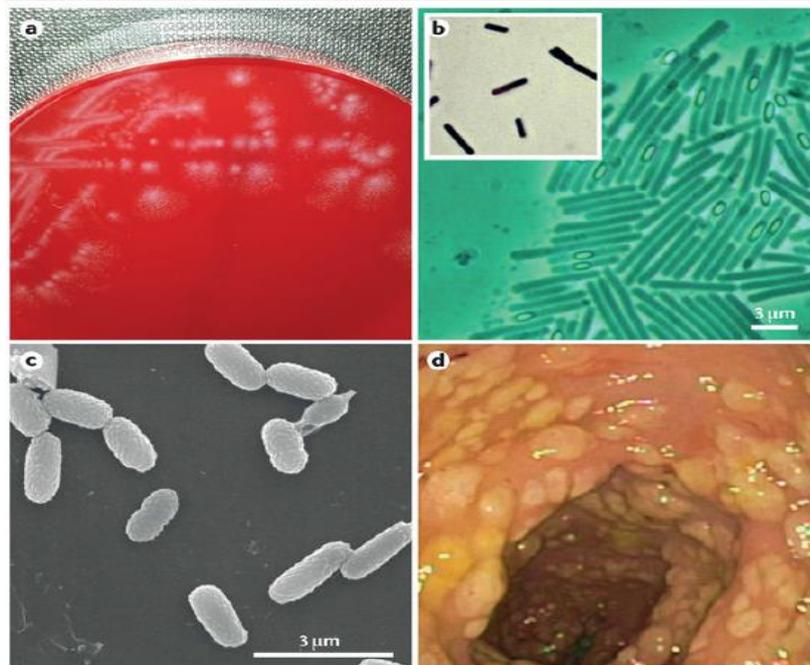
5.2.4 EFEITO DA TRANSFECCÃO DE IEC-6 COM PCDNA3-EGFP-RAC1-Q61L NA PROLIFERAÇÃO DE IEC-6 EXPOSTAS A TOXINA A DO CLOSTRIDIUM DIFFICILE	77
6. DISCUSSÃO	79
7. CONCLUSÕES	88
REFERÊNCIAS.....	89

1. INTRODUÇÃO

1.1 CLOSTRIDIUM DIFFICILE: CONSIDERAÇÕES GERAIS E EPIDEMIOLOGIA

O *Clostridium difficile* é um bacilo Gram-positivo, anaeróbio, formador de esporos, considerado o principal agente etiológico de alterações intestinais associadas a antibióticos (SMITS *et al.*, 2016; RUPINIK *et al.*, 2009) e um dos maiores causadores de diarreia nosocomial (MARTIN; MONAGHAN; 2016). Essa bactéria pode ser encontrada no trato intestinal de humanos e animais (como cachorros), e seus esporos podem ser isolados em alimentos ou em superfícies de objetos presentes no ambiente (HENSGENS *et al.*, 2012).

Figura 1: Imagens de *Clostridium difficile* e pseudomembranas formadas pela infecção.



Fonte: Smitset *al.* (2016). **(a)** Imagem típica das colônias de *Clostridium difficile* em uma placa de ágar sangue. **(b)** Imagem de microscopia de contraste de fase de uma cultura de *Clostridium difficile* com células vegetativas (varas alongadas) esporos de fase-escura (manchas escuras subterminais) e esporos de fase brilhante (elipsoides brilhantes). Na figura à esquerda, bacilos de *Clostridium difficile* positivos para Gram. **(c)** Imagem de microscopia eletrônica de varredura de esporos de *Clostridium difficile*. **(d)** Imagem colonoscópica de colite pseudomembranosa causada por *Clostridium difficile*. A mucosa colônica normal é rosa e as pseudomembranas, resultantes do acúmulo de neutrófilose fibrinas ocasionadas pela infecção por *Clostridium difficile*, são amarelas.

Em 1935, Hall e Toole identificaram, pela primeira vez, *Clostridium difficile* nas fezes de recém-nascidos saudáveis, nos primeiros 10 dias de vida, sob alimentação materna exclusiva. Neste período, essa bactéria foi denominada *Bacillus difficilis*, devido à dificuldade no seu isolamento e cultivo. Além disso, eles sugeriram que a presença de sangue oculto nas fezes, diarreia e convulsões de origem desconhecida em recém-nascidos poderiam ser associadas a essa bactéria (HALL; TOOLE, 1935). Atualmente, sabe-se que crianças com menos de um ano de idade são comumente colonizadas com cepas de *Clostridium difficile* (*C. difficile*) toxigênica ou não toxigênica, porém são assintomáticas, podendo apresentar uma taxa de colonização de cerca de 70% (STOESSER *et al.*, 2011; CHITNIS *et al.*, 2013; ENOCH *et al.*, 2011; STOESSER *et al.*, 2011).

Infecção por *Clostridium difficile* (ICD) é definida pela presença de sintomas (geralmente diarreia) e teste para toxinas de *Clostridium difficile* nas fezes, detecção de cepas toxigênicas na cultura, colonoscopia ou achados histopatológicos revelando colite pseudomembranosa (McDONALD *et al.*, 2018). As manifestações causadas pela ICD podem variar desde uma leve diarreia até uma colite potencialmente fatal, chamada de colite pseudomembranosa, condição caracterizada por lesões patológicas na superfície da mucosa do cólon (ANJUWON-FOSTER; TAMAYO, 2017).

Alguns fatores de riscos predisponentes estão envolvidos no desenvolvimento das ICD como o desequilíbrio da microbiota intestinal normal causado geralmente pelo uso de antibióticos de largo espectro, exposição ao *C. difficile* que ocorre habitualmente no ambiente hospitalar e condições de risco dos hospedeiros principalmente, idosos e imunodeprimidos (RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009; PREDRAG *et al.*, 2012).

Os idosos são uma população predominantemente afetada sendo demonstrada uma prevalência de colonização assintomática de até 51% (KANAMORI *et al.*, 2015). Além disso, estudos epidemiológicos demonstram que nesta população existe um fator de risco de infecção por *Clostridium difficile* dez vezes maior quando comparado à população com menos de 65 anos (SHIN *et al.*, 2017). Dentre os fatores de riscos em idosos destaca-se: o uso de antibióticos, aumento da exposição aos cuidados com a saúde, hospitalização prévia e falta de resposta imune a toxinas produzidas por *Clostridium difficile* (ASEMPA *et al.*, 2017). Porém outros fatores de riscos têm sido abordados, intensificando a relevância

dessa infecção, como o aumento de casos entre indivíduos jovens e saudáveis residentes em comunidades, com incidência de 20-50 casos por 100.000 habitantes nos EUA. (CHITNIS *et al.*, 2013).

ICD é a principal causa de diarreia infecciosa em hospitais de todo o mundo e um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. Nos Estados Unidos, tem sido estimada mais de 500.000 infecções por ano, 3.000 a 15.000 mortes associadas à ICD e custos com cuidados agudos cerca de 4.8 bilhões (McDONALD *et al.*, 2018; LESSA *et al.*, 2015; HALL *et al.*, 2012). Um dos maiores surtos registrados por ICD ocorreu na região de Quebec no Canadá com maior incidência em hospitais e com maior número de casos graves na unidade de terapia intensiva, como o desenvolvimento de megacólon tóxico ou óbito (LOO *et al.*, 2005).

Evidências mostram que o surgimento de uma nova cepa hipervirulenta, caracterizada como pulsotipo NAP1 (North American Pulsotype I) ou BI (Restriction enzyme a analysis type) ou PCR ribotipo 027 (NAP1/BI/027), está ligado ao aumento da incidência e da gravidade de infecções por *C. difficile* (McDONALD *et al.*, 2005; WARNY *et al.*, 2005).

O aumento da incidência e a gravidade de ICDs têm sido bem documentados na última década em toda América do Norte e Europa (FREEMAN *et al.*, 2010; BAUER *et al.*, 2011; DEPESTEL; ARONOFF, 2013; VINDIGNI; SURAWICZ, 2015). Enquanto isso, a conscientização e vigilância de ICD na América Latina permaneceram escassas, apesar da diarreia ser uma das principais causas de morbidade nos países em desenvolvimento (BALASSIANO *et al.*, 2012; LOPARDO *et al.*, 2015).

No Brasil há pouca informação sobre a incidência de ICD e a disseminação do *C. difficile*. Isso se deve em parte ao fato de que a detecção de bactérias anaeróbias não é um procedimento de rotina nos laboratórios clínicos em nosso país, principalmente devido à falta de tecnologias e instalações para o seu cultivo, contribuindo, portanto, para a sub-notificação de ICD (BALASSIANO *et al.*, 2009). Além disso, existem poucos grupos de pesquisas em micro-organismos anaeróbios no país. A maioria dos estudos são realizados no Rio de Janeiro, São Paulo, Belo Horizonte, Porto Alegre e Fortaleza (BALASSIANO *et al.*, 2009; BALASSIANO *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2015; COSTA *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2016; COSTA *et al.*, 2017). Dentre esses estudos os percentuais de incidência de ICD variam de cerca de 10% a 40%, como apresentado no Quadro 1.

Quadro 1 – Incidência da infecção por *Clostridium difficile* em pacientes hospitalizados no Brasil (2000-2014).

Localidade	Incidência de CDI	Nº de isolados de <i>C. difficile</i>	Ano	Referência
São Paulo	5,5% (10/181)*	5,5% (10/181)	2000-2001	Ferreira <i>et al</i> 2003
Rio de Janeiro	6,7% (14/210)*	6,7% (14/210)	----	Pinto <i>et al</i> 2003
São Paulo	44,7% (22/49)	-----	2002	Marcon <i>et al</i> 2006
Rio de Janeiro	28,5% (6/21)	4/6	2006-07	Balassiano <i>et al</i> 2009
Rio de Janeiro	19,7% (43/218)	4/43	2006-09	Balassiano <i>et al</i> 2010
Fortaleza	18,75% (3/16)	-----	1991-1993	Mesquita <i>et al</i> 2011
Rio de Janeiro	27.1% (19/70)	8/19	2008-2009	Balassiano <i>et al</i> 2011
Rio de Janeiro	6,8% (5/74)	4/5	2009-10	Secco <i>et al</i> 2014
Porto Alegre	8,3% (8/96)		2011-12	Pires <i>et al</i> 2014

Fonte: COSTA; C L., 2014.

A literatura carece de informações sobre a epidemiologia do *C. difficile* no Nordeste do Brasil que se restringia até 2012 ao artigo (LIMA *et al*, 2010) que cita um paciente assintomático positivo para toxinas do *C. difficile* no Hospital Walter Cantídio. A partir de 2013 nosso grupo de pesquisa vem trabalhando na investigação da incidência e caracterização fenotípica e genotípica de cepas de *C. difficile* isoladas de pacientes com diarreia em hospitais cearenses. Nossos dados mostram uma elevada positividade, isto é, 48% dos pacientes oncológicos com diarreia internados no Hospital Haroldo Juaçaba do ICC em Fortaleza, Ceará foram positivos para *C. difficile* (COSTA *et al.*, 2017). Além disso, Costa e colaboradores (2014) no estudo de caso mostraram um paciente com doença induzida por *C. difficile* adquirida na comunidade, sendo o mesmo portador de HIV e neoplasia.

No estudo realizado por Costa e colaboradores (2017) em um hospital de referência para o tratamento de câncer no Ceará, observou-se a elevada incidência de ICD (48%), sendo a cepa predominantemente identificada como NAP4, comumente encontrado em outros países, como EUA e Europa assim como em outros estados aqui no Brasil. Esse genótipo também tem sido isolado tanto em casos de infecção hospitalar como em casos de ICD associados à comunidade.

Nesse estudo realizado em amostras de pacientes oncológicos foi isolado uma nova cepa de *C. difficile* (ICC-45), com um novo padrão de macrorrestrição PFGE e um novo padrão de Ribotipagem, pertencente ao ST41 MLST Clado 2 das cepas hipervirulentas, e toxina B variante que induz um efeito citopático distinto de acordo com o seu fenótipo de virulência aumentado atribuído à linhagem MLST Clado 2 (COSTA *et al*, 2016). As cepas ICC-45 e NAP1/BI/027 produziram uma expressão semelhante de citocinas pró-inflamatórias, alta produção de iNOS e resposta ao estresse oxidativo no modelo de alça ileal em camundongos, mostrando as características semelhantes da patogênese (COSTA *et al.*, 2016).

Esses resultados ressaltam a importância do estudo dessa bactéria para a compreensão da situação epidemiológica dessa infecção e de sua dispersão entre unidades hospitalares brasileiras (COSTA *et al*, 2014; COSTA *et al.*, 2016; COSTA *et al*, 2017).

Diversos fatores de virulência do *C. difficile* contribuem para a colonização e o desenvolvimento de infecção, como flagelos, adesinas, enzimas proteolíticas, esporos, biofilmes, mas o principal e mais estudado fator de virulência são as toxinas produzidas por algumas cepas (BALASSIANO *et al*, 2012; JANOIR, 2016).

1.2. PATOGENICIDADE DO CLOSTRIDIUM DIFFICILE

A patogênese da infecção por *C. difficile* inicia com a ingestão de organismos vegetativos ou com esporos. As células vegetativas são mortas no estômago devido à acidez, mas os esporos podem sobreviver, e germinar no intestino delgado por meio da ação dos ácidos biliares. Em seguida, locomovem-se com auxílio de flagelos, multiplicam-se e aderem ao epitélio do cólon. Quando aderidas, as células vegetativas de *C. difficile* produzem toxinas A e B e enzimas hidrolíticas. As toxinas A e B agem quando são liberadas no lúmen intestinal e são internalizadas por endocitose, pelas células intestinais por meio de ligação aos

receptores. Dentro das vesículas endossômicas, cujo pH torna-se ácido por causa da fusão com lisossomos presentes no citoplasma, as toxinas sofrem clivagem autocatalítica, e os fragmentos contendo os sítios ativos migram para o citoplasma, onde exercem suas funções causando a produção de citocinas pró-inflamatórias como Interleucina 1 β (IL-1 β) por macrófagos peritoneais de ratos (ROCHA *et al.*, 1997), bem como produção de fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) por células epiteliais intestinais humanas (BRITO *et al.*, 2002b). Brito e colaboradores, em 2002, demonstraram que a TdcA atua em neutrófilos humanos induzindo mudança na forma, no rearranjo da actina do citoesqueleto e na aderência a substrato de matriz extracelular, secundária ao aumento de expressão de Mac-1 (BRITO *et al.*, 2002a), eventos que poderiam estar relacionados com a formação de pseudomembranas na colite pseudomembranosa.

Além disso, observaram que a Toxina A é um potente indutor de apoptose, sendo esta mediada por caspases 3, 6, 8, 9, Bid e por lesão mitocondrial (BRITO *et al.*, 2002b). A produção local de enzimas hidrolíticas resulta na degradação do tecido conjuntivo e epitelial além de acúmulo de neutrófilos, contribuindo para a formação de pseudomembranas e diarreia aquosa. Com a lesão do epitélio intestinal, as toxinas podem ganhar a circulação sistêmica, agindo também em outros órgãos. (POUTANSEN; SIMOR, 2004; HOOKMAN; BARKIN, 2009).

1.3 ASPECTOS CLÍNICOS DA ICD TRANSMISSÃO E MANIFESTAÇÃO CLÍNICA

O principal modo de transmissão de *C. difficile*, resultando em doença, ocorre através da via fecal-oral, principalmente dentro de instalações hospitalares (COHEN *et al.*, 2010). Durante a colonização por cepas toxigênicas de *C. difficile*, os indivíduos podem se tornar portadores ou desenvolver doença com vários graus de gravidade, desde uma diarreia leve até à colite pseudomembranosa, sendo os portadores assintomáticos um importante reservatório para a transmissão nosocomial de *C. difficile* (RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009).

Os pacientes com sintomas clínicos podem ser estratificados em doença leve a moderada, doença grave e doença fulminante. Esta estratificação é importante para determinar a necessidade de tratamento, o tipo de agente antimicrobiano que pode ser necessário para o tratamento, se a cirurgia é

necessária para controlar a doença, e a necessidade de cuidados de suporte, como internação em unidade de terapia intensiva (BURNHAM; CARROLL, 2013). A apresentação clínica mais comum da ICD é a diarreia associada a um histórico de uso de antibióticos. O início da diarreia é geralmente durante ou logo após o recebimento de antibioticoterapia, mas pode ocorrer a partir de alguns dias após o início ou até 8 semanas após o término da terapia. As fezes são geralmente aquosas, com um odor fétido característico, embora também possam ocorrer fezes pastosas, e a presença de sangue é rara (BARLETT; GERDING, 2008).

Em pacientes com doença leve a moderada, a diarreia é geralmente o único sintoma, com os pacientes apresentando até 10 evacuações por dia. Pacientes com doença moderada tem diarreia com evidência de colite e caracteriza-se por febre e cólicas abdominais. Alterações laboratoriais na doença leve e moderada incluem um nível leucocitose de 15.000 cel/ μ L ou inferior e um nível de creatinina sérica inferior a 1,5 vezes do nível pré-mórbido (BURNHAM; CARROLL, 2013). Em geral, a febre ocorre em aproximadamente 28% dos casos, leucocitose em 50%, e dor abdominal em 22%. Febre alta com temperaturas por vezes chegando a 40° C e a contagem de glóbulos brancos, aproximando-se 50.000 cel/mm³ pode estar presentes. Dor abdominal, quando ocorre, é normalmente localizada nos quadrantes inferiores. Hipoalbuminemia é o resultado das grandes perdas de proteína atribuídas ao vazamento de albumina e pode ocorrer precocemente no curso da doença (BARTLETT; GERDING, 2008; RODRÍGUEZ-PARDO; MIRELIS; NAVARRO, 2013; BURNHAM; CARROLL, 2013).

Complicações graves de colite por *C. difficile* incluem desidratação, distúrbios eletrolíticos, hipoalbuminemia, megacólon tóxico, perfuração intestinal, hipotensão, insuficiência renal, síndrome da resposta inflamatória sistêmica, sepse e morte (COHEN *et al*, 2010). Doença fulminante por *C. difficile* ocorre em < 5% dos pacientes, e é caracterizada por dor abdominal grave, diarreia profusa, ou por vezes sem diarreia, na qual o doente progride rapidamente para o desenvolvimento de um íleo ou megacólon tóxico, uma condição em que o cólon tenha uma distensão maior que 6 cm e corre o risco de perfuração. Este é um desenvolvimento grave e pode indicar a necessidade de cirurgia emergente (BURNHAM; CARROLL, 2013).

1.4 TOXINAS DO CLOSTRIDIUM DIFFICILE

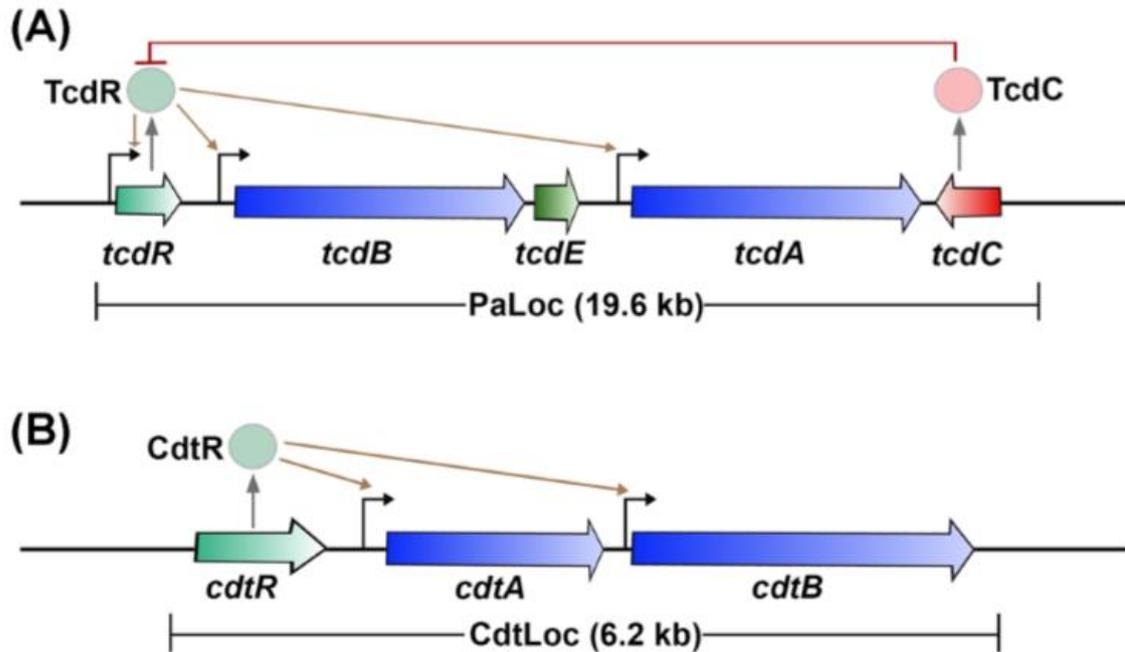
O *Clostridium difficile* produz pelo menos três exotoxinas, chamadas toxina A, toxina B e a toxina binária (*Clostridium difficile* transferase; CDT). O número de toxinas e as quantidades produzidas variam entre diferentes cepas de *C. difficile*. Certas cepas hipervirulentas liberam as três toxinas durante a infecção. Outras produzem isoformas específicas de toxinas A e B (RUPNIK e JANEZIC 2016).

As toxinas do *Clostridium difficile* são proteínas de alto peso molecular, de cadeia única. Toxina A consiste de 2710 resíduos de aminoácidos com massa molecular de 308 kDa e Toxina B consiste de 2366 resíduos com massa de 270 kDa (VON EICHEL-STREIBER *et al.*, 1996). As duas toxinas exibem alta homologia (~50% de identidade de aminoácidos).

Os genes que codificam a Toxina A (tcdA) e Toxina B (tcdB) estão localizadas dentro do locus de patogenicidade (Paloc), uma região do cromossomo de 19,6 kb que contém outros genes (tcdR, tcdE e tcdC) (MONOT *et al.*, 2015). Esses últimos genes regulam a produção e secreção de Toxina A e Toxina B (BARTH *et al.* 2004). O tcdR codifica um fator sigma polimerase que regula positivamente a expressão de toxinas (MANI; DUPI, 2001). O papel do tcdE é controverso, mas sugere-se que codifica uma holina do bacteriófago requerido para secreção das toxinas (GOVIND; DUPUY, 2012). Embora o papel de tcdC seja conflitante a maioria dos artigos sugerem que esse gene atua como regulador negativo na expressão de toxinas (HUNT; BALLADR, 2013). O Paloc é sempre encontrado na mesma localização genômica (Figura 2A). No entanto nas cepas não toxigênicas é substituído por uma região altamente conservada não codificante de 175/75bp (BAUEN *et al.*, 1996; DINGLE *et al.*, 2014).

A toxina binária (CDT), produzida por algumas cepas de *C. difficile*, é codificada por dois genes, cdtA e cdtB, que estão localizados numa região cromossômica de 6,2-kb (distinta do PaLoc) denominada Cdtloc ou CdtLoc (Figura 2B) (PERELLE *et al.* 1997; CARTERET *et al.* 2007). As cepas negativas para CDT contêm tipicamente uma deleção de 2-kb no CdtLoc (STARE, DELME, RUPINIK 2007). O cdtloc também contém um terceiro gene, cdtR, que regula positivamente a produção de CDT e, no ribotipo epidêmico 027, também regula positivamente a produção de Toxina A e Toxina B (CARTER *et al.* 2007; LYON *et al.* 2016).

Figura 2: Representação esquemática do locus de patogenicidade (Paloc).



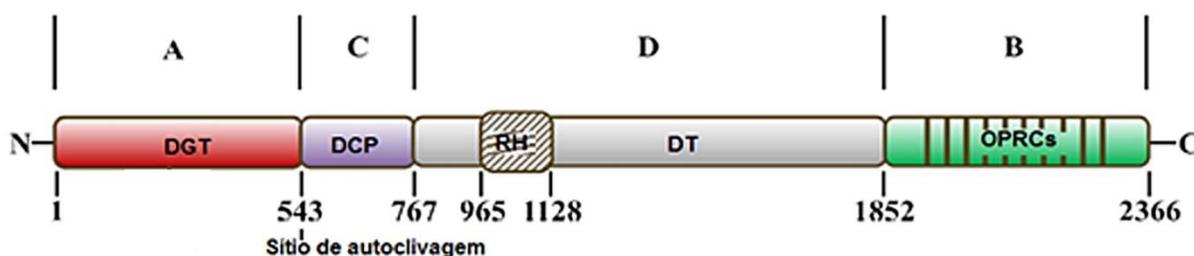
Fonte: Lacy e Chandrasekaran (2017). **(A)** Os genes que codificam as toxinas, *tcdA* and *tcdB*, são indicados por setas azuis; os genes regulatórios são mostrados por: seta verde clara (*tcdR*; regulação positiva) ou vermelha (*tcdC*; regulação negativa); e o gene codificador de holina, *tcdE* é representado por seta verde escura. A direção da seta reflete a direção da transcrição. TcdR regula positivamente sua própria expressão e a expressão de *tcdA* e *tcdB* (indicado pelas setas marrons). TcdC é um fator que regula negativamente a expressão de toxina interferindo com a função de TcdR. TcdE está envolvido com a secreção de toxinas. **(B)** Representação esquemática do locus para toxina binária (CdtLoc). Os genes codificadores de CDT, *cdtA* e *cdtB*, são mostrados em azul. O gene regulador *cdtR* é mostrado em verde claro. CdtR regula positivamente a transcrição de *cdtA* e *cdtB*.

Ao serem liberadas pelo *Clostridium difficile*, essas toxinas são internalizadas pelas células do hospedeiro, ligando-se á receptores de membrana específicos, e causam glicosilação das Rho GTPase, resultando em disruptura do citoesqueleto e dasjunções de oclusão qual resulta em diminuição da resistência transepitelial, e danos do epitélio intestinal. Além disso, elas promovem liberação de citocinas pró-inflamatórias e de quimiocinas que promovem quimiotaxia dos neutrófilos, contribuindo para a lesão na mucosa (RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009). Estudos *in vivo* utilizando alças intestinais de roedores mostraram que TcdA, diferentemente de TcdB, provoca secreção de fluidos, danos da mucosa, e uma infiltração proeminente de neutrófilos na mucosa intestinal, já que roedores não

possuem receptores para TcdB na superfície voltada para a luz do intestino (POTHOULAKIS; LAMOUNT, 2001). As toxinas A e B são enterotoxinas que causam danos em células epiteliais, aumento de exsudato inflamatório e hemorrágico (PÉREZ *et al.*, 2013) e apoptose (CHUMBER *et al.*, 2012; BRITO *et al.*, 2002).

Acredita-se que as toxinas são compostas de estruturas multimodulares (BARROSO *et al.*, 1994; VON EICHEL-STREIBER *et al.*, 1996; VON EICHEL-STREIBER *et al.*, 1992). Com base na sua estrutura, em 2008 foi proposto um modelo ABCD que relaciona a função à estrutura das toxinas (JANK; GIESEMANN; AKTORIES, 2008). As toxinas são compostas por quatro domínios: (A) domínio N-terminal, que contém o domínio biológico ativo, o domínio glucosiltransferase (DGT); (B) O domínio de ligação ao receptor (DLR), localizado na porção C-terminal das toxinas, que é contituido de oligopeptídeos repetitivos combinados (OPRCs); (C) domínio cisteína protease (DCP) que é responsável pelo processo de autoclivagem das toxinas; (D) domínio de translocação (domínio TD) que é crucial para transferência da toxina do endossomo para o citoplasmas das células do hospedeiro, por meio da formação de poro na membrana (CHEN *et al.*, 2015; EGERER *et al.*, 2007; REINEKE *et al.*, 2007; SPYRES; RUPINIK, 2005; BARTH *et al.*, 2001; BALLARD, QA DAN; 2000; VON EICHEL-STREIBER; SAUERBORN; KURAMITSU., 1992; VON EICHEL-STREIBER; SAUERBORN, 1990) (Figura 3).

Figura 3: Relação estutura-função das toxinas do *Clostridium difficile*

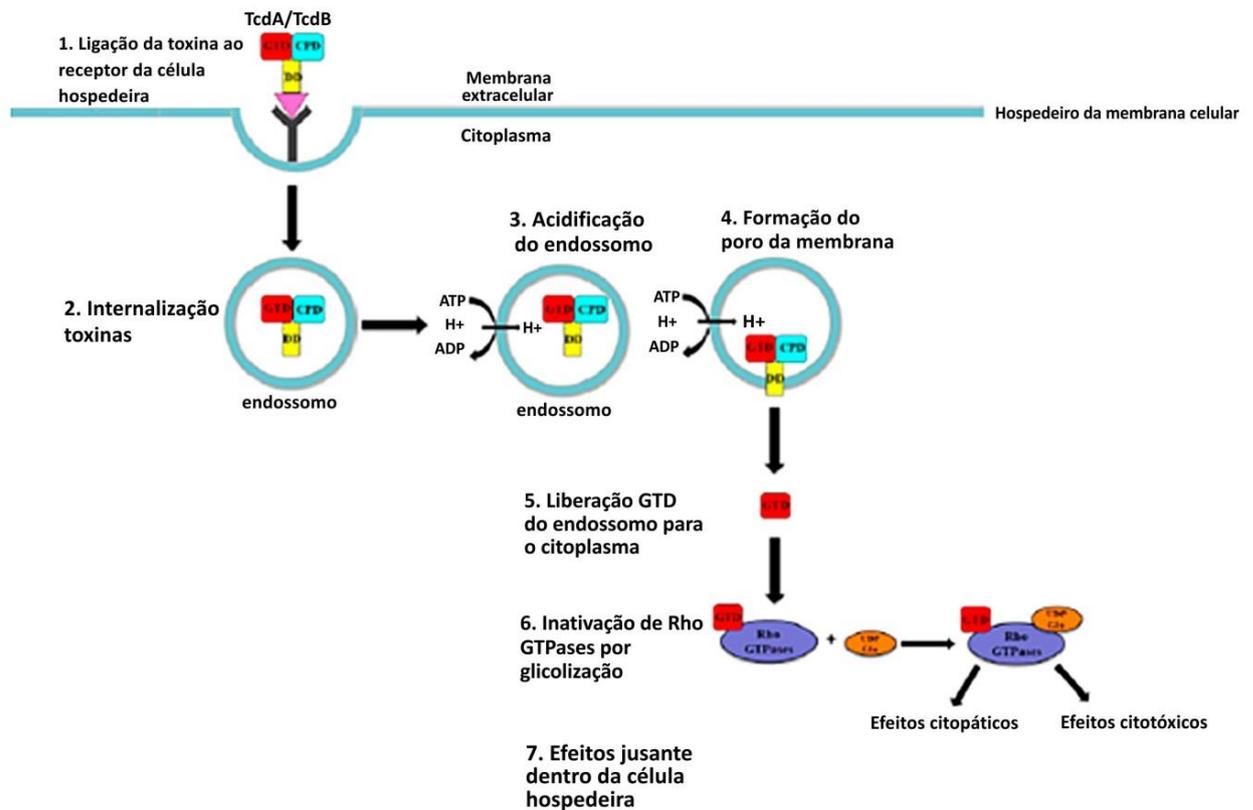


Fonte: Chen *et al.* (2015). A estrutura das toxinas do *Clostridium difficile*, de acordo com o modelo ABCD, é dividida em quatro domínios estruturais. O domínio **A** representa o domínio glucosiltransferase (DGT) localizado no domínio N terminal. O domínio **C** tem atividade cisteína protease, sendo responsável por clivar o DGT dos demais componentes. O domínio **D** é um domínio de translocação (DT), responsável pela translocação de DGT para o citoplasma do hospedeiro, devido a sua capacidade de formar poro na membrana do endossomo. O domínio **B**, formado por

oligopeptídeos repetitivos combinados (OPRCs), é responsável pela ligação das toxinas ao receptor nas células do hospedeiro.

O mecanismo pela qual as toxinas agem e causam seus efeitos dentro das células não é completamente esclarecido. No entanto, há um modelo hipotético que é amplamente aceito. De acordo com este, as toxinas se ligam primeiramente ao receptor de superfície celular do hospedeiro via DLR e entra nessas células por meio de endocitose (FLORIN; THELESTAN, 1983). Quando há uma redução do pH no interior do endossomo, ocorre uma mudança conformacional das toxinas, com conseqüente formação de poro na membrana pelo DT, resultando na translocação de DGT e DCP para o citoplasma da célula do hospedeiro (GENISYUEREK *et al.*, 2008; ZIEGLER *et al.*, 2008; QA DAN; SPYRES; BALLARD, 2005; RUPINIK *et al.*, 2005; BARTH *et al.*, 2001; HENRIGUES; FLORIN; THELESTAM, 1987). No citoplasma, hexafosfato (InsP6) ativa a protease para clivagem auto-proteolítica, com conseqüente liberação de DGT que inativa as Rho GTPases. O mecanismo de ação comum de Toxina A e Toxina B é por meio da glicosilação específica de proteínas Rho-GTPase no citosol hospedeiro usando UDP-glicose como co-substrato, o qual irá resultar na inativação de proteínas Rho (CHEN *et al.*, 2016; GENISYUEREK *et al.*, 2011; EGERER *et al.*, 2007; REINEK *et al.*, 2007; SEHR *et al.*, 1998) (Figura 4).

Figura 4: Mecanismo de internalização e ação das toxinas do *Clostridium difficile*.



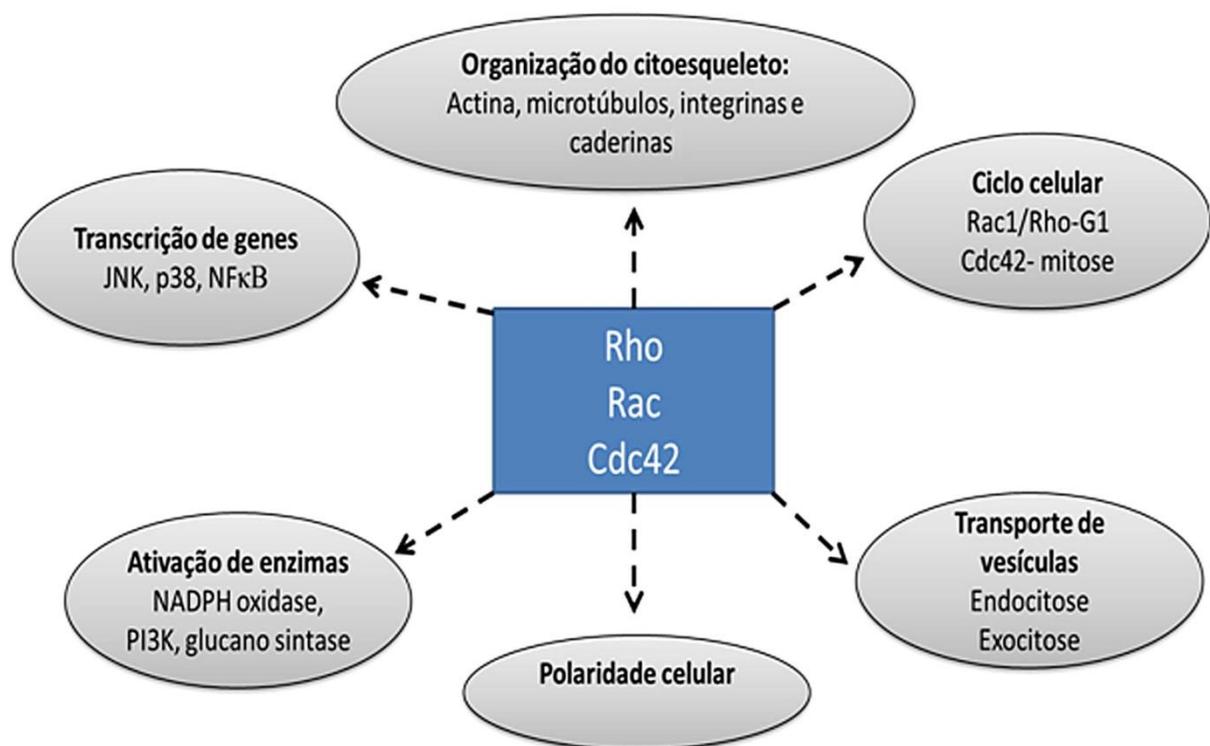
Fonte: Di Bella Chen *et al.* (2016). A liberação das toxinas do *Clostridium difficile* (TcdA ou TcdB) no citoplasma da célula hospedeira pode ser dividida em sete etapas principais: **(1)** ligação da toxina ao receptor da superfície da célula hospedeira; **(2)** internalização de toxinas por meio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

1.5 RHO GTPASES E SUA INIBIÇÃO PELAS TOXINAS DO CLOSTRIDIUM DIFFICILE

As Rho GTPases são moléculas de sinalização intracelular que regulam uma variedade de funções como migração, diferenciação e proliferação. Elas pertencem a superfamília das RAS GTPases e apresentam cerca de 22 membros, sendo que Rac1, RhoA e Cdc42 são os mais bem caracterizados (HALL, 2012; ROJAS *et al.*, 2012; ETIENNE-MANNEVILLE; HALL, 2002).

As Rho GTPases estão envolvidas em inúmeros processos de sinalização, incluindo a regulação do citoesqueleto de actina, polaridade celular, transcrição de genes, progressão do ciclo celular, dinâmica dos microtúbulos, controle da atividade de proteases, fosfolipases e dinucleotídeo de adenina e nicotinamida-oxidase (JANK; GIESEMANN; AKTORIES, 2007; HALL, 2005; BURRIDGE; WENNERBERG, 2004; ETIENNE-MANNEVILLE; HALL, 2002).

Figura 5: Funções da Rho GTPases.



Fonte: Hall (2005).

A inibição da sinalização dessas proteínas pelas toxinas do *Clostridium difficile* levam a desarranjo do citoesqueleto, injúria do epitélio intestinal e apoptose por ativação de caspases (NUSRAT *et al.*, 2001; CARNEIRO *et al.*, 2006).

Dentre as Rho GTPases Rac1 e Cdc42 estão envolvidas na migração celular, porém Rac1 mostrou ser mais importante na migração de células epiteliais intestinais do que Cdc42 (RAY *et al.*, 2003).

Rac1 desempenha papéis críticos na regulação de vários processos celulares que incluem reorganização do citoesqueleto de actina, progressão do ciclo celular e adesão intercelular (RIDLEY, 2001). Além disso, Rac1 ativa NFκB

(SULCINER *et al.*, 1998) e proteína quinase ativadora de mitógeno (MAPK) em células 3T3 (Linhagem de fibroblastos proveniente de embriões), HeLa (linhagem de células epiteliais provenientes de adenocarcinoma), ou COS-7 (linhagem de fibroblastos proveniente do rim) (COSO *et al.*, 1995; MINDEN *et al.*, 1995). Rac1 modula também a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (MYANT *et al.*, 2013).

Os efeitos da sinalização de Rac1 variam entre os tipos celulares e depende da disponibilidade de efetores e sinalizadores extracelulares (ASPENSTROM *et al.*, 1999; SANDER *et al.*, 1998). A expressão de um dominante negativo de Rac1 no epitélio da asa de *Drosophila* inibiu a formação das junções aderentes e induziu morte celular (EATON *et al.*, 1995).

No intestino, Rac1 mostrou modular a polaridade celular (TAKAISHI *et al.*, 1997; JOU; NELSON, 1998), a adesão célula-célula (BRAGA *et al.*, 1997; HORDIJK *et al.*, 1997), a função das junções firmes (JOU *et al.*, 1998), bem como a distribuição e a migração de células epiteliais (RIDLEY *et al.*, 1995; KEELY *et al.*, 1997).

Camundongos adultos mutados com dominante negativo de Rac1 apresentaram diminuição da migração celular, inibição da diferenciação e mostraram alterações da morfologia das criptas e das vilosidades intestinais (STAPPENBERCK; GORDON, 2000).

Um dos mecanismos pelo qual Rac1 controla a proliferação celular é por estimular a translocação de β -catenina do citoplasma para o núcleo durante a sinalização canônica de Wnt/ β -catenina, conforme demonstrado anteriormente em células do ectoderma de embriões de rato (LEONE *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2008; SCHMITZ *et al.*, 2000).

Dados do nosso grupo demonstraram pela primeira vez o efeito inibitório da toxina A do *C. difficile* na via do Wnt/ β -catenina em células epiteliais intestinais de rato (IEC-6) e células colo-retais neoplásicas humanas (RKO) através do ensaio de luciferase para T-cell factor (TCF). Esse dado foi confirmado pela imunofluorescência com localização nuclear de β -catenina e Western blotting para β -catenin and c-Myc (gene alvo da via do Wnt). Além disso, a análise por Western blot mostrou uma diminuição dos níveis proteicos de β -catenina, que foi revertido por z-VAD-fmk, um inibidor de caspases. Entretanto, Toxina A continuou inibindo a via do Wnt/ β -catenina mesmo na presença de z-VAD-fmk, cloridrato de lítio (um inibidor

de GSK3 β), β -catenina constitutivamente ativa, conforme demonstrado pelo ensaio do TCF reporter. (LIMA *et al.*, 2014). Além disso, a pre-incubação de células RKO com Toxina A por 12 h também atenuou a sinalização da via do Wnt/ β -catenina mediada pela ativação por Wnt3a, sugerindo que a inativação de Rho GTPases tem um papel significativo nessa inibição por toxina A. Esses achados sugerem que a inibição da sinalização Wnt/ β -catenina por toxina A é importante para os efeitos antiproliferativos da toxina A anteriormente descritos (BRITO *et al.*, 2005) e deve participar na patogênese da doença induzida pelo *C. difficile* (LIMA *et al.*, 2014).

Recentemente, toxina B mostrou inibir a via Wnt/ β -catenina por ligar-se ao receptor Frizzled-7 (FZD-7) no epitélio colônico. A toxina B se liga ao sítio de ligação do Wnt, conhecido como domínio rico em cisteína (CRD), com uma grande afinidade para FZD 1, 2 e 7. Além de se ligar a esse receptor, impedindo a ligação de ativadores da via, como Wnt-3a, essa toxina mostrou utilizá-lo como meio para ser internalizada dentro dessas células (TAO *et al.*, 2016). Diferente da toxina B, toxina A não tem apresentado afinidade por FZD-7, ou outros receptores dessa família, como FZD-1 ou FZD-2 (GUPTA *et al.*, 2017).

Nesse contexto, o mecanismo pela qual a toxina A inibe a via Wnt/ β -catenina pode ser mediado por Rac-1, uma vez que as atividades dessa Rho GTPase na translocação de β -catenina é inibida pelas toxinas.

1.6 WNT/ β -CATENINA E SUA RELAÇÃO COM AS RHO GTPASES

A via de Wnt/ β -catenina constitui um instrumento fundamental para controlar o desenvolvimento apropriado e a manutenção dos tecidos de embriões e adultos. Isso se dá por meio de uma série de genes que promovem o controle espacial e temporal do crescimento, movimentação e sobrevivência celular. Se esses genes forem expressos continuamente, ocorre ativação aberrante da via de Wnt, provocando um crescimento descontrolado, que pode culminar com desenvolvimento de câncer em tecidos como cólon, mama, pele e ovários (BARKER e CLEVERS, 2006).

A ativação da via de Wnt depende da secreção de proteínas da família *Wingless* (Wnt) que se ligam ao complexo Frizzled (Fzd) de receptores na superfície da célula-alvo para ativar distintos mecanismos intracelulares por meio da via canônica ou de vias não-canônicas, sendo que a composição específica do

complexo Wnt/Fzd irá determinar qual delas será ativada (HUANG e HE, 2008). A via canônica é a mais bem caracterizada dessas vias, sendo importante para a renovação do epitélio intestinal e para o desenvolvimento de câncer (BARKER e CLEVERS, 2006). Basicamente, ela regula a capacidade da proteína β -catenina ativar genes-alvo específicos por meio do seguinte mecanismo: na ausência do ligante Wnt, o ativador transcricional β -catenina é continuamente degradado na célula pela ação de um conjunto de proteínas denominado de “complexo de destruição” (Figura 6, 7).

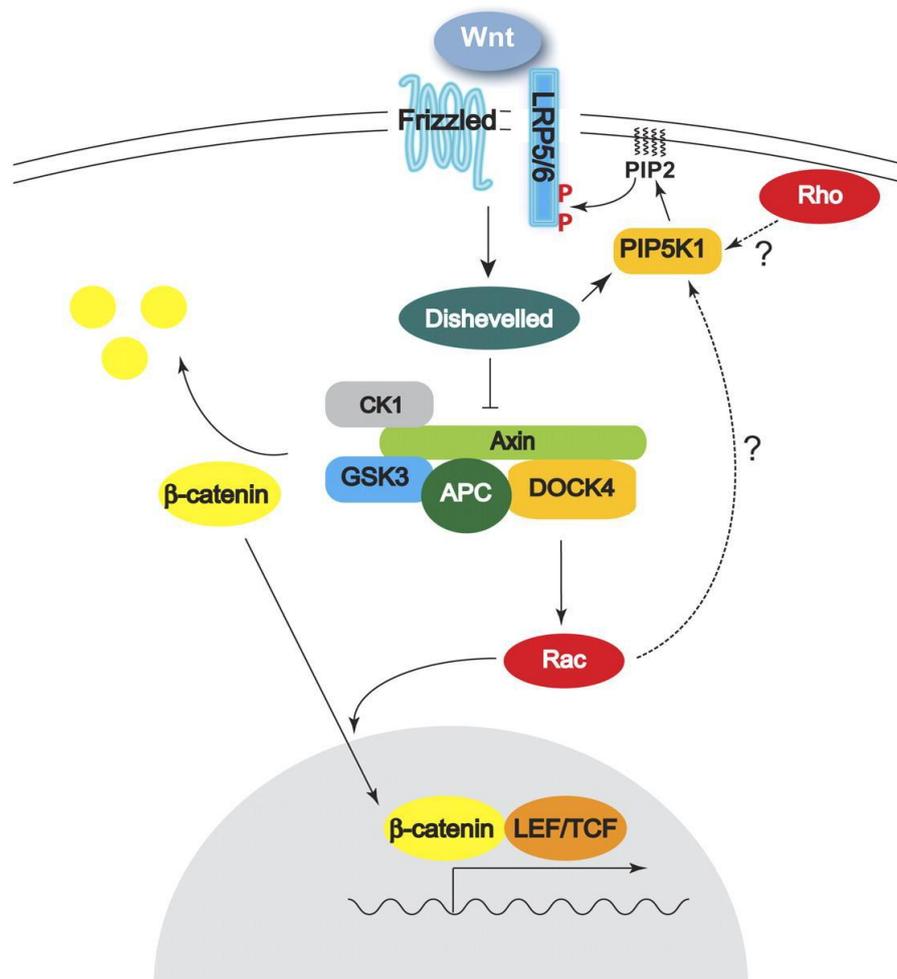
Dentro dele, as proteínas Axina e APC (*adenomatous polyposis coli*) formam uma base que engloba a β -catenina e facilita sua fosforilação pelas enzimas caseína-quinase 1 β (CK1 β) e glicogênio sintase quinase 3 β (GSK3 β). Subsequentemente, a β -catenina fosforilada recebe uma cauda de poli-ubiquitina, é reconhecida e degradada pela enzima E3 ligase do sistema ubiquitina-proteassoma (ABERLE *et al.*, 1997).

Consequentemente, os níveis de β -catenina permanecem baixos, o que permite que as proteínas Tcf/Lef (*T-cell factor/Lymphoid enhancer factor*) associadas ao DNA interajam com co-repressores para bloquear a expressão gênica no núcleo (GRIGORYAN *et al.*, 2008; HUANG e HE, 2008). Por outro lado, na presença de Wnt, forma-se um complexo com o receptor Fzd e o co-receptor LRP 5/6 (*low-density lipoprotein receptor-related protein*) que se liga a proteína Dishevelled (Dvl), responsável por realocar a Axina do complexo de destruição para a membrana celular. Isso impede que a β -catenina seja degradada e permite que ela se acumule no citoplasma e entre no núcleo (HUANG e HE, 2008). No núcleo, ela interage com membros da família Tcf/Lef, convertendo as proteínas Tcf em potentes ativadores transcricionais ao recrutar proteínas co-ativadoras, levando a uma eficiente ativação dos genes alvo da via de Wnt, incluindo c-MYC, ciclina-D1, survivina, bcl-2, Rac1, Rho, Cdc42, dentre outros (BARKER e CLEVERS, 2006; BUONGIORNO *et al.*, 2008; HUANG e HE, 2008).

Há mais de vinte anos vêm-se estudando extensivamente a via de Wnt, porém só recentemente, descobriu-se que Rac1 é importante para o transporte de β -catenina entre o núcleo e o citoplasma (HENDERSON e FAGOTTO, 2002). Em células de carcinoma de cólon humano que possuem a via de Wnt constitutivamente ativada, o uso de dominante negativo de Rac1 foi capaz de inibir a transcrição dos

genes alvo de β -catenina (ESUFALI e BAPAT, 2004) e a inibição de um regulador negativo de Rac1 (RacGAP50C) promoveu a sinalização canônica de Wnt em embriões de *Drosophila* (JONES e BEJSOVEC, 2005). Ademais, sabe-se que a ativação de JNK mediada por Rac1 culmina com fosforilação e translocação de β -catenina para o núcleo (WU *et al.*, 2008). Wnt-3a (ligante da via de Wnt) foi descrito por promover a ligação de Rac1 ao GTP e, após ativação da via pelo ligante, Tiam1 (regulador positivo de Rac1) foi encontrada coprecipitada com β -catenina (BUONGIORNO *et al.*, 2008). DOCK4, regulador negativo de Rac1, foi observado como um dos integrantes do complexo de destruição de β -catenina (UPADHYAY *et al.*, 2008).

Figura 6: Via de Wnt/ β -catenina e sua relação com as Rho GTPases.



Fonte: Modificado de Schlessinger *et al.*, (2009). Sinalização de Rho GTPase na via Wnt canônica. Rac participa na sinalização Wnt canônica promovendo o acúmulo nuclear de β -catenina. A fosforilação de β -catenina mediada por Rac GAP50C e Rac por JNK. Um fator de troca de

nucleotídeo guanina, DOCK4, é encontrado associado ao complexo de destruição, embora não tenha sido diretamente envolvido na translocação nuclear. A fosforilação de LRP5 / 6 dependente de PIP2 importante para a agregação de receptores e sinalização de Wnt aumentada a jusante de Dishevelled. Tanto Rac como Rho foram implicados na regulação da enzima PIP5K1, responsável pela biossíntese de PIP2, embora não se saiba se o fazem durante a sinalização Wnt canônica.

As Rho GTPases também são necessárias para a fosforilação do co-receptor LRP5/6, imprescindível para a ativação da via de Wnt/ β -catenina, e a síntese do lipídeo PIP2 está envolvida neste processo (SCHELSSINGER *et al.*, 2009). A síntese de PIP2 requer a atividade consecutiva de duas kinases, PIP4K e PIP5K, que, por sua vez, são ativadas por Rho e Rac1 (SCHELSSINGER *et al.*, 2009).

Outro aspecto ainda não explorado refere-se à fisiopatologia da doença em relação ao efeito das toxinas do *C. difficile* sobre a via de Wnt/ β -catenina. Vários fatores levam a crer que essa interação ocorre de fato, uma vez que as toxinas A e B do *C. difficile* glicosilam e inativam as proteínas da família Rho (Rho, Rac e Cdc42) (CHAVES-OLARTE *et al.*, 1997). Foi demonstrado, por exemplo, que a inibição de Rac1 – importante para o transporte de β -catenina para o núcleo - por uso de dominante-negativo ou por RNA foi capaz de inibir a via de Wnt em cultura de células Caco2 (HUANG e HE, 2008; WU *et al.*, 2008).

Então, seria esperado que a inibição de Rac1 pelas toxinas do *C. difficile* também inibisse a via de Wnt. Além disso, outro possível mecanismo seria a ativação de caspases pelas toxinas que contribuiria para a degradação de β -catenina independentemente do complexo de destruição. De toda forma, se for confirmado que as toxinas A e B do *C. difficile* inibem a via de Wnt, teríamos várias implicações para compreensão do mecanismo dessa doença, uma vez que a ativação da via de Wnt/ β -catenina é imprescindível para que ocorra a renovação do epitélio colônico (HUMPHRIES e WRIGHT, 2008).

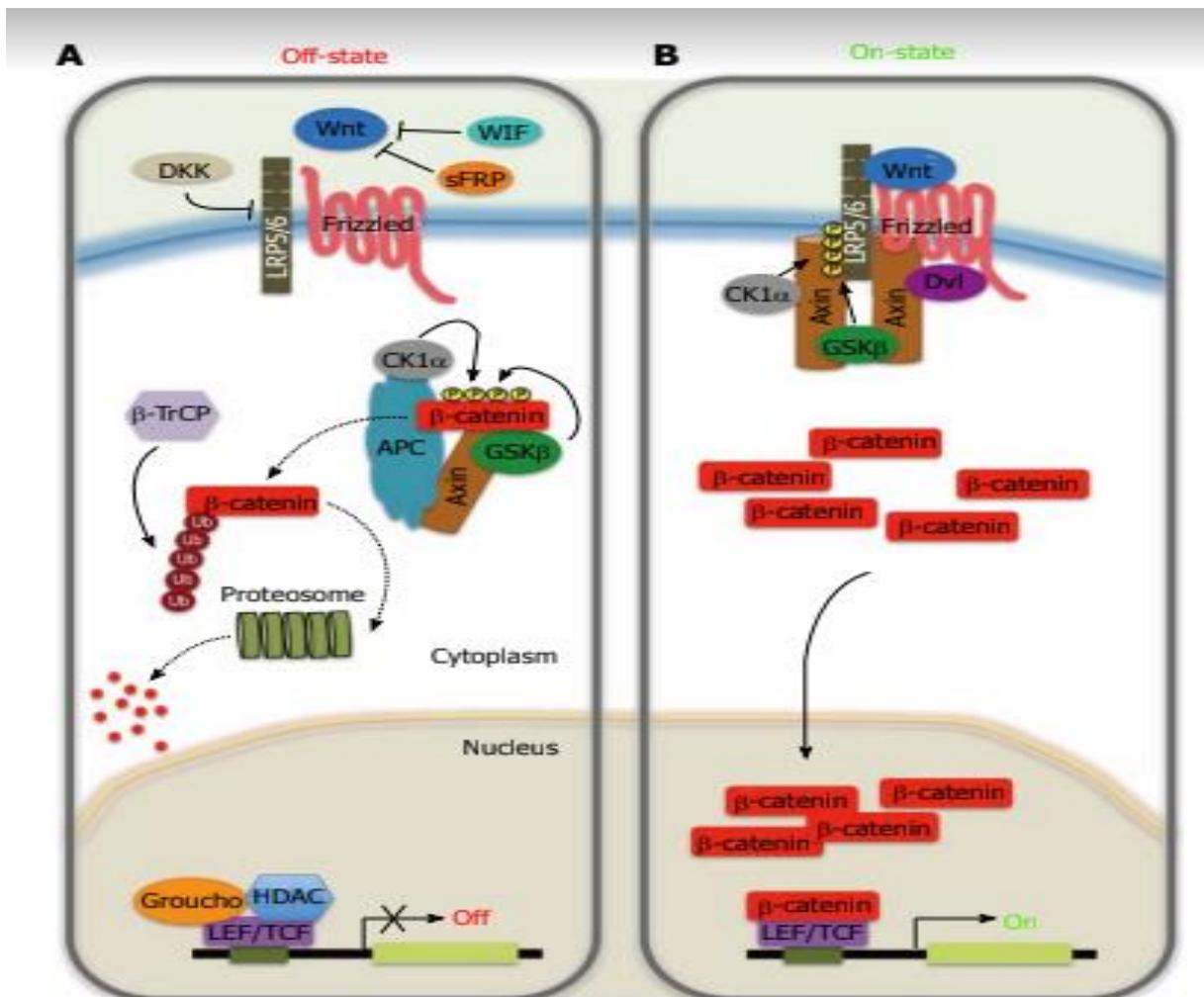
A renovação do epitélio intestinal depende de células progenitoras que residem na base das criptas colônicas e que, posteriormente, irão se diferenciar em colonócitos maduros. Para que ocorra proliferação dessas células, a via de Wnt/ β -catenina precisa estar ativada, levando ao aumento da expressão de moléculas-chave do ciclo celular, como ciclina D1 e c-MYC (BARKER e CLEVERS, 2006; HUMPHRIES e WRIGHT, 2008). Portanto, visto que o *C. difficile* coloniza o cólon, bem como as criptas, seria esperado que as toxinas A e B liberadas também

afetassem essas células, inibindo a via de Wnt/ β -catenina e, conseqüentemente, bloqueando sua proliferação (ou até mesmo induzindo apoptose em doses maiores). Corroborando esta hipótese, estudos demonstraram o efeito antiproliferativo *in vitro* das toxinas A em cultura de células intestinais, embora não tenha explorado o mecanismo pelo qual isso ocorre (BRITO *et al* 2005; LICA *et al.*, 2011). A conexão entre o bloqueio da renovação epitelial e o aparecimento de síndrome diarreica na quimioterapia do câncer já é bem estabelecida, sendo a diarreia um efeito colateral frequente de diversas drogas antineoplásicas, que também possuem efeitos antiproliferativos (HUMPHRIES e WRIGHT, 2008). Portanto, esse mecanismo pode representar um aspecto ainda não investigado da fisiopatologia da doença associada ao *C. difficile*.

Por outro lado, também seria interessante investigar um possível efeito protetor da via de Wnt/ β -catenina na doença induzida pelo *C. difficile*. A ativação constitutiva da via canônica de Wnt mostrou-se um importante mecanismo de resistência a antineoplásicos por conta da super-expressão de genes anti-apoptóticos - como a survivina e o bcl-2 - e inibição da expressão de genes pró-apoptóticos - como bax e bid (BARKER e CLEVERS, 2006; HUANG e HE, 2008). Além disso, a β -catenina promove o aumento da expressão de Rac1, Rho e Cdc42, antagonizando a ação da toxina pela produção de novas proteínas (WU *et al.*, 2008). Considerando esses dados, seria plausível que a ativação da via de Wnt/ β -catenina possa exercer um efeito protetor sobre a morte celular e a destruição do epitélio induzida pelas toxinas do *C. difficile*.

A sinalização Wnt/ β -catenina pode ser inibida pela ligação de membros da proteína relacionada com frizzled segregada (sFRP) e do fator inibitório Wnt (WIF) ao Wnt, ou pela interação de Dickkopf solúvel (DKK) com LRP (CHIURILLO *et al.*, 2015. (Figura 7).

Figura 7: Via Wnt/ β -catenina e seus reguladores.



Fonte: Chiurillo *et al.* (2015). Na ausência de ligantes Wnt, a β -catenina citoplasmática liga-se ao complexo de 'destruição' composto por Axin, polipose adenomatosa (APC), glicogênio sintase quinase 3 β (GSK3 β) e caseína quinase 1 α (CK1 α). β -catenina é fosforilada pelas cinases do complexo num conjunto de resíduos de Ser e Thr conservados no seu terminal amino. A forma fosforilada da β -catenina é reconhecida por uma ligase de ubiquitina E3 (β -TrCP) e, em seguida, direcionada para a degradação proteossômica, resultando em baixos níveis citosólicos. Na ausência de β -catenina nuclear, os fatores específicos de células T (TCF) / proteínas do fator linfóide-aumentador de ligação (LEF) reprimem a expressão de genes alvo através de uma associação direta com inibidores transcricionais da família Groucho e histonas desacetilases (HDACs); B: Na presença do ligante Wnt, o Wnt secretado liga-se ao seu complexo receptor, consistindo de Frizzled e um membro da família de receptores de lipoproteínas de baixa densidade (LRP5 / 6). Esta ligação interrompe o "complexo de destruição", recrutando Dishevelled (Dvl) para o domínio citoplasmático de Frizzled, que induz a deslocalização da Axin citoplasmática para a cauda citoplasmática de LRP e fosforilação por CK1 α e GSK3 β , do último. A interrupção do complexo de "destruição" impede a fosforilação / degradação da β -catenina, levando ao acúmulo de β -catenina no citoplasma. A β -

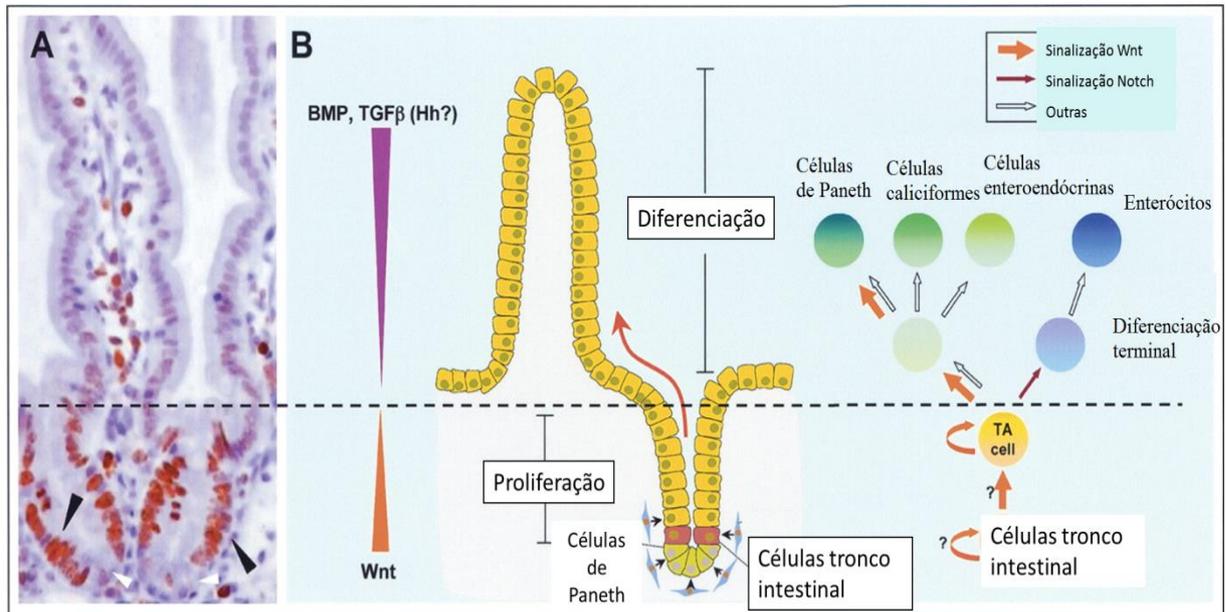
catenina ativa transloca-se para o núcleo, onde atua como um co-ativador da transcrição com o TCF/LEF para ativar os genes-alvo responsivos ao Wnt. A sinalização Wnt extracelular pode ser inibida por ligação de membros das famílias de proteínas relacionada a frizzled secretada (sFRP) e famílias de factor inibidor de Wnt (WIF) a ligantes Wnt, ou pela interação de Dickkopf (DKK) solúvel com LRP.

A desregulação dessa via tem sido implicada em doenças gastrintestinais (PEREIRA *et al.*, 2018), injúrias no pulmão (CHENG *et al.*, 2018), doenças oculares (MA *et al.*, 2017), anormalidades osséas (BARON *et al.*, 2013) e desenvolvimento de tumores malignos (ZHAN *et al.*, 2016).

A suprarregulação da sinalização de Wnt/ β -catenina é responsável por cercade 85% do desenvolvimento de tumores malignos no cólon. Muitos estudos fornecem evidências de que a via de sinalização Wnt/ β -catenina desempenha um papel importante na regulação da transição epitélio-mesenquimal (EMT) (LI *et al.*, 2013). No entanto, a maioria das investigações sobre os efeitos da via canônica Wnt em EMT tem focado em β -catenina em vez do agonista Wnt, apesar da importante função dessas proteínas como fatores iniciantes da via Wnt/ β -catenina.

Em condições fisiológicas, a via de sinalização de Wnt/ β -catenina desempenha um papel importante na renovação das células epiteliais intestinais que constituem as vilosidades e criptas intestinais (CHIEN, 2001; CLEVERS, 2012). Esse processo, que ocorre a cada cinco a sete dias, se dá a partir de células tronco intestinais, localizadas na base das criptas intestinais. Essas células são estimuladas por proteínas Wnt e/ou r-espondinas, ambas secretadas por células de Paneth, a proliferar, migrar e se diferenciar em enterócitos, células enteroendócrinas, células de Paneth e células caliciformes (GREGORIEFF; CLEVERS, 2005) (Figura 8).

Figura 8: Manutenção da barreira epitelial intestinal pela sinalização Wnt.



Fonte: Gregorieff e Clevers (2005). Homeostase intestinal adulta. (A, B) Representação esquemática e seção da unidade cripta-vilosa no intestino delgado maduro. Células proliferativas residem nas criptas, enquanto células diferenciadas ocupam as vilosidades. Os progenitores da cripta migram para cima (seta vermelha) no eixo cripta-vilosidade antes de descamarem para o lúmen. O processo de renovação epitelial leva de 3 a 6 dias e é assegurado por um pequeno número de células-tronco divididas assimetricamente na parte inferior das criptas. A sinalização Wnt no intestino adulto promove a proliferação de células progenitoras ou amplificadoras de trânsito (TA), bem como o comprometimento para linhagens secretoras. A sinalização Wnt também pode conduzir a diferenciação terminal de células secretoras. Embora se acredite que o sinal promova a proliferação e / ou diferenciação de células-tronco intestinais, não há evidências que provem isso (seta com ponto de interrogação) No painel A, setas pretas indicam células amplificadoras de trânsito positivas para Ki67, enquanto setas brancas indicam o compartimento de células de Paneth.

A manutenção desse processo é essencial para a integridade da barreira epitelial intestinal, uma vez que o rompimento desta pode promover a invasão tecidual por bactérias, com consequente liberação de fatores de virulência e intensa inflamação tecidual.

2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

O *Clostridium difficile* tem se destacado mundialmente, por ser um dos agentes causadores de enterites devido à alta incidência nos ambientes hospitalares e o alto impacto para a evolução do paciente. Nos Estados Unidos da América, em 2010, o número de infecções hospitalares causadas pelo *Clostridium difficile* superaram as advindas do *Staphylococcus aureus* e crescem em cerca de meio milhão de pessoas a cada ano (DOLGIN, 2011; LOO *et al.*, 2011).

Apesar da escassez de informações sobre a incidência da doença no Brasil, um estudo multicêntrico, em 2002, já demonstrava que dos enteropatógenos prevalentes na diarreia da comunidade, o *Clostridium difficile* seria a terceira mais freqüente espécie isolada (ANTUNES *et al.*, 2002). Tendo em vista o crescente aumento da infecção pelo *Clostridium difficile*, vários grupos de pesquisa em todo o mundo estão empenhados em compreender a patogênese da doença e desenvolver tratamentos mais eficazes.

Sabendo-se da importância da via Wnt/ β -catenina para a manutenção do epitélio intestinal e da potente inibição da toxina A do *Clostridium difficile* nessa via, nosso grupo de pesquisa tem investigado o mecanismo pelo qual essa toxina a inibe. A compreensão do mecanismo pelo qual essa toxina altera as funções das células epiteliais pode contribuir para o desenvolvimento de fármacos mais eficazes na cessação dos efeitos deletérios dessa toxina no epitélio intestinal. E considerando que Rac1 é importante para o transporte de β -catenina entre o núcleo e o citoplasma, o papel das Rho GTPases nessa via vem sendo melhor compreendido.

Este projeto, portanto, se propõe a estudar as alterações em componentes da via Wnt/ β -catenina na ileíte induzida pela toxina A do *Clostridium difficile* em duas diferentes espécies de camundongos (Swiss e C57BL/6) por serem as espécies mais utilizadas no modelo de alça ileal, assim como investigar o papel de Rac1 na inibição da via Wnt/ β -catenina pela toxina A do *Clostridium difficile*. Este estudo é de alta relevância, tendo em vista que poderá contribuir para o conhecimento científico da patogênese da ileíte induzida pela toxina A do *Clostridium difficile* tendo em vista melhorar as estratégias terapêuticas e preventivas.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o papel da toxina A do *Clostridium difficile* na via Wnt/ β -catenina no intestino de camundongos e avaliar o papel do RAC-1 nas alterações da via Wnt/ β -catenina induzidas pela toxina A do *Clostridium difficile* em cultura de células epiteliais intestinais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as alterações de componentes da via Wnt/ β -catenina no íleo de duas diferentes linhagens de camundongos (Swiss e C57BL/6) submetidos à ileíte induzida pela toxina A do *Clostridium difficile*, analisando a expressão gênica de gene alvos (LGR5, c-Myc, ciclina D1) Wnt-3a, a expressão proteica de β -catenina, e a localização de β -catenina nas células epiteliais das criptas e vilosidades intestinais;
- Verificar o efeito da toxina A do *Clostridium difficile* na proliferação de células epiteliais das criptas do íleo de camundongos (Swiss e C57BL/6) submetidos à ileíte induzida pela toxina A do *Clostridium difficile*, analisando a expressão de Ki67;
- Avaliar o efeito da toxina A do *Clostridium difficile* na expressão gênica de Rac1 no íleo de camundongos (Swiss e C57BL/6).
- Verificar o papel de Rac1, por meio de suprarregulação gênica induzida pela transfecção de plasmídeo de Rac1, na inibição da via Wnt/ β -catenina pela toxina A do *Clostridium difficile* em linhagem de células epiteliais intestinais (IEC-6), avaliando a viabilidade celular, a atividade da via Wnt/ β -catenina e a proliferação celular.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 FÁRMACOS, REAGENTES E SOLUÇÕES UTILIZADAS NO ESTUDO

Os fármacos, os reagentes, os materiais e as soluções que foram utilizados neste estudo encontram-se detalhados no apêndice A.

4.2 ASPECTOS ÉTICOS

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará. Nº19/14, CEUA. Nº2727150218. (Anexo 1).

4.3 ANIMAIS

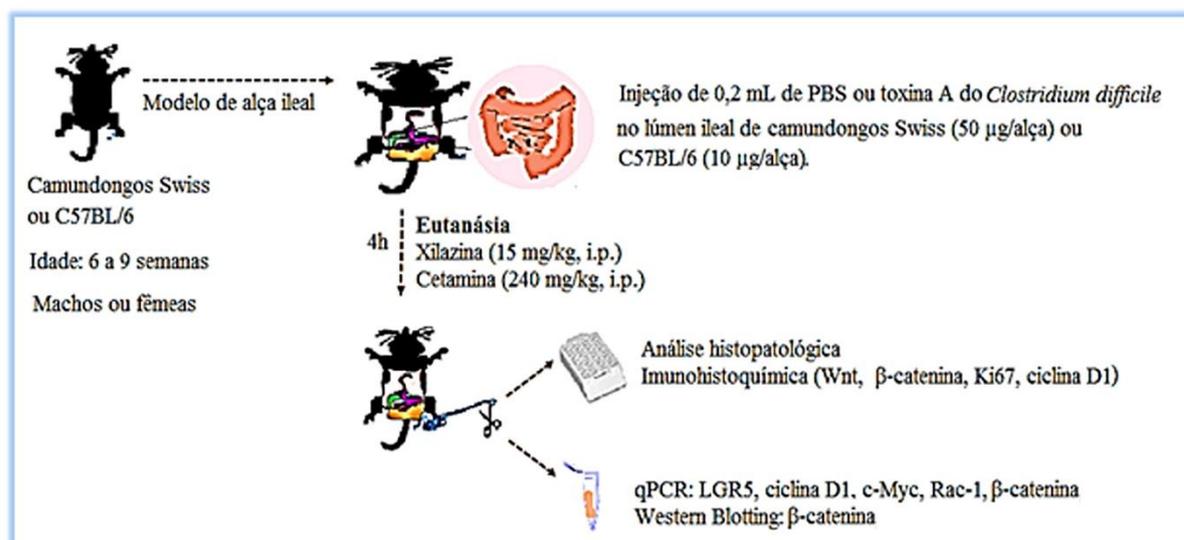
Foram utilizados camundongos Swiss ou C57BL/6, machos ou fêmeas, com idade de 6 a 9 semanas, oriundos do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia/UFC. Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas, receberam água e alimentação *a libitum* e permaneceram nas mesmas condições ambientais durante os experimentos.

4.4 ENTERITE INDUZIDA PELA TOXINA A DO *CLOSTRIDIUM DIFFICILE*

O modelo de enterite (ileíte) induzida pela toxina A do *Clostridium difficile* foi reproduzido conforme descrito previamente (JUNQUEIRA *et al.*, 2011). Os animais foram submetidos a jejum de quatro horas, sendo permitido somente o acesso à água. Os camundongos foram anestesiados com cetamina e xilazina (80 e 5mg/kg, por via intraperitoneal). Em seguida, realizou-se laparotomia mediana e duas ligaduras na região do íleo terminal foram realizadas, distando aproximadamente 4 cm entre si, formando uma alça intestinal. No lúmen desta alça, injetou-se 0,2 mL de PBS ou de toxina A purificada do *Clostridium difficile* em camundongos Swiss (50 µg/alça) e C57BL/6 (10 µg/alça). Em seguida, o abdome do animal foi suturado. Após quatro horas da administração da toxina A do *Clostridium difficile*, os animais foram anestesiados, em seguida eutanasiados por meio de subdose de cetamina e xilazina (240 e 15 mg/kg, por via intraperitoneal). As alças

intestinais foram, então, removidas para posterior avaliação dos parâmetros deste estudo, conforme apresentado na figura 9.

Figura 9: Modelo de ileíte induzida pela toxina A do *Clostridium difficile* em camundongos.



Fonte: Elaborada pela autora.

A toxina A utilizada no presente estudo foi gentilmente cedida pela Dr. Cirle A. Warren da University of Virginia. Vale ressaltar que a eficácia das toxinas foi avaliada antes da realização dos experimentos, avaliando a sua capacidade induzir mudanças morfológicas (como arredondamento celular) e reduzir a viabilidade de células epiteliais intestinais (IEC-6) *in vitro* na concentração já demonstrada por estudos prévios. (LIMA *et al.*, 2014).

4.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em quatro grupos, com seis animais em cada grupo:

Grupo controle Swiss: Camundongos que receberam apenas 0,2 mL de PBS (solução tampão fosfato salina) no lúmen da alça ileal;

Grupo Toxina A Swiss: Camundongos que receberam 0,2 mL de toxina A do *Clostridium difficile* (50 µg/alça) diluída em PBS no lúmen da alça ileal.

Grupo controle C57BL/6: Camundongos que receberam apenas 0,2 mL de PBS (solução tampão fosfato salina) no lúmen da alça ileal;

Grupo Toxina A C57BL/6: Camundongos que receberam 0,2 mL de toxina A do *Clostridium difficile* (10 µg/alça) diluída em PBS no lúmen da alça ileal.

Após quatro horas da administração de PBS ou toxina A do *Clostridium difficile*, os animais foram eutanasiados com cetamina e xilazina (240 e 15 mg/Kg, i.p.) e segmentos do íleo foram coletados para análise dos parâmetros avaliados neste estudo.

4.6 PARÂMETROS AVALIADOS *IN VIVO*

4.6.1 Análise histopatológica

Os segmentos obtidos do íleo foram fixados em formol a 10%. Decorridas 24 horas, os fragmentos foram retirados do formol tamponado e colocados em álcool 70% e posteriormente parafinizados. A seguir, foram realizados cortes histológicos de 5 µm de espessura e as lâminas com cortes dos segmentos foram corados em hematoxilina e eosina (HE). Em seguida com o auxílio do microscópio óptico acoplado ao sistema de aquisição de imagem (LEICA), as imagens histológicas foram fotografadas e as alterações histopatológicas foram identificadas.

4.6.2 Imunohistoquímica para β-catenina, Wnt-3a, Ki67 e ciclina D1

A imunohistoquímica foi realizada com o objetivo para obter dados qualitativos e/ou quantitativos. Por meio desse método, verificaram-se as alterações induzidas pela toxina A do *Clostridium difficile* na expressão de marcadores da via Wnt/β-catenina (β-catenina, Wnt-3a) e de proliferação (Ki67 e ciclina D1) no íleo de camundongos (Swiss e C57BL/6). O método de imunohistoquímica indireta por meio de polímero foi utilizado para a realização das imunomarcações.

Primeiramente, segmentos do íleo foram removidos e fixados em formol tamponado a 10% por 24 horas. Os fragmentos foram processados para inclusão em parafina. Após a inclusão em parafina, os segmentos ileais foram cortados em micrótomo, com espessura de 4 µm que foram inseridos em lâminas silanizadas. Em seguida foram submetidos à desparafinização: inseridos na estufa para aderência do tecido na lâmina (60°C, overnight) e submersos em xilol. Na etapa seguinte foram hidratados por imersão em álcool em concentrações decrescente. Após esta etapa,

realizou-se a recuperação antigênica com tampão citrato (DAKO, pH 6,0 ou 9,0) por 30 minutos na PTLINK (DAKO) e bloqueio da peroxidase com 3% de peróxido de hidrogênio (DAKO) por 20 minutos. Decorrido este tempo as lâminas foram lavadas com solução de lavagem e incubadas com anticorpo primário β -catenina (Abcam, 1:400), Wnt-3a (Invitrogen, 1:800), KI67 (Abcam, 1:200) ou Ciclina D1 (DAKO Flex) diluídos em anticorpo diluente (DAKO) por 1 hora em temperatura ambiente. Após este período os cortes foram lavados com tampão de lavagem e incubados com polímero (HRP DAKO) por 30 minutos. Após lavar as lâminas, seguiu-se com a coloração com o cromógeno 3,3' diaminobenzidina-peróxido (DAB), seguido por contra-coloração com hematoxilina de Mayer. Por fim, foi realizada a desidratação das amostras e montagem das lâminas. Controles negativos foram processados simultaneamente como descritos acima, sendo que o anticorpo primário foi substituído por anticorpo diluente. As imagens foram capturadas por meio de um microscópio de luz acoplado a uma câmera com sistema de aquisição LAZ 3,5 (LEICA DM1000, Alemanha).

Para quantificar o percentual da área imunomarcada para as proteínas, utilizou-se o programa Adobe Photoshop 8.0 a fim de obter a área total do tecido e área imunomarcada. Em seguida para mensurar a porcentagem (%) de área marcada, efetuou-se o seguinte cálculo: (BREY *et al.*, 2003)

$$\% \text{ área marcada} = \frac{\text{Área imunomarcada (pixels)} \times 100}{\text{Área total (pixels)}}$$

4.6.3 Expressão Gênica de LGR5, β -catenina, cMYC, ciclina D1, Wnt-3a e Rac1 por RT-qPCR.

Segmentos do íleo de camundongos (Swiss e C57BL/6) foram coletados para avaliar a expressão gênica de β -catenina, LGR5, cMYC, ciclina D1, Wnt-3a e Rac1 por qPCR. Ao serem coletados os fragmentos foram armazenados em RNA later (Qiagen) para preservar a integridade do RNA e armazenados no freezer a -80°C até sua utilização para extração do RNA.

4.6.3.1 Extração do RNA

O RNA total de cada amostra foi isolado usando kit de extração de RNA (Promega). Resumidamente, as amostras com tampão de lise foram misturadas cinco vezes por inversão. Adicionou-se às amostras 350 μL de tampão de diluição do RNA, sendo homogeneizadas quatro vezes por inversão. Em seguida, as amostras foram aquecidas por três minutos a 70°C , com o objetivo de romper as ligações dos ácidos nucléicos, e centrifugadas por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um microtubo. Adicionou-se 200 μL de etanol a 95%. Na fase seguinte, a mistura foi transferida para *spin basket* acoplado a um microtubo coletor de 2 mL e centrifugado a 11200 RPM por um minuto. Adicionou-se 600 μL de solução de lavagem e em seguida os tubos foram centrifugados por 11200 RPM por um minuto. Na etapa seguinte, as amostras foram tratadas com DNase para reduzir a contaminação com o DNA, sendo incubadas em temperatura ambiente por 15 min.

Decorrido este tempo, 200 μL de DNase *stop solution* foram adicionados e as amostras foram centrifugadas por 1 min a 11200 RPM. Logo em seguida, inseriu-se tampão de lavagem e as amostras foram centrifugadas, conforme relatado anteriormente. Adicionou-se 250 μL de tampão de lavagem seguida de centrifugação por 2 min em 11200 RPM. Na etapa seguinte, o *spin* foi inserido em novo microtubo de 1,5 mL, 40 μL de H_2O livre de nuclease foram adicionados e os microtubos foram centrifugados por 1 minuto. Por fim, o *spin basket* foi descartado e o RNA extraído foi armazenado no freezer -70°C .

Após a extração do RNA de cada amostra, efetuou-se a sua quantificação, com 1 μL de RNA de cada amostra, utilizando Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, EUA). Concomitante a dosagem em $\text{ng}/\mu\text{L}$, realizou-se a avaliação da qualidade do RNA extraído, a qual foi obtida por meio da relação 260/280, fornecida pelo programa relacionado ao aparelho. A avaliação da quantidade de RNA presente em cada amostra é de extrema importância para a obtenção da quantidade de amostra adequada para realização da próxima etapa, a saber: síntese do ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA).

4.6.3.2 Síntese do cDNA

O cDNA foi sintetizado de acordo com o High capacity cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, USA). O volume final de cada amostra foi de 20µL: 2 µL do reagente 10x tampão da enzima; 0,8 µL de oligonucleotídeos; 2 µL de primer; 1 µL da enzima transcriptase reversa; 1ng de RNA, onde o volume utilizado em µL foi dependente da concentração inicial extraída; H₂O de nucleases para completar 20 µL. O protocolo da reação foi realizado à 25° C por 10 min, 37° C por 120 min, 85° C por 5 min. O cDNA foi armazenado em freezer a -20° C até a sua utilização no qPCR.

4.6.3.3 PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

A expressão gênica de β-catenina, LGR5, cMYC, ciclina D1, Wnt-3a e Rac1 foi avaliada por meio do sistema de PCR em tempo real (CFX96 real time system/c1000touch thermal cycler, BioRAD), utilizando kit de TaqMan PCR master mix (Life Technologies). O gene de referência utilizado foi o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Todas as sondas utilizadas e as condições do qPCR estão apresentadas no quadro 2.

Os valores de *Threshold cycle* (C_q ou C_t), obtidos pelo software do equipamento, dos genes avaliados foram exportados para o Microsoft Office Excel 2010, no qual os níveis relativos de RNAm foram calculados de acordo com a metodologia descrita por Livak e Schmittgen (2001).

Quadro 2 - Sequência de oligonucleotídeos dos Primers usados no ensaio de Qpcr.

Genes	Foward	Reverse
β-catenina	5'ACGCACCATGCAGGAATACA3'	5'CTTAAGATGGCCAGCAAGC3'
Ciclina D1	5'GCGTACCCTGACACCAATCT3'	5'AATCTCCTTCTGCACGCACT3'
Cmyc	5'AGCTGCTTCGCCTAGAATTG3'	5'CCTATTCAGCACGCTTCTCC3'
LGR5	5'AACGGTCCTGTGAGTCAACC3'	5'AGTCATGGGGTAAGCTGGTG3'
Rac1	5'GACCAGCCGACTAGCTTTTG3'	5'CAGCACACCCACAACACTAGGA3'
Wnt-3a	5'TTCTTACTTGAGGGCGCAGA3'	5'AAGGAACCCAGATCCCAAAT3'
GAPDH	5'AGAACATCATCCCTGCATCC3'	5'CACATTGGGGGTAGGAACAC3'

4.6.4 Expressão protéica de β -catenina

Para avaliar a expressão protéica de β -catenina nos segmentos ileais de camundongos Swiss, realizou-se Western Blotting. Seguiram-se sequencialmente as seguintes etapas: extração de proteínas, dosagem de proteínas e Western Blotting.

4.6.4.1 Extração de proteínas

Os segmentos ileais (em torno de 30 mg) foram macerados com auxílio de cadinho e pistilo em nitrogênio líquido. O produto desse processo foi inserido em microtubo contendo 200 μ l de tampão RIPA (25 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1% NP-40; 1% triton-X-100; 1% deoxicolato de sódio; 0,1% SDS) e inibidor de protease (Sigma-Aldrich, EUA, 1 μ L de inibidor de protease: 100 μ L de RIPA). Em seguida, as amostras foram vortexadas por 30 segundos, a cada 10 min por 30 min, e centrifugadas (17 min, 4°C, 13000 rpm). O pellet foi desprezado e o sobrenadante (porção que contém as proteínas) foi transferido para um novo microtubo. (TONOCO *et al.*,2017).

4.6.4.2 Dosagem de proteína

As proteínas foram dosadas pelo método do ácido bicinconínico e foi realizado conforme descrito pelo fabricante (*Thermo Scientific*, Estados Unidos, EUA). De acordo com este método, as proteínas presentes nas amostras reduzem o cobre da sua forma cúprica (Cu^{2+}) para a cuprosa (Cu^{1+}). Este se liga a duas moléculas de ácido bicinconínico, resultando na cor púrpura visualizada no final da reação. Inicialmente, a proteína foi diluída (1 μ l de proteína: 20 μ l de RIPA) e preparado 75 μ L de proteína diluída. Em seguida, misturou-se o reagente A (Contém ácido bicinconínico) e B (contém cobre) respectivamente na proporção de 50:1.

Posteriormente, colocou-se em duplicata 25 μ l de cada amostra diluída e 200 μ l da mistura final do reagente A e B em placa de 96 poços. Posteriormente, a placa foi incubada por 30 min a 37°C em estufa. Enfim, efetuou-se a leitura da reação em leitor de Elisa a 562 nm. Para a curva, foram utilizadas concentrações conhecidas de Albumina sérica bovina (BSA): 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 e 0 μ g/mL.

4.6.4.3 Western Blotting

Inicialmente, preparou-se 20 µg de proteína referente a cada amostra, adicionando tampão da amostra (BioRad, EUA 65,8 mM Tris-HCl, pH 6,8; 26,3% glicerol; 2,1% SDS; 0,01% azul de bromofenol) e β-mecaptoetanol (BioRad, EUA), vortexando por 10 s, aquecendo no banho maria (95°C, 5 min) e centrifugando (10000 rpm, 4°C, 30s). Em seguida, realizou-se a eletroforese vertical de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) a 60 v nos primeiros 15 min para deposição das amostras no fundo do poço e 120 v para o restante da corrida, onde foi utilizado gel a 10% (β-catenina, LGR5 e β-actina) ou 8% (e β-actina) e tampão de corrida (25 mM Tris; 192 mM glicina; 1% SDS). Após a corrida, efetuou-se a transferência por eletroforese das proteínas do gel para a membrana de PVDF (BioRad, EUA, Fluoreto de polivinilideno) a 100 vezes por duas horas em tampão de transferência (25 mM Tris; 192 mM glicina; 20% metanol). Após esta etapa, as membranas foram bloqueadas por uma hora em agitação constante, para reduzir as ligações inespecíficas, com 5% BSA (Sigma-Aldrich, EUA) diluído em tampão salina Tris-HCl suplementado com Tween 20 (TBST- 20 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20).

Em seguida, realizou-se a lavagem das membranas com TBST, sendo três lavagens por 10 min cada. Na etapa seguinte, as membranas foram incubadas, overnight a 4°C sob agitação constante, com os anticorpos-catenina (Santa Cruz 1:200) ou anti-β-actina (Millipore, EP1123Y, 1:500), diluídos em 1% de BSA em TBST. Após esta etapa, realizaram-se três lavagens de 10 min cada com TBST. As membranas foram incubadas com os anticorpos secundários HRP-goat anti-rabbit (Invitrogen, 656120, 1:000) ou HRP-rabbit anti-goat (Invitrogen, A16142, 1:1000) por duas horas em temperatura ambiente. Decorrido este tempo, as membranas foram lavadas três vezes, duração de 10 min cada, com TBST. Enfim, adicionou-se o reagente de quimioluminescência (BioRad, EUA, *Clarity western ECL blotting substrate*) e as membranas foram agitadas por 5 min. As imagens das bandas foram capturadas por um sistema de ChemiDoc XRS (BioRad, EUA) ou expostas a filme radiográfico. A densidade das bandas foi mensurada por meio do software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA).

4.7 CULTIVO DE CÉLULAS EPITELIAIS INTESTINAIS DE RATOS (IEC-6)

Foram utilizadas linhagens de células epiteliais intestinais de ratos (IEC-6), obtidas do Banco de células do Rio de Janeiro. O cultivo destas células foi realizado conforme descrito previamente (LIMA *et al*, 2014). As células foram incubadas em estufa umidificada (5% de CO₂, 37°C) e mantidas em meio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) contendo L-glutamina e piruvato de sódio, sendo suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), antibióticos (100U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina) e insulina bovina (10 µg/mL). Neste estudo, as células foram utilizadas entre as passagens 21-38.

Para o subcultivo das células, incubaram-se as células com 0,25% de tripsina por 5 min. Decorrido este tempo, a tripsina foi neutralizada com meio de cultivo (contendo SFB), sendo pipetado três vezes o volume de tripsina utilizado, e as células foram centrifugadas (1200 rpm, 4°C, 5 min). Após este período, o sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em meio de cultivo. O subcultivo ou troca de meio foram realizados a cada 48 ou 72h.

4.8 PLASMÍDEOS UTILIZADOS NO ESTUDO

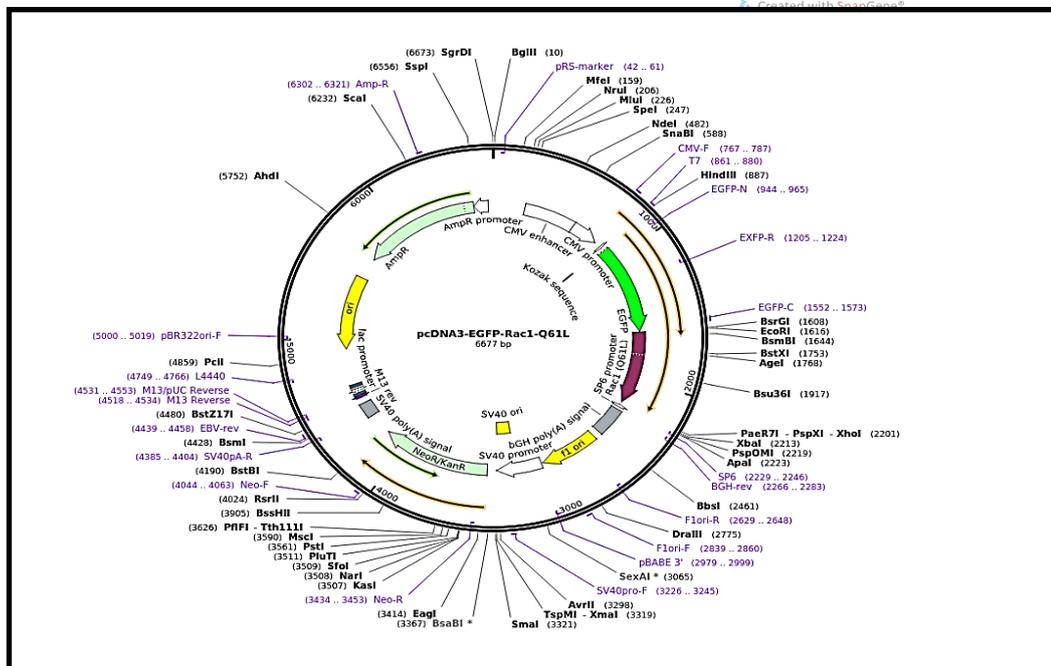
Os vetores utilizados para transfecção de células de mamíferos e o vetor de expressão utilizados nesse trabalho foram gentilmente cedidas pelo Prof. José Garcia Ribeiro Abreu Júnior (Universidade Federal do Rio de Janeiro).

TOPFlash/FOPFlash (*TK-Luciferase Reporter*): O TOPFlash consiste no plasmídeo repórter do fator de célula T (TCF), contendo três cópias do sítio de ligação TCF selvagem acima do promotor de Timidina Quinase (TK) e sítio de leitura da Luciferase (LIMA *et al.* 2014)

pRLTK (*Renilla Luciferase Reporter*): O vetor repórter constitutivamente ativo pRL contém o cDNA (*Rluc*) codificando a *Renilla* luciferase, originamente clonada do organismo marinho *Renilla reniformes*, que é uma proteína monomérica de 56kDa que não necessita de modificação pós-translacional. (LIMA *et al.*, 2014).

pcDNA3-EGFP-Rac1-Q61L: O Vetor pcDNA3 contém o cDNA (Rac1) codificando Rac1 mutante constitutivo na sua forma ativa e a proteína fluorescente verde (GFP) (addgene) (SUBAUSTE *et al.*, 2000).

Figura 10: Plasmídeo de Rac1 mutante constitutivamente ativo (pcDNA3-EGFP-Rac1-Q61L)



Fonte: www.addgene.org/12981.

Rac1 Q61L Mutantes constitutivamente ativos de GTPases da família Rho foram amplificados por reação em cadeia da polimerase a partir de vetores pcDNA3 e fundidos na Vetor GFPTodos os vetores de cDNA construídos foram isolados a partir de células de *Escherichia coli* transformadas com kits de isolamento de cDNA da QIAGEN (ZHANG *et al.*, 1995).

4.9 TRANSEÇÃO DOS PLASMÍDEOS

O processo pelo qual é introduzido DNA ou RNA exógenos em células eucarióticas é denominado transfecção (KENDREM, 1994). Essa técnica tem sido amplamente utilizada para estudar o papel de diferentes proteínas na patogênese de doenças. Há diversos métodos de transfecção, porém um dos métodos mais eficientes e menos citotóxico para células epiteliais é o que utiliza lipossomas catiônicos como mediadores da transfecção. Neste trabalho, utilizou-se o reagente de transfecção Lipofectamina TM 3000 (Thermo Fisher) que tem apresentado

elevada eficiência de transfecção numa variada gama de linhas celulares aderentes e em suspensão (HENRIQUES, 2011).

Lipofectamina é constituída por lipossomas que são moléculas sintéticas de lípidos catiônicos com uma estrutura semelhante à das membranas celulares, apresentando propriedades hidrofóbicas e hidrofílicas como as dos fosfolípidos. Em condições aquosas, a lipofectamina interage de forma eletrostática com o plasmídeo carregado negativamente formando complexos (lipossoma/ácido nucleico) estáveis. Posteriormente, os complexos são integrados no citoplasma da célula por endocitose (HENRIQUES, 2011; KENDREM, 1994).

As células IEC-6 foram plaqueadas em uma concentração de 2×10^4 células/poço em placas de 96 poços. Após 24h, as células foram transfectadas, incubando as células com lipofectamina e uma combinação de vetores de expressão dos plasmídeos (conforme quadro 3). Após 18h, o meio de transfecção foi removido e as células foram incubadas com meio condicionado *Wnt* 50% e/ou toxina A do *Clostridium difficile* (50ng/mL) e após 24h de incubação as células foram utilizadas para avaliação dos parâmetros.

A transfecção do plasmídeo pcDNA3-EGFP-Rac1-Q61L foi confirmada por meio da identificação de células positivas para EGFP em microscópio de fluorescência.

Quadro 3- Número total de células por experimento.

Nº de poços	96 poços	24 poços	6 poços
Células Aderidas	$1-4 \times 10^4$	$0.5-2 \times 10^4$	$0.25-1 \times 10^6$
Lipofectamina TM	0.15µL	0.75µL	3.75µL
P3000	5µL	25µL	125µL

4.10 PARÂMETROS AVALIADOS *IN VITRO*

4.10.1 Viabilidade celular

A viabilidade de IEC-6 expostas à toxina A do *Clostridium difficile* foi avaliada pelo teste de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl) tetrazolium bromide, Sigma com o intuito de definir a melhor concentração de toxina A a ser utilizada na avaliação dos demais parâmetros. Este teste avalia de forma quantitativa a função mitocondrial por meio da redução do MTT em cristais de formazana. Essa reação de redução ocorre dentro da mitocôndria mediada pela enzima succinato desidrogenase que permanece ativa em células viáveis. Dessa forma, a quantidade de cristais de formazana está diretamente relacionada com o potencial de redução do MTT nas mitocôndrias (MOSMAN,1983; LOBNER,2000).

Para a realização desse teste, IEC-6 (10^4 células/100 μ L de meio de cultivo) foram plaqueadas em placa de 96 poços e, após 24h, as células foram incubadas com diferentes concentrações de toxina A do *Clostridium difficile* (10,50 e 100ng/mL). Como controle positivo de morte, adicionou-se um grupo o qual foi incubado com 100% de DMSO. Após 24h de incubação, adicionaram-se 10 μ L de MTT (1mg/mL, reconstituído no meio de cultivo) em cada poço, sendo as células incubadas por 2h com essa solução em uma temperatura de 37°C e 5% de CO₂. Decorrido este tempo, o meio foi removido e 200 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados em cada poço para dissolver os sais de formazan e a leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de ELISA (Biotek) no comprimento de onda de 570nm. Os valores das absorbâncias de cada amostra foram submetidos a seguinte equação:

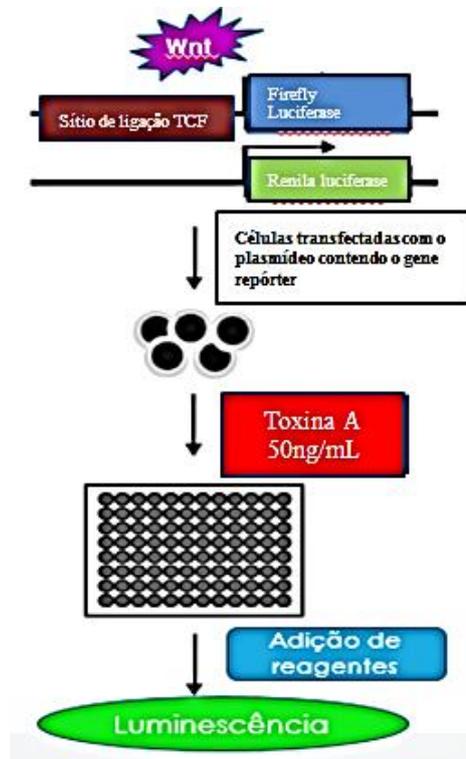
$$\%viabilidade\ celular = \frac{(Absorbância\ da\ amostra\ X\ 100)}{(Média\ das\ absorbâncias\ dos\ controles)}$$

4.10.2 Transfecção celular de plasmídeos e ensaio direto da ativação da via Wnt/ β -catenina

O ensaio de luciferase TOPFlash/FOPFlash foi realizado para mensurar de forma direta o papel de Rac1 nos efeitos da toxina A na via Wnt/ β -catenina. Conforme descrito por Korinek (1997), o TOP/Flash é um ensaio com um gene repórter sensível ao TCF/Lef que codifica a proteína luciferase (proteína

quimioluminescente oriunda de vagalumes) quando ocorre ativação transcripcional mediada pela β -catenina.

Figura 11: Ensaio de TOPFlash/FOPFlash.



Fonte: Adaptado Graci, 2017.

IEC-6 ($1,2 \times 10^4$ células/poço) foram plaqueadas (placa de 96 poços) e após 24 h foram transfectadas, adicionando 10 μ L da combinação de Lipofectamina 3000 (Invitrogen), reagente P300, meio sem soro e os plasmídeos: TOPFlash/FOPFlash (0,1 μ g/poço) ao qual é acoplado a uma região promotora com sítios de ligação ao TCF, de forma que quando a via Wnt/ β -catenina é ativada o complexo de transcrição β -catenina/TCF se forma e induz a expressão da enzima luciferase; 2) pRLTK, plasmídeo contendo o gene *Renilla* luciferase (CMV *Renilla* 0,01 μ g/poço) que é expresso constantemente, sendo utilizado como um indicador da eficiência da transfecção; 3) pcDNA3-EGFP-Rac1-wt(0,1 μ g/poço), utilizado para suprarregular a expressão intracelular de Rac1. Vale ressaltar que todos os grupos foram transfectados simultaneamente com TOPFlash/FOPFlash/ pRLTK/ pcDNA3-EGFP-Rac1-Q61L ou TOPFlash/FOPFlash/ pRLTK/ pcDNA3. Vale ressaltar que a eficiência da transfecção de Rac1 foi confirmada, visualizando as células em microscópio de imunofluorescência após a transfecção.

Após 18h, o meio contendo o reagente de transfecção foi retirado e as células foram incubadas com meio condicionado Wnt 50%, sintetizado conforme descrito por Lima *et al.* (2014) e toxina A (50 ng/mL) na presença ou ausência do meio condicionado Wnt3a 50%. Ao grupo controle, adicionou-se apenas meio de cultivo. Um grupo controle para o ensaio foi adicionado, o grupo L-cell, ao qual foi adicionado o meio de células L-cell não mutadas, incapazes de sintetizar em condições normais altas concentrações de Wnt.

Decorrido 24h de incubação, o ensaio de luciferase (Promega) foi realizado conforme descrito pelo fabricante. Resumidamente, removeu-se o meio das células, adicionaram-se 25 µL de tampão de lise (PLB 1x) e incubaram-se as células por 1h em -20°C. Posteriormente, as células foram descongeladas sob agitação por 10 min e as células foram removidas mecanicamente usando ponteiras de 200 µL. Em uma placa de 96 poços-Lumitrac-Platte com fundo branco, adicionou-se 10 µL de células lisadas e 30 µL de luciferase (1ng luciferase/15 µL tampão). Em seguida a luz emitida foi mensurada em leitor de luminescência. Imediatamente, realizou-se o mesmo procedimento após adicionar 30 µL de Renilla em cada poço. Os dados obtidos foram expressos como fração de intensidade da luciferase sobre a intensidade de Renilla, para que haja normalização do resultado obtido.

4.10.3 Imunofluorescência indireta

IEC-6 transfectadas (9×10^3 células por poço) em placas de 24 poços à temperatura de 37°C e 5% de CO₂. Lamínulas de 13 mm foram utilizadas como superfície para fixação de células, colocadas previamente na placa de cultura. Após 18h de transfecção as células foram incubadas por 24h com toxina A do *Clostridium difficile*, na presença ou ausência de meio condicionado com Wnt-3a. Decorrido este tempo, o meio foi removido e as células foram fixadas com 500µL de paraformaldeído (PFA) 4% por poço durante 30 minutos. Em seguida, 500µL de solução de bloqueio foi adicionado aos poços por 1h. Na etapa seguinte, as células foram incubadas overnight com o anticorpo primário para β-catenina (1:200 Abican) a 4°C e com o anticorpo secundário anti-rabbit (1:500 Alexa-Fluor 565 Thermo Fisher Scientific) diluído em solução de lavagem por 1h em temperatura ambiente. O núcleo das células foi corado com DAPI (1:2000) diluído em PBS 1x por 5 minutos. Todas as etapas foram intercaladas com lavagens sucessivas. Os preparados foram

observados em um microscópico confocal (LM710-Confocal-Zeiss), usando filtros seletivos para cada fluoróforo, as imagens foram capturadas com a câmara integrada e processador de imagem, usando um aumento de 400x. Para avaliar a presença de β -catenina no núcleo. (LIMA *et al* 2014).

4.10.4 Imunocitoquímica para Ki67

A imunocitoquímica para Ki67 foi realizada, conforme descrito anteriormente, por Tinoco *etal*(2017). Resumidamente, as células foram plaqueadas 3×10^4 por poço em uma placa de 24 poços. As culturas subconfluentes foram transfectadas com os plasmídeos pcDNA3-EGFP-Rac1-wt (0,5 μ g). Após 18h de transfecção, as células foram incubadas com toxina A na presença ou ausência de meio condicionado Wnt-3a. Após 24 horas de incubação, as células foram fixadas com paraformaldeído (PFA) 4% por 15 minutos e lavadas em PBS 1%. Em seguida, realizou-se a recuperação antigênica com citrato pH 6.0 (DAKO) por 30 minutos e o bloqueio da peroxidase endógena (DAKO) por 20 min. Na etapa seguinte, as células foram incubadas com o anticorpo primário anti-Ki67 (1:200 Abcam) por 20 minutos e com polímero HRP (DAKO) por 30 minutos, sendo reveladas com o cromogênio DAB (DAKO) e contra-coradas com hematoilina (DAKO). As lâminas foram retiradas e colocadas na lâmina com faramount (DAKO).

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

A análise estatística dos dados foi realizada por meio do software GraphPad Prism, versão 6.0. Para a realização da análise estatística entre os grupos foram utilizados os seguintes testes: o teste t de Student para comparar dois grupos e o teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni. O nível de significância adotado foi de 0,05 ($\alpha = 5\%$) e níveis descritivos (p) inferiores a esse valor foram considerados significantes.

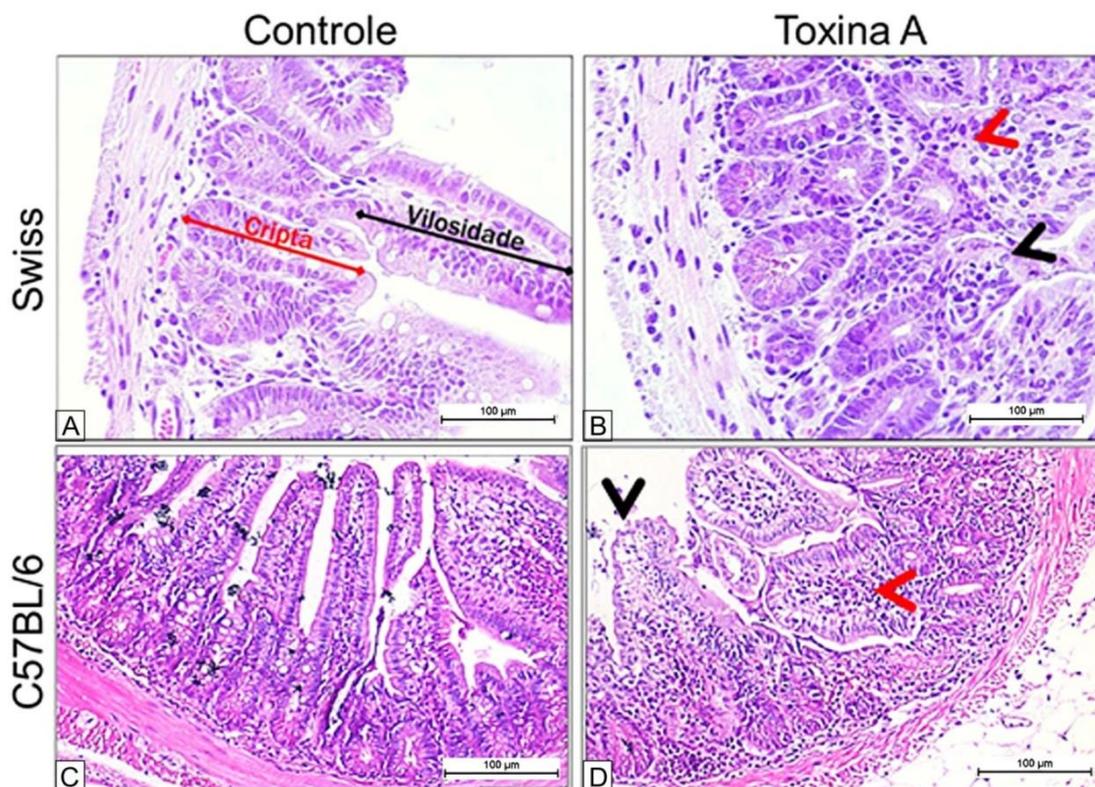
5. RESULTADOS

5.1 ALTERAÇÕES DE COMPONENTES DA VIA WNT/ β -CATENINA INDUZIDAS PELA TOXINA A DO CLOSTRIDIUM DIFFICILE NO ÍLEO DE CAMUNDONGOS

5.1.1 Alterações histológicas promovidas pela toxina A do *Clostridium difficile* no íleo de camundongos.

Sob condições normais, representadas nesse estudo pelo grupo controle, as vilosidades e as criptas intestinais apresentam-se íntegras. Ao injetar toxina A do *Clostridium difficile* no lúmen ileal de camundongos Swiss (50 μ g/alça) ou C57BL/6 (10 μ g/alça), observou-se acentuada destruição das vilosidades intestinais, redução das criptas intestinais e formação de intenso infiltrado de células inflamatórias (figura 12).

Figura 12: Alterações histológicas no íleo de camundongos submetidos à enterite induzida pela Toxina A do *Clostridium difficile*.



Fonte: Elaborado pela autora. Camundongos Swiss ou C57BL/6 foram submetidos à ligadura de alça ileal, onde foram injetados 200 μ l de tampão fosfato-salina (PBS, controle) ou de toxina A (10 ou 50

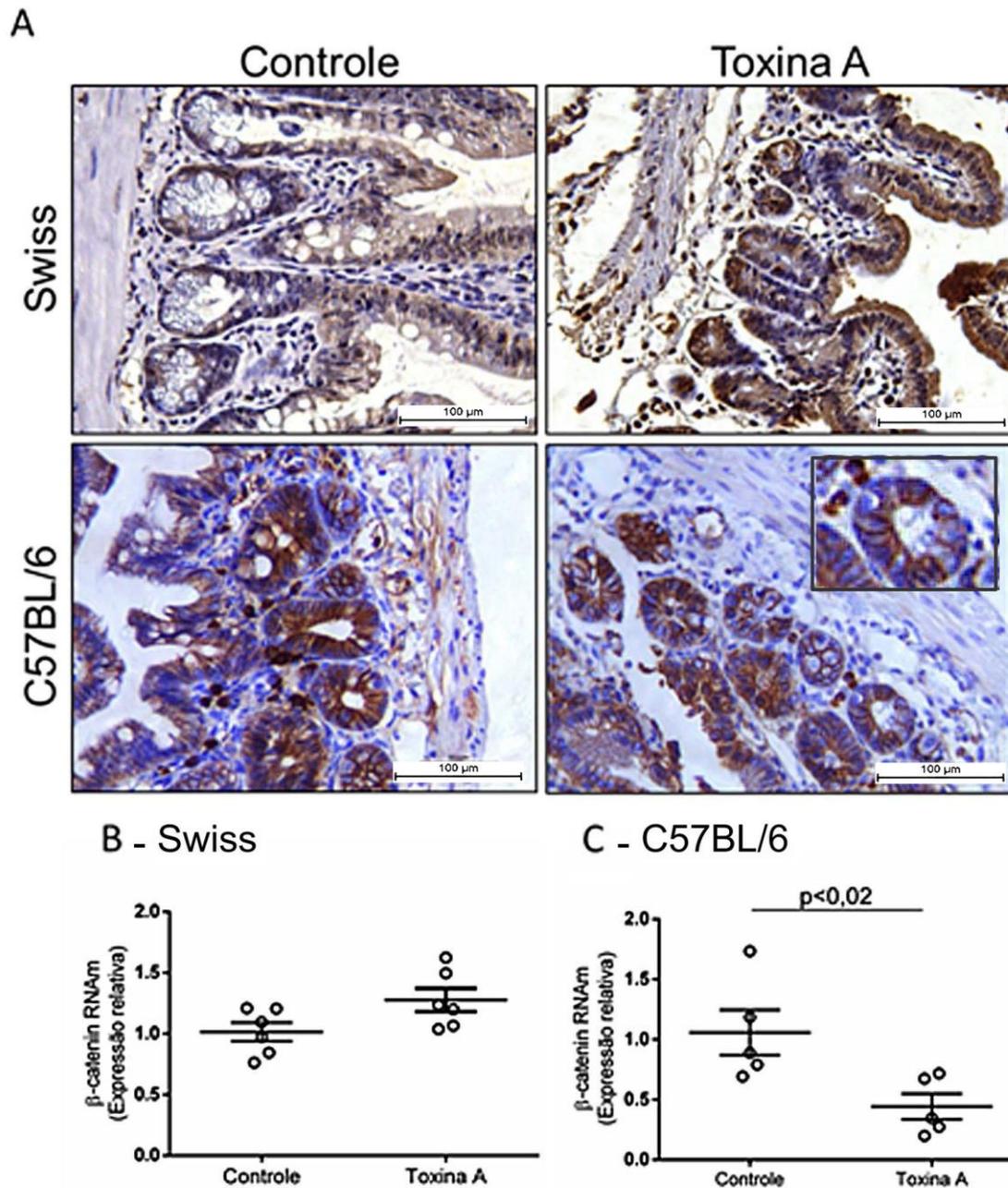
$\mu\text{g/alça}$) do *Clostridium difficile* os animais foram eutanasiados com cetamina e xilazina (240/15 mg/kg, i.p) 4h depois da injeção de toxina ou PBS e os segmentos do íleo foram coletados, processados e corados pelo método de hematoxilina e eosina (HE) para análise histopatológica. O grupo controle apresenta integridade das vilosidades e das criptas ileais. A administração de toxina A do *Clostridium difficile* promove destruição das vilosidades intestinais (seta preta) e formação de intenso infiltrado de células inflamatórias (seta vermelha). Barra = 100 μm .

5.1.2 Efeito da toxina A do *Clostridium difficile* na expressão de β -catenina no íleo de camundongos.

Ao realizar imunohistoquímica para β -catenina, observou-se que a toxina A do *Clostridium difficile* causa um aumento da imunomarcção para essa proteína no íleo de camundongos Swiss. No íleo de camundongos C57BL/6 não houve aumento de imunomarcção no citoplasma, notou-se porém, redução de sua imunomarcção no núcleo de células localizadas nas criptas e vilosidades quando comparados aos seus respectivos controles (figura 13 A).

Ao avaliar a expressão gênica de β -catenina, toxina A do *Clostridium difficile* não alterou a sua expressão no íleo de camundongos Swiss (Figura 13 B). Diferentemente do que foi observada nessa linhagem, essa toxina diminuiu ($p < 0,02$) a expressão gênica de β -catenina no íleo de camundongos C57BL/6 (Figura 13 C).

Figura 13: Efeito da toxina A do *Clostridium difficile* na imunomarcação e expressão gênica de β -catenina no óleo de camundongos.

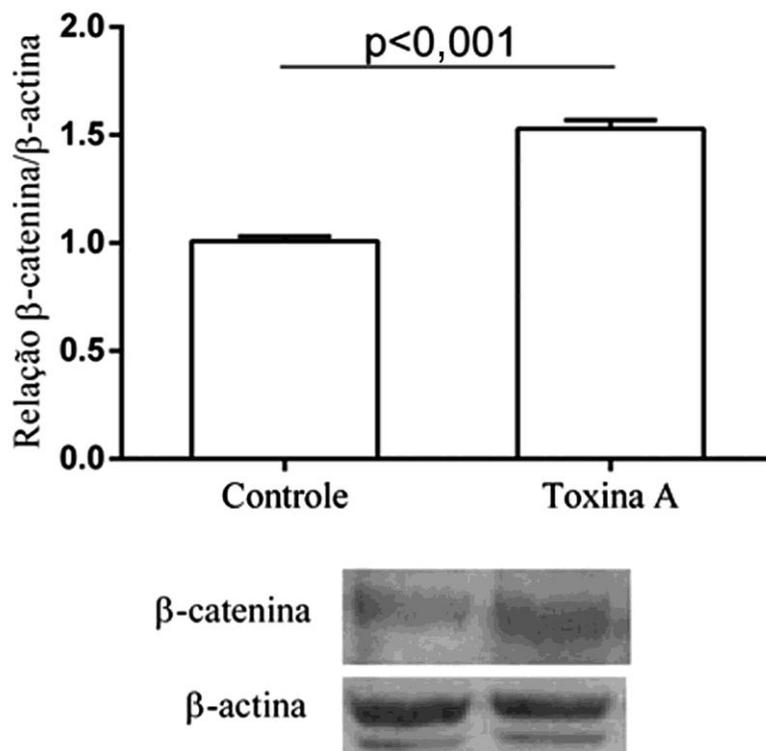


Fonte: Elaborado pela autora (A) Segmentos do óleo foram coletados e processados para a realização de imunohistoquímica para β -catenina. Observa-se que as células marcadas para essa proteína encontram-se principalmente nas criptas intestinais e vilosidades intestinais. Observa-se intensa imunomarcação para β -catenina em células da vilosidade e cripta  leal de camundongos Swiss submetidos à ileite induzida pela toxina A do *Clostridium difficile* quando comparado ao grupo controle. Nota-se ainda diminuição da imunomarcação para β -catenina núcleo das células da cripta  leal de camundongos C57BL/6 submetidos à ileite induzida pela toxina A do *Clostridium difficile* quando comparado ao grupo controle. Barra = 100 μ m. (B-C) Segmentos do óleo de camundongos

Swiss (B) e C57BL/6 (C) foram coletados para avaliar a expressão gênica de β -catenina por qPCR. Observa-se que a toxina A do *Clostridium difficile* não altera a expressão gênica de β -catenina no íleo de camundongos Swiss, porém reduz a sua expressão em camundongos C57BL/6 (C) quando comparado aos seus respectivos grupo controle. Os valores foram apresentados como média+ EPM da expressão gênica relativa de β -catenina. Utilizou-se GAPDH como gene de referência. Para análise estatística foi utilizado o teste t de Student. Barra 100 μ m.

Devido à elevada imunomarcação de β -catenina induzida pela toxina do *Clostridium difficile* no óleo de camundongos Swiss, realizou-se Western Blotting para avaliar a sua expressão proteica. Toxina A aumentou ($p < 0,001$) a sua expressão protéica no  leo desses camundongos comparado ao grupo controle (Figura 14).

Figura 14: Efeito da toxina A do *Clostridium difficile* na expressão proteica de β -catenina no óleo de camundongos Swiss.



Fonte: Elaborado pela autora. Segmentos do óleo de camundongos Swiss foram coletados e processados para realizar Western Blotting com o objetivo de mensurar a expressão proteica de β -catenina. Observa-se que a toxina A do *Clostridium difficile* eleva a expressão proteica de β -catenina no óleo de animais submetidos ao modelo de alça ileal quando comparado ao grupo controle. Os valores foram apresentados como média \pm EPM da expressão proteica de β -catenina que resultou da

relação da densidade de β -catenina e de β -actina. Para análise estatística foi utilizado o teste t de Student.

5.1.3 Efeito da toxina A do *Clostridium difficile* na expressão de genes alvos da via Wnt/ β -catenina no íleo de camundongos.

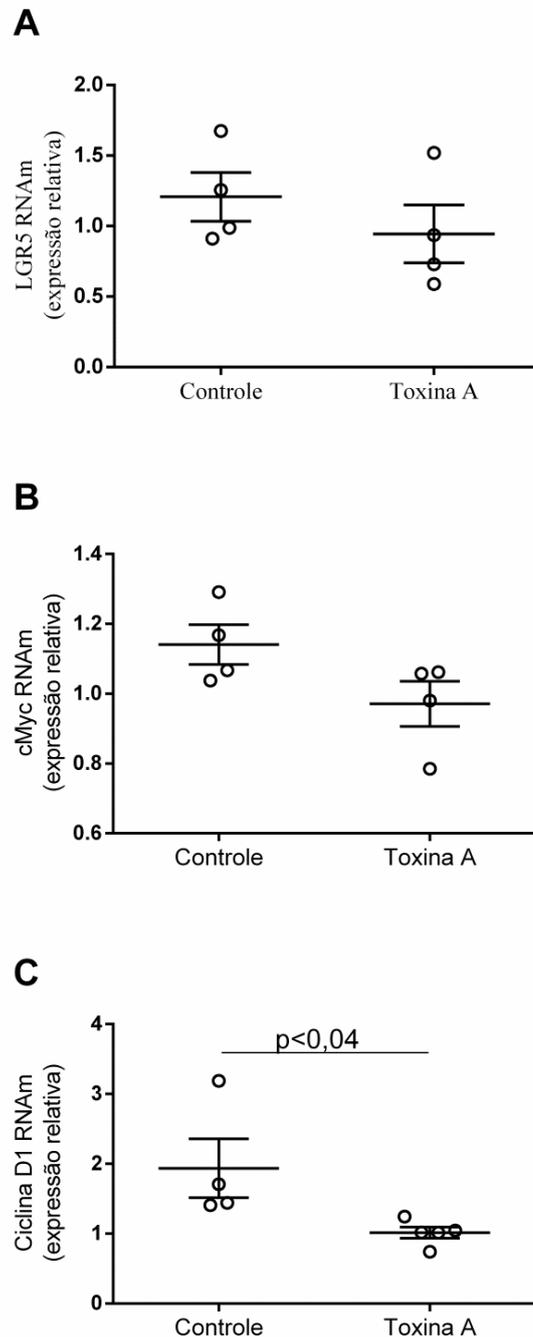
A ativação da via Wnt/ β -catenina, resulta na translocação de β -catenina para o núcleo com conseqüente transcrição de genes alvos dessa via como *LGR5*, *ciclina D1* e *cMYC* por meio de sua ligação ao TCF no núcleo. Devido a isso, para avaliar a ativação dessa via *in vivo*, avaliou-se a expressão gênica de genes alvos da via por qPCR.

Conforme observado na figura 15, a toxina A do *Clostridium difficile* reduziu ($p < 0,04$) a expressão gênica de ciclina D1 no íleo de camundongos Swiss submetidos à ileíte induzida por essa toxina quando comparado ao grupo controle. No entanto, a redução da expressão gênica de LGR5 (Figura 15 A) e cMYC (Figura 15C) pela toxina A do *Clostridium difficile* no íleo não foi significativa.

Conforme observado na figura 16, a toxina A do *Clostridium difficile* reduziu ($p < 0,02$) a expressão gênica de cMYC e aumentou a expressão gênica de LGR5 no íleo de camundongos C57BL/6 submetidos à ileíte induzida por essa toxina quando comparado ao grupo controle. Entretanto, a toxina não alterou a expressão gênica de ciclina D1 no íleo desses camundongos.

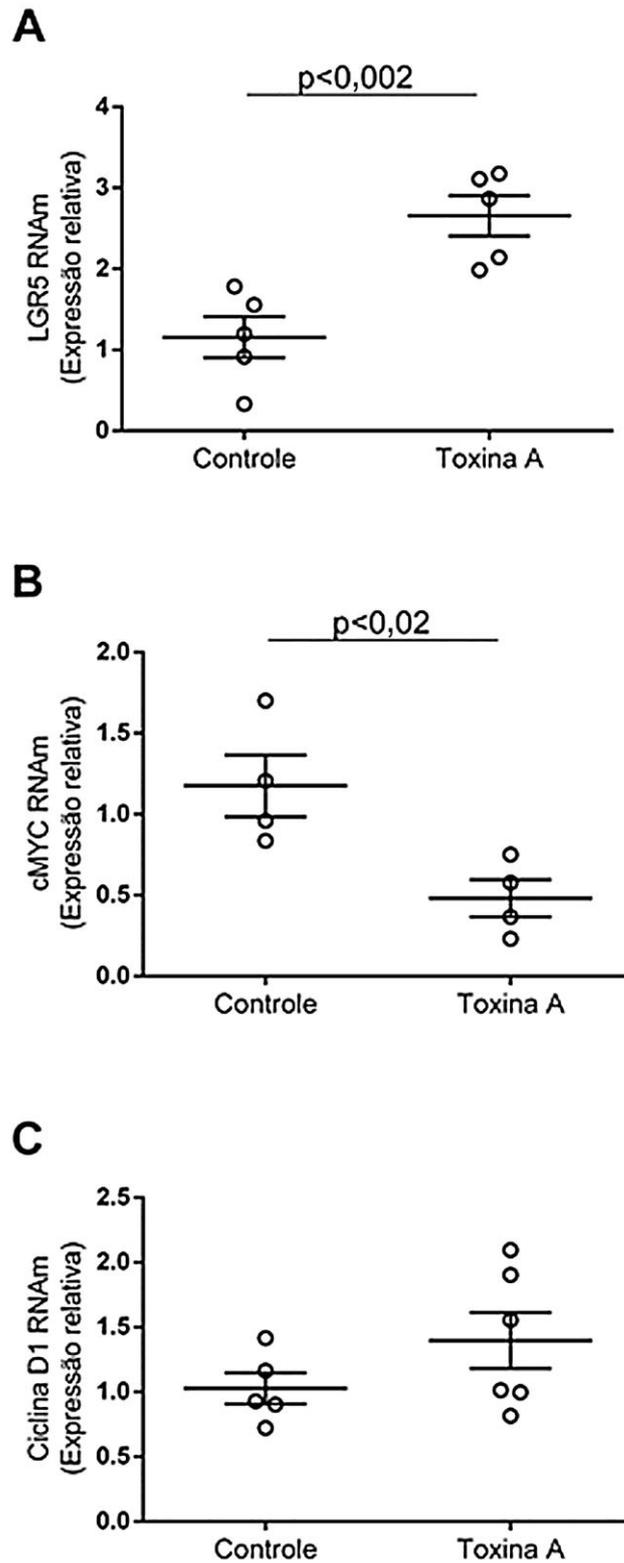
Esses dados sugerem que há uma redução da ativação de TCF pela β -catenina na enterite induzida pela toxina A do *Clostridium difficile* em modelo de alça ileal.

Figura 15: Efeito da toxina A do *Clostridium difficile* na expressão gênica de LGR5, cMYC e ciclina D1 no íleo de camundongos Swiss.



Fonte: Elaborado pela autora. Segmentos do íleo de camundongos Swiss foram coletados para avaliar a expressão gênica de LGR5, cMYC e ciclina D1 por RT-qPCR. Observa-se que a toxina A do *Clostridium difficile* reduz a expressão gênica de Ciclina D1 quando comparado ao grupo controle. Os valores foram apresentados como média+ EPM da expressão gênica relativa de LGR5, cMYC e ciclina D1. Utilizou-se GAPDH como gene de referência. Para análise estatística foi utilizado o teste t de Student.

Figura 16: Efeito da toxina A do *Clostridium difficile* na expressão gênica de LGR5, cMYC e ciclina D1 no íleo de camundongos C57BL/6.



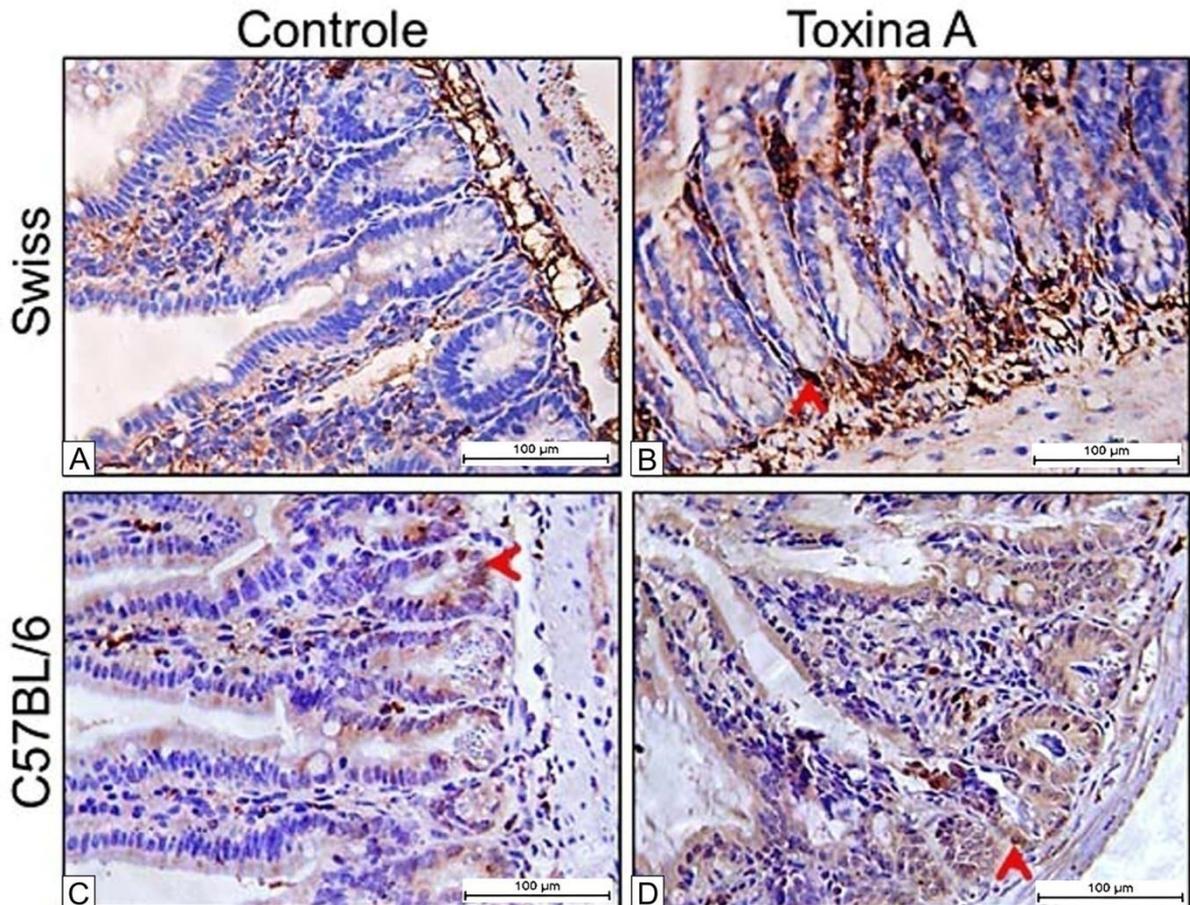
Fonte: Elaborado pela autora. Segmentos do íleo de camundongos C57BL/6 foram coletados para avaliar a expressão gênica de LGR5, cMYC e ciclina D1 por RT-qPCR. Observa-se que a toxina A do *Clostridium difficile* reduz a expressão gênica de cMYC quando comparado ao grupo controle. Os valores foram apresentados como média± EPM da expressão gênica relativa de LGR5, cMYC e ciclina D1. Utilizou-se Gapdh como gene de referência. Para análise estatística foi utilizado o teste t de Student.

5.1.4 Efeito da toxina A do *Clostridium difficile* na expressão de Wnt-3a no íleo de camundongos.

No intestino, agonistas endógenos da via Wnt/ β -catenina podem ser produzidos e liberados para ativar a via em condições fisiológicas. Wnt-3a é um dos agonistas sintetizados por células epiteliais intestinais. Para avaliar as alterações da expressão de Wnt-3a no íleo de camundongos (Swiss e C57BL/6) submetidos à ileíte induzida pela toxina A do *Clostridium difficile*, imunohistoquímica e RT-qPCR foram realizados.

De acordo com a figura 17, toxina A do *Clostridium difficile* aumenta a imunomarcção de Wnt-3a no íleo de camundongos Swiss e C57BL/6, comparado aos respectivos controles. Esse aumento de imunomarcção foi observado em células epiteliais das vilosidades e criptas intestinais, bem como em células da lâmina própria.

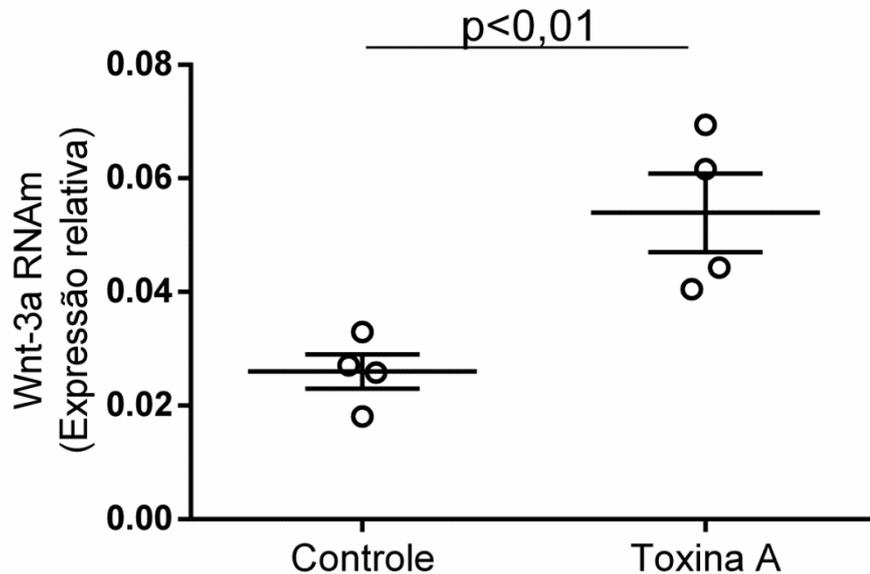
Figura 17: Efeito da toxina A do *Clostridium difficile* na imunomarcação de Wnt-3a no íleo de camundongos.



Fonte: Elaborado pela autora. Segmentos do íleo foram coletados e processados para a realização de imunohistoquímica para Wnt-3a. Observa-se que as células marcadas para essa proteína encontram-se principalmente na lâmina própria, mas também nas criptas intestinais e vilosidades intestinais. Observa-se intensa imunomarcação para Wnt-3a no íleo de camundongos Swiss e C57BL/6 submetidos à ileíte induzida pela toxina A do *Clostridium difficile* quando comparado ao grupo controle. A seta aponta para células positivas para Wnt-3a na cripta intestinal. Barra = 100 μm

Ao avaliar a expressão gênica de Wnt-3a, observou-se que toxina A eleva ($p < 0,01$) a expressão gênica de Wnt-3a no íleo de camundongos C57BL/6 comparado ao grupo controle (Figura 18).

Figura 18: Efeito da toxina A do *Clostridium difficile* na expressão gênica de Wnt-3a no íleo de camundongos C57BL/6.



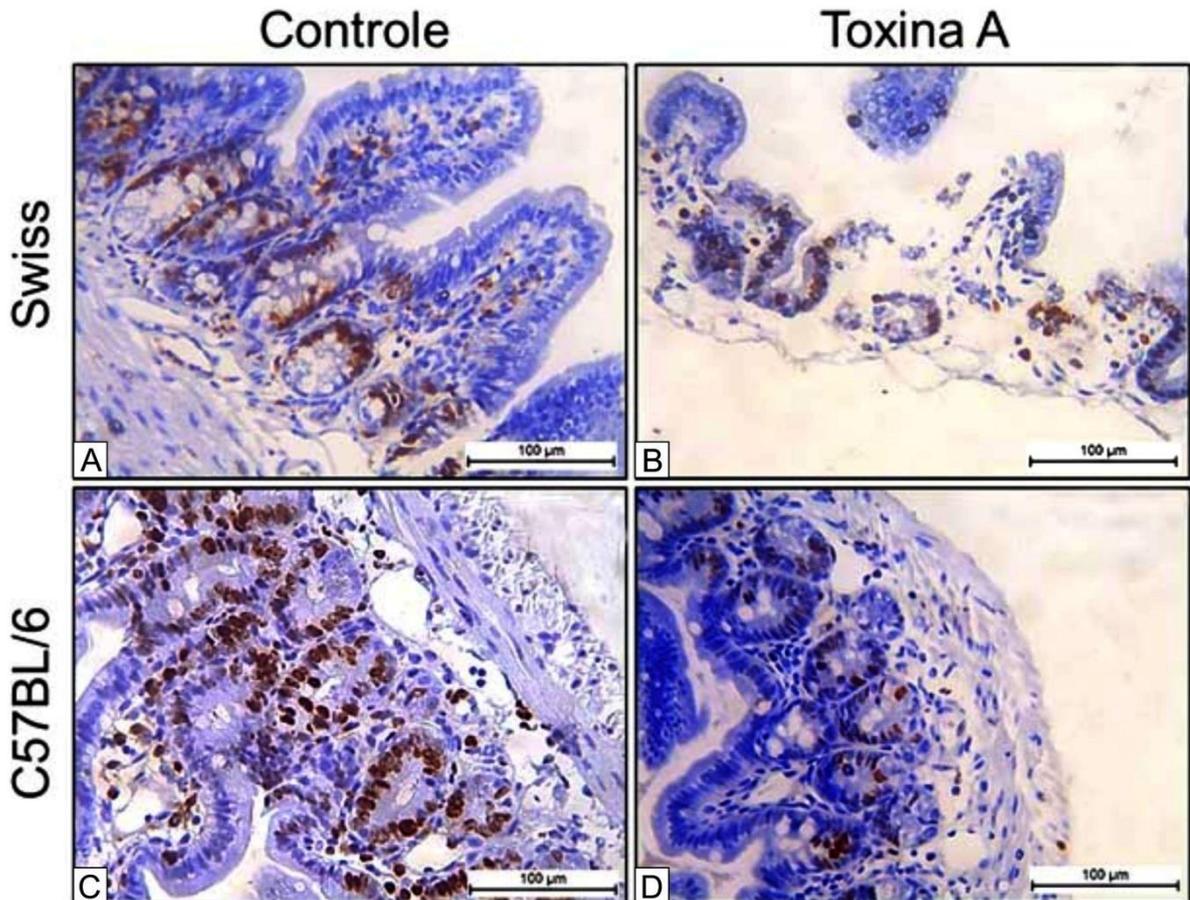
Fonte: Elaborado pela autora. Segmentos do íleo de camundongos C57BL/6 foram coletados para avaliar a expressão gênica de Wnt-3a por qPCR. Observa-se que a toxina A do *Clostridium difficile* aumenta a expressão gênica de Wnt-3a quando comparado ao grupo controle. Os valores foram apresentados como média ± EPM da expressão gênica relativa de Wnt-3a. Utilizou-se GAPDH como gene de referência. Para análise estatística foi utilizado o teste t de Student.

5.1.5 Efeito da toxina A do *Clostridium difficile* na proliferação de células epiteliais das criptas do íleo de camundongos.

Sabendo-se que a via Wnt/ β -catenina está envolvida na regulação da proliferação celular, avaliou-se o efeito da toxina A do *Clostridium difficile* na proliferação celular no íleo de camundongos Swiss e C57BL/6 por meio da imunomarcagem de Ki67 e ciclina D1, ambos expressos por células em proliferação.

Conforme apresentado na figura 19, observa-se um reduzido número de células positivas para Ki67 nas criptas do íleo de camundongos Swiss e C57BL/6 submetidos à íleite induzida pela toxina A do *Clostridium difficile*, comparado ao grupo controle.

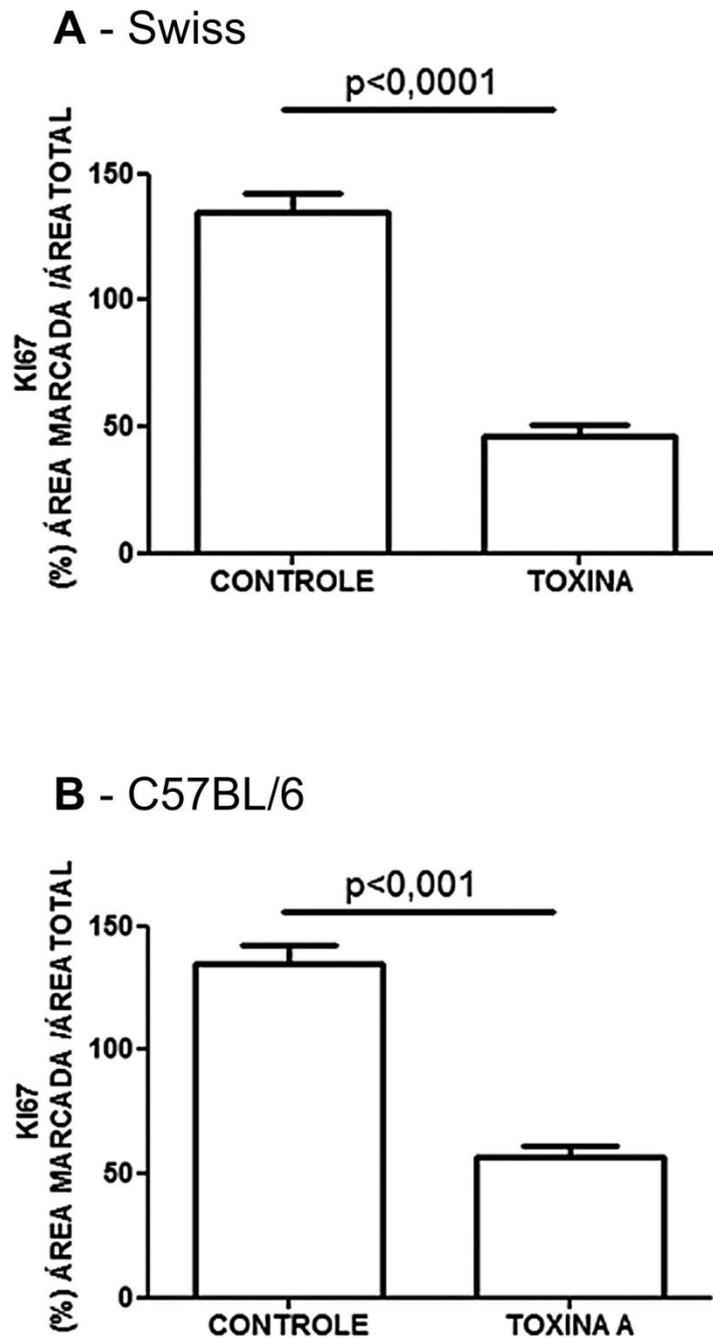
Figura 19: Efeito da toxina A do *Clostridium difficile* na imunomarcção de Ki67 no íleo de camundongos.



Fonte: Elaborado pela autora. Segmentos do íleo foram coletados e processados para a realização de imunohistoquímica para Ki67. Observa-se que as células marcadas para essa proteína encontram-se principalmente nas criptas intestinais. Observa-se redução da imunomarcção para Ki67 no íleo de camundongos Swiss e C57BL/6 submetidos à ileíte induzida pela toxina A do *Clostridium difficile* quando comparado ao grupo controle. Barra = 100 µm.

Ao mensurar o percentual de imunomarcção para Ki67, observou-se que toxina A do *Clostridium difficile* reduziu ($p < 0,0001$) a imunomarcção para essa proteína no íleo de camundongos Swiss e C57BL/6 submetidos à ileíte induzida pela toxina A do *Clostridium difficile* (Figura 20).

Figura 20: Toxina A do *Clostridium difficile* diminui a imunomarcção de Ki67 no íleo de camundongos Swiss e C57BL6.

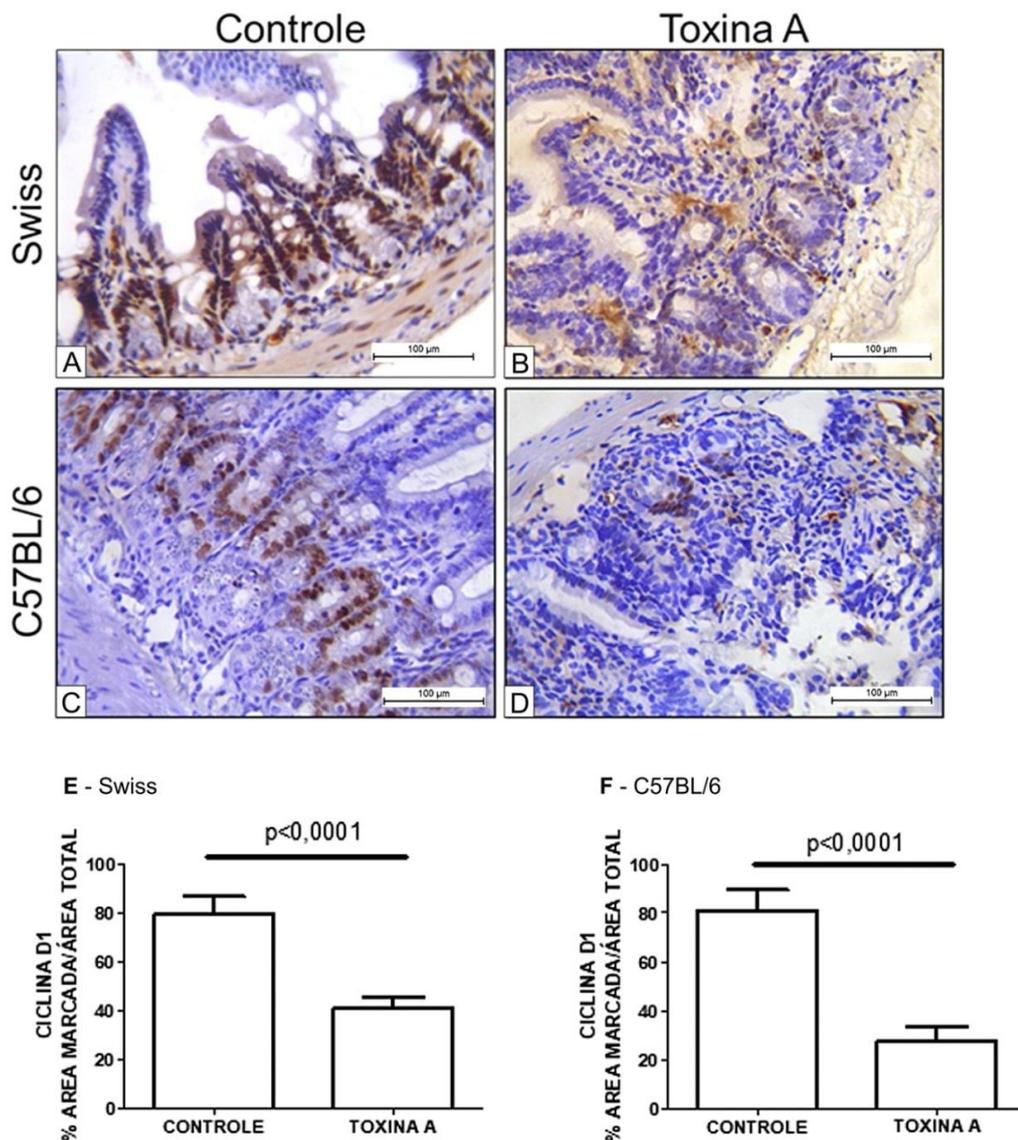


Fonte: Elaborado pela autora. Segmentos do íleo de camundongos Swiss foram coletados e processados para a realização de imunohistoquímica para Ki67. Foram obtidos de 6 a 8 campos/corte histológico. A área imunomarcada foi quantificada por meio do Software Adobe Photoshop. Observa-se que a toxina A do *Clostridium difficile* diminui o percentual da área imunomarcada para Ki67 no íleo desses camundongos comparado ao grupo controle (A, B). Os valores foram apresentados como

média± EPM da porcentagem da área imunomarcada para Ki67. Para análise estatística foi utilizado o teste t de Student.

Da mesma forma, observou-se que toxina A do *Clostridium difficile* diminuiu a imunomarcção de ciclina D1 nas criptas do íleo de camundongos Swiss e C57BL/6 comparado ao grupo controle. Ao mensurar o percentual de imunomarcção para Ciclina D1, observou-se que toxina A do *Clostridium difficile* reduziu ($p < 0,0001$ ou $p < 0,001$) a imunomarcção para essa proteína no íleo de camundongos Swiss e C57BL6 submetidos à ileíte induzida pela toxina A do *Clostridium difficile* (E,F) (Figura 21).

Figura 21: Efeito da toxina A do *Clostridium difficile* na imunomarcção de ciclina D1 no íleo de camundongos.



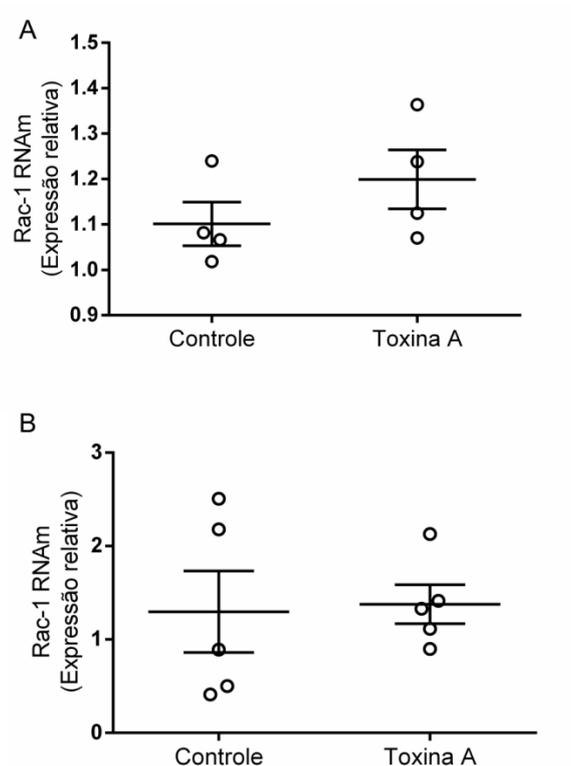
Fonte: Elaborado pela autora. Segmentos do íleo foram coletados e processados para a realização de imunohistoquímica para ciclina D1. Observa-se que as células marcadas para essa proteína encontram-se principalmente nas criptas intestinais. Observa-se redução da imunomarcagem para ciclina D1 no íleo de camundongos Swiss e C57BL/6 submetidos à ileíte induzida pela toxina A do *Clostridium difficile* quando comparado ao grupo controle. Barra = 100 μ m. Os valores foram apresentados como média \pm EPM da porcentagem da área imunomarcada para Cicina D1 (E e F). Para análise estatística foi utilizado o teste t de Student

5.1.6 Efeito da toxina A do *Clostridium difficile* na expressão de Rac1 no íleo de camundongos.

Rac1 tem importante participação na via Wnt/ β -catenina devido a sua capacidade de estimular a translocação de β -catenina para o núcleo. Portanto, investigou-se se a sua expressão é alterada pela toxina A do *Clostridium difficile* no íleo de camundongos, uma vez que essa toxina inibe a sua atividade.

De acordo com a figura 22, toxina A não altera a expressão gênica de Rac1 no íleo de camundongos Swiss e C57BL/6.

Figura 22: Efeito da toxina A do *Clostridium difficile* na expressão gênica de Rac1 no íleo de camundongos.



Fonte: Elaborado pela autora. Segmentos do íleo de camundongos Swiss (A) e C57BL/6 (B) foram coletados para avaliar a expressão gênica de Rac1 por qPCR. Observa-se que a toxina A do *Clostridium difficile* não altera a expressão gênica de Rac1 no íleo de camundongos Swiss (A) e C57BL/6 (B). Os valores foram apresentados como média± EPM da expressão gênica relativa de Rac1. Utilizou-se Gapdh como gene de referência. Para análise estatística foi utilizado o teste t de Student.

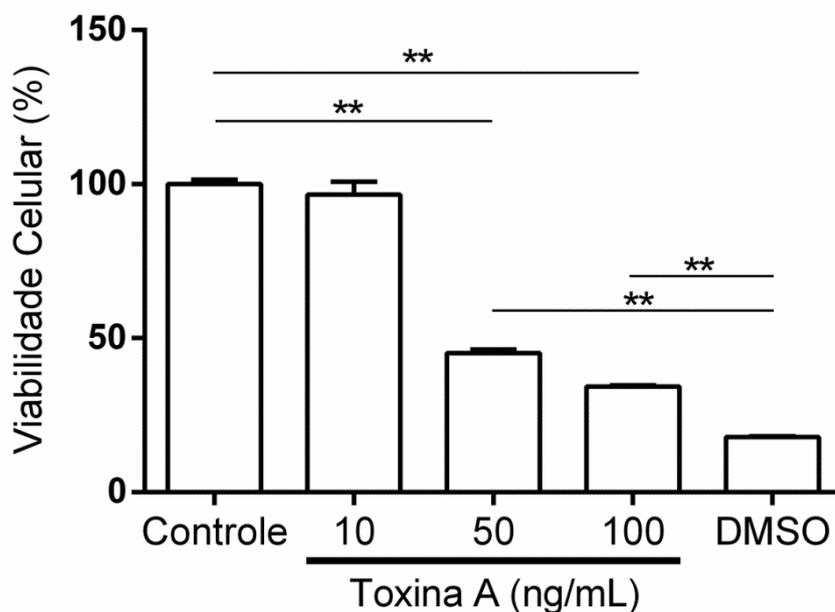
5.2 PAPEL DO RAC-1 NA INIBIÇÃO DA VIA WNT/ β -CATENINA PELA TOXINA A DO *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* EM CÉLULAS EPITELIAIS INTESTINAIS (IEC-6)

5.2.1 Efeito da toxina A do *Clostridium difficile* na viabilidade de IEC-6

Primeiramente, avaliou-se a viabilidade por meio do teste de MTT para determinar a melhor concentração de toxina A ser utilizada nos demais parâmetros deste estudo. Partindo de concentrações já utilizadas por estudos anteriores (TINOCO-VERAS *et al.*, 2017; LIMA *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2013; BRITO *et al.*, 2005), observou-se que as concentrações de 50 e 100 ng/mL reduzem ($p < 0,0001$) o percentual de viabilidade celular em torno de 55 e 66% respectivamente comparada ao grupo controle. Ambas as concentrações foram estatisticamente diferentes do controle positivo de morte (DMSO), indicando que uma dessas concentrações pode ser utilizada para a avaliação dos demais parâmetros (Figura 23).

Dessa forma, optou-se pela concentração de 50 ng/mL da toxina A do *Clostridium difficile* para avaliar os demais parâmetros.

Figura 23: Toxina A do *Clostridium difficile* reduz a viabilidade de IEC-6 de forma dose-dependente.

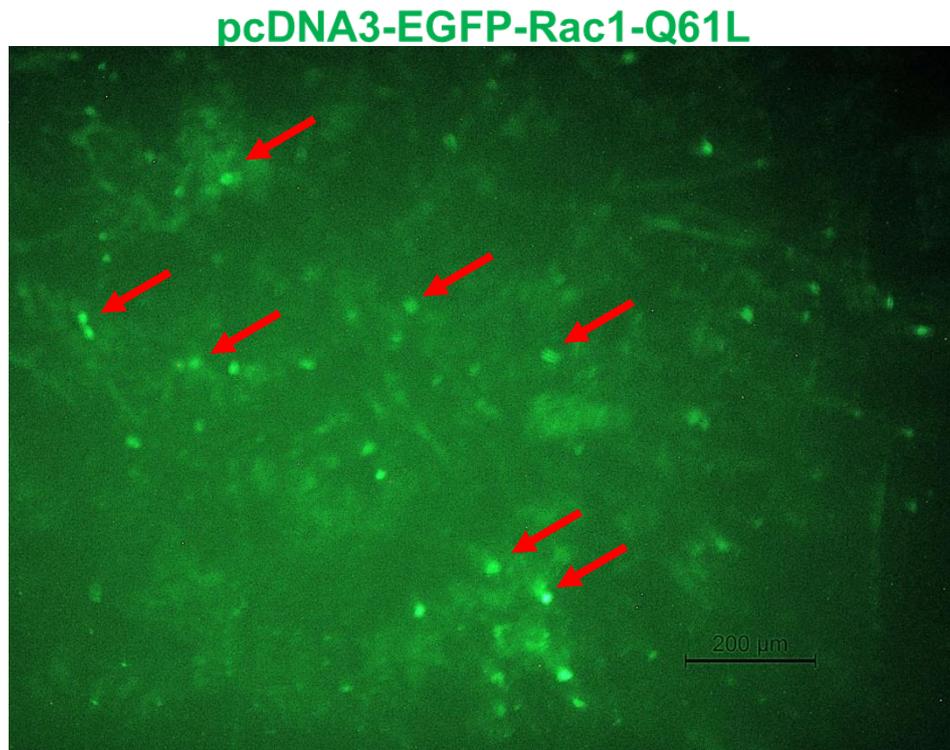


Fonte: Elaborado pela autora. IEC-6 (10^4 células/poço) foram incubadas com toxina A do *Clostridium difficile* (10, 50 ou 100 ng/mL) por 24h. Decorrido este tempo a viabilidade das células foram avaliadas por meio do ensaio de MTT. DMSO foi utilizado como controle positivo de morte celular. Os valores foram apresentados como \pm EPM do percentual de viabilidade celular. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni (** $p < 0,0001$).

5.2.2 Efeito da transfecção de IEC-6 com pcDNA3-EGFP-Rac1-Q61L na modulação da via Wnt/ β -catenina em células expostas a toxina A do *Clostridium difficile*

Para avaliar se Rac1 está envolvido na inibição da ativação da via Wnt/ β -catenina pela toxina A do *Clostridium difficile* em IEC-6, as células foram transfectadas com o plasmídeo pcDNA3-EGFP-Rac1-wt para suprarregular a expressão de Rac1, uma vez que essa toxina inibe a atividade de Rac1. Conforme apresentado na figura 24, IEC-6 foram transfectadas com o plasmídeo de RAC-1 com êxito.

Figura 24: IEC-6 transfectadas com o plasmídeo pcDNA3-EGFP-Rac1-Q61L.



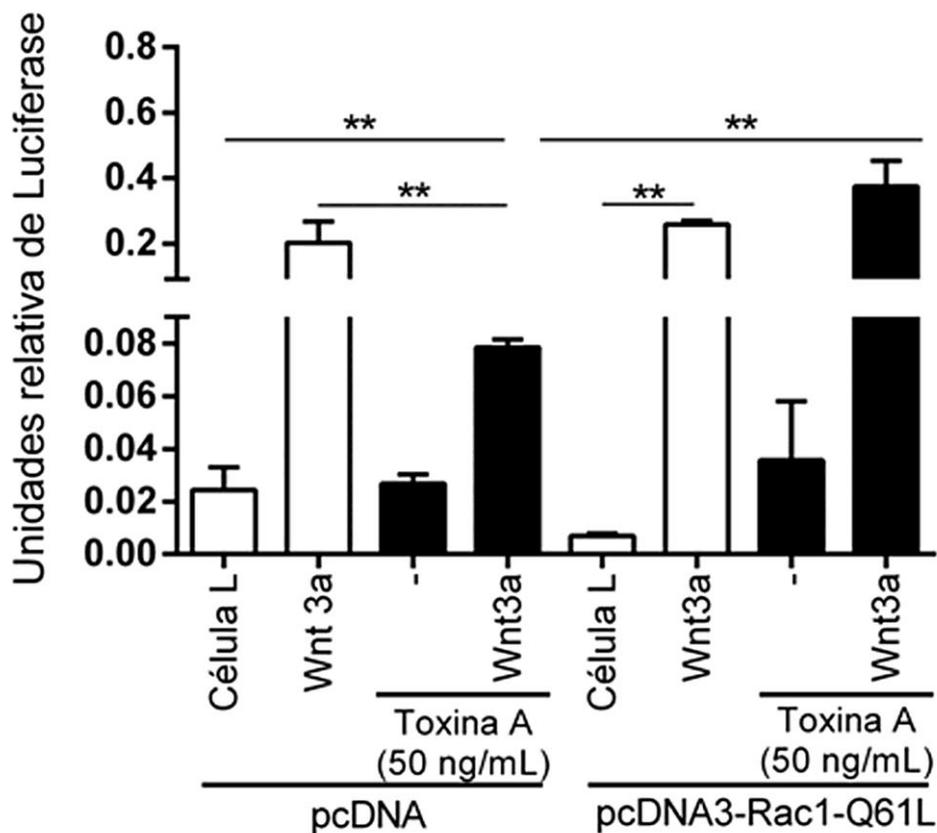
Fonte: Elaborado pela autora. IEC-6 foram transfectadas com pcDNA3-EGFP-Rac1-Q61L. Após 18h, a imagem das células contendo os plasmídeo (verde) foi adquirida em microscópio de imunofluorescência.

Confirmada a transfecção, realizou-se o ensaio de ensaio de luciferase TOP/FOP/Flash para avaliar diretamente a ativação da via Wnt/ β -catenina. Conforme apresentado na figura 25, em células transfectadas apenas com o vetor pcDNA3, o meio condicionado com Wnt-3a aumentou ($p < 0,0001$) a ativação da via canônica de Wnt/ β -catenina, comparada às células incubadas com o meio de Células L não mutadas, ao passo que toxina A do *Clostridium difficile* reduziu ($p < 0,0001$) consideravelmente a ativação dessa via por Wnt3a comparado ao grupo incubado apenas com o meio condicionado.

Ao transfectar IEC-6 com o plasmídeo pcDNA3-EGFP-Rac1-Q61L, observou-se que a suprarregulação de Rac-1 mediada por esse plasmídeo reverteu a inibição da via Wnt/ β -catenina induzida pela toxina A do *Clostridium difficile*, uma vez que não houve diferença estatística entre as células incubadas com o meio condicionado com Wnt3a na ausência ou presença de toxina A (Figura 25). Vale ressaltar que apenas a toxina A ou a transfecção do plasmídeo pcDNA3-EGFP-Rac1-wt na ausência do meio condicionado com Wnt-3a não foram capazes de

ativar a via Wnt/ β -catenina (Figura 25). Devido a isso, os demais parâmetros desse estudo foram realizados com meio condicionado com Wnt-3a.

Figura 25: Transfecção de IEC-6 com o plasmídeo pcDNA3-EGFP-Rac1-Q61L, na presença de agonista da via, reverte a inibição da via Wnt/ β -catenina induzida pela toxina A do *Clostridium difficile*.

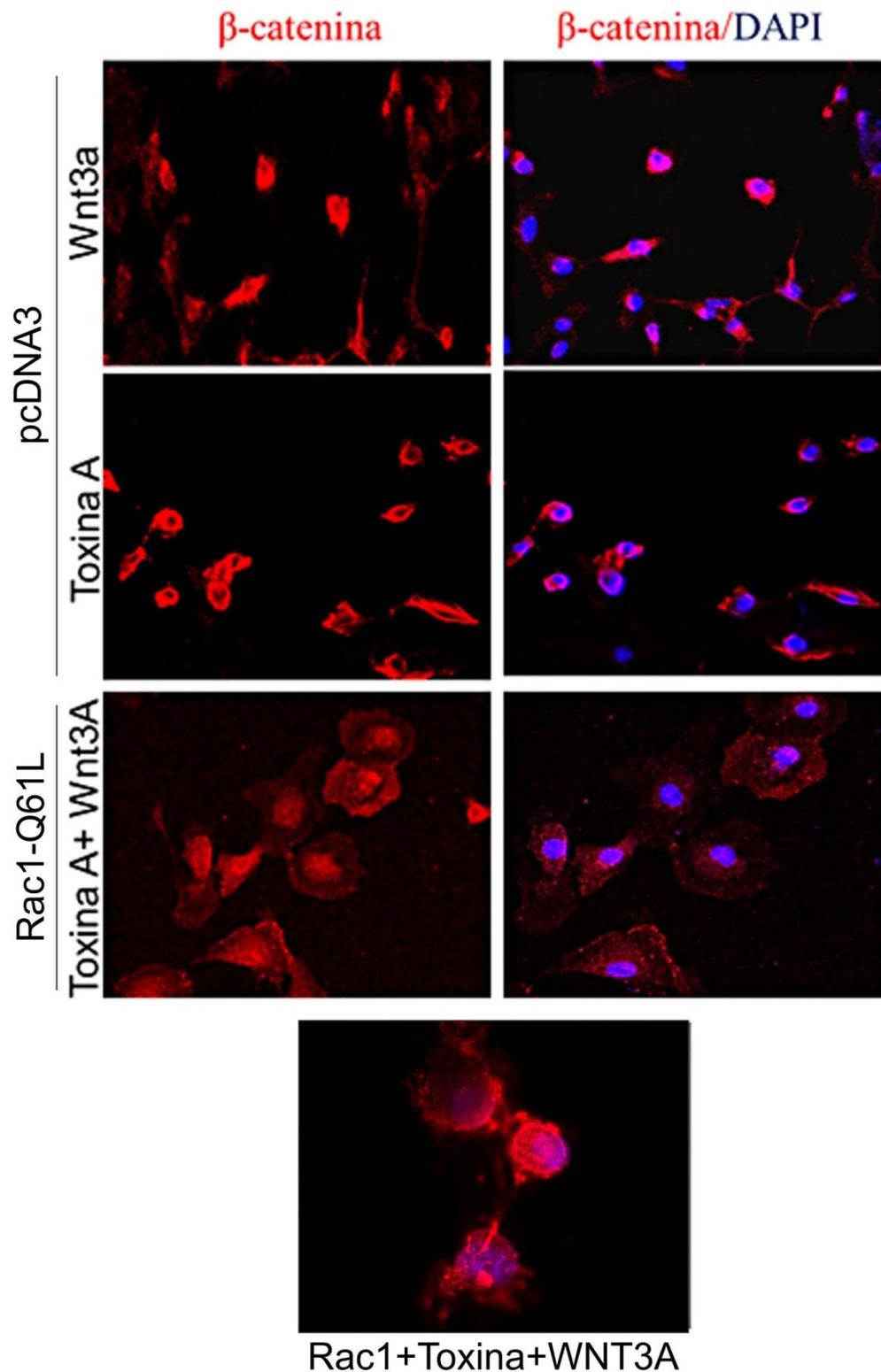


Fonte: Elaborado pela autora. IEC-6 ($1,2 \times 10^4$ células/poço) foram transfetados simultaneamente com TOPFlash/FOPFlash/ pRLTK/ pcDNA3-EGFP-Rac1-Q61L ou TOPFlash/FOPFlash/ pRLTK/ pcDNA3. Após 18h de transfecção, as células foram incubadas com meio de células L não mutadas ou meio condicionado com Wnt3a, na presença ou ausência de toxina A (50 ng/mL) de *Clostridium difficile*. Após 24h de incubação, realizou-se o ensaio de luciferase TOP/FOP/Flash. Os valores foram apresentados como \pm EPM da unidade relativa de luciferase. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni (** $p < 0,0001$).

5.2.3 Efeito da transfecção de IEC-6 com pcDNA3-EGFP-Rac1-Q61L na translocação nuclear de β -catenina em células expostas a toxina A do *Clostridium difficile*

Para verificar se a transfecção do plasmídeo pcDNA3-EGFP-Rac1-Q61L na presença do meio condicionado com Wnt3a aumentou a translocação nuclear de β -catenina na IEC-6 expostas a toxina A do *Clostridium difficile*, realizou-se a imunofluorescência para β -catenina para verificar a sua localização celular. Conforme apresentado na figura 26, em IEC-6 transfectadas com pcDNA3-EGFP-Rac1-Q61L, observa-se que na presença apenas do meio condicionado com Wnt3a há uma elevada expressão de β -catenina no núcleo dessas células. No entanto, ao incubar apenas com a toxina A do *Clostridium difficile*, na maioria das células não foi observado β -catenina no núcleo, sendo esse efeito revertido, pela incubação com o meio condicionado com Wnt-3a e transfecção com pcDNA3-EGFP-Rac1-Q61L simultâneos.

Figura 26: Transfecção de IEC-6 com o plasmídeo pcDNA3-EGFP-Rac1-Q61L, na presença de Wnt-3a, reverte a inibição da translocação nuclear de β -catenina induzida pela toxina A do *Clostridium difficile*.



Fonte: Elaborado pela autora. Microscopia confocal por imunofluorescência de células IEC-6 transfectadas com pcDNA3-EGFP-Rac1-Q61L incubadas com meio condicionado Wnt3a ou meio de

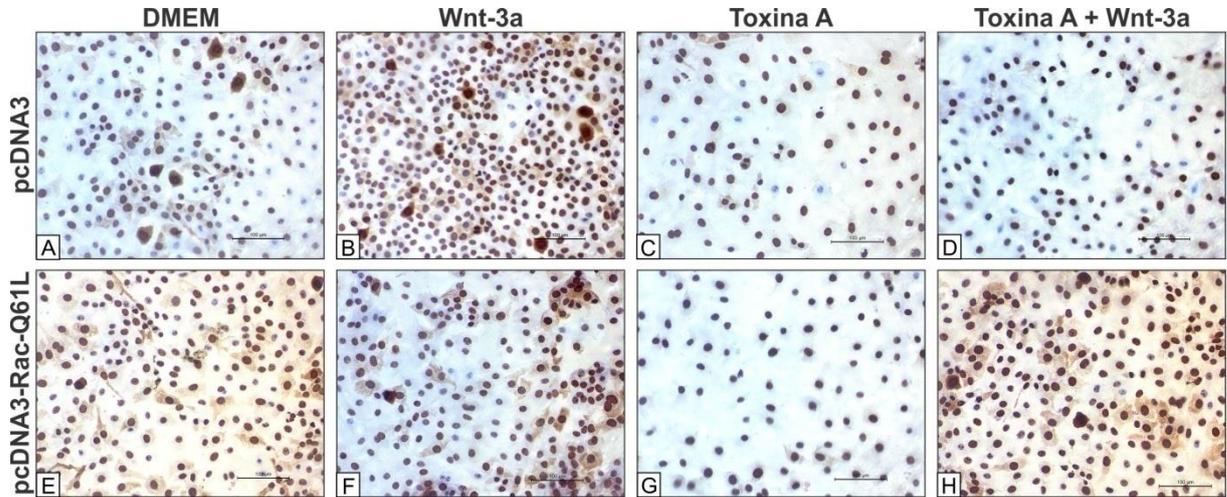
células L não mutadas na presença ou ausência de toxina A (50 ng/mL) do *Clostridium difficile*. O sinal de β -catenina é vermelho enquanto o núcleo é corado em azul por DAPI. Todos os painéis, exceto o último painel (1000x) isolado, foram obtido na magnificação de 400x. A última fotomicrografia (3D) mostra a presença de β -catenina no núcleo de células transfectadas com o plasmídeo pcDNA3-EGFP-Rac1-Q61L e incubadas com Wnt-3a e toxina A.

5.2.4 Efeito da transfecção de IEC-6 com pcDNA3-EGFP-Rac1-Q61L na proliferação de IEC-6 expostas a toxina A do *Clostridium difficile*

Para verificar se a transfecção do plasmídeo pcDNA3-EGFP-Rac1-Q61L, na presença do meio condicionado com Wnt3a, é capaz de aumentar a proliferação de células IEC-6 expostas a toxina A do *Clostridium difficile*, realizou-se a imunocitoquímica para Ki67, uma proteína expressa no núcleo de células em proliferação.

Conforme apresentado na figura 27, observou-se que o meio condicionado com Wnt-3a aumentou o número de células positivas para Ki67 (letra B, F), na presença ou ausência do plasmídeo pcDNA3-EGFP-Rac1-Q61L, comparado aos grupos transfectados apenas com pcDNA3 ou pcDNA3-EGFP-Rac1-Q61L. Comparado a estes grupos, notou-se ainda que a toxina A do *Clostridium difficile* diminuiu a imunomarcagem de Ki67 em IEC-6 (letra C,G), na presença ou ausência do plasmídeo pcDNA3-EGFP-Rac1-Q61L. No entanto, a transfecção de pcDNA3-EGFP-Rac1-Q61L foi capaz de reverter os efeitos da toxina A do *Clostridium difficile* na presença do meio condicionado com Wnt3a (letra H).

Figura 27: Transfecção de IEC-6 com o plasmídeo pcDNA3-EGFP-Rac1-Q61L, na presença de Wnt-3a, reverte a inibição da proliferação celular induzida pela toxina A do *Clostridium difficile*.



Fonte: Elaborado pela autora. Células IEC-6 transfetadas com pcDNA3-EGFP-Rac1-Q61L incubadas com meio condicionado Wnt3a ou meio de células L não mutadas, na presença ou ausência de toxina A (50 ng/mL) do *Clostridium difficile* por 24h, foram processadas para a realização de imunocitoquímica de Ki67. Barra representa 100 μ m.

6. DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostram que a toxina A do *Clostridium difficile* é capaz de alterar distintamente a expressão de componentes da via Wnt/ β -catenina em camundongos de diferentes linhagens (Swiss e C57BL/6), afetando principalmente a translocação nuclear de β -catenina e a expressão de genes envolvidos na proliferação celular. Em adição, evidenciou-se que a expressão aumentada de Rac1 na presença de agonista endógeno é capaz de reverter à inibição da via Wnt/ β -catenina e proliferação celular induzida por essa toxina *in vitro*.

A literatura vem mostrando que a toxina A do *Clostridium difficile* inibe a migração e proliferação de células epiteliais intestinais, que são importantes para manutenção e reparo da barreira epitelial intestinal (BRITO *et al.*, 2005; LICA *et al.*, 2011), porém o mecanismo envolvido nessa inibição não havia sido explorado até o trabalho de Lima e colaboradores (2014) que mostrou que toxina A do *Clostridium difficile* inibia a via do Wnt- β -catenina.

Vias de sinalização como Wnt/ β -catenina, Notch, proteínas associadas à Hippo/Yap e fator de crescimento de transformação- β (TGF- β) estão envolvidos na regeneração epitelial (JOHNSON; HALDER, 2013; BADDOUR; SOUSOUNIS; TSONIS, 2012). A ativação da via de Wnt/ β -catenina é imprescindível para a renovação do epitélio colônico (HUMPHRIES e WRIGHT, 2008). A renovação do epitélio intestinal depende de células progenitoras que residem na base das criptas colônicas e que, posteriormente, irão se diferenciar em colonócitos maduros. Para que ocorra proliferação dessas células, a via de Wnt/ β -catenina precisa estar ativada, levando ao aumento da expressão de moléculas-chave do ciclo celular, como ciclina D1 e c-MYC (BARKER; CLEVERS, 2006; HUMPHRIES; WRIGHT, 2008).

Dentre as vias de sinalização envolvidas na proliferação e regeneração epitelial, Lima e colaboradores (2014) demonstrou que a toxina A do *Clostridium difficile* inibe a via Wnt/ β -catenina mesmo na presença de ativadores como Wnt-3a; cloreto de lítio (inibidor de GSK-3 β); ou inibidor inespecífico de caspase (z-VAD-fmk). Esse estudo demonstrou que a inibição ocorre tanto em uma linhagem não neoplásica de células epiteliais intestinais de rato (IEC-6) como em uma linhagem celular neoplásica intestinal humana (RKO). Esse dado foi mostrado pelo ensaio do TCF repórter e confirmado pela imunofluorescência com ausência de

imunomarcagem para β -catenina no núcleo das células IEC-6, na presença de toxina A. Neste artigo também foi demonstrado, por Western blotting, que a toxina A causa diminuição de β -catenina e *c-Myc* (gene alvo da via do Wnt). Além disso, este trabalho demonstrou que toxina A continua inibindo a via do Wnt- β -catenin mesmo na presença de um inibidor inespecífico de caspase (z-VAD-fmk), sugerindo que esse efeito é independente de caspases e não decorre do processo de morte celular. Além do mais, a toxina A inibiu a via do Wnt/ β -catenin na presença de β -catenina constitutivamente ativa, sugerindo que a inibição poderia estar ligada a translocação dessa proteína para o núcleo, na qual as Rho GTPases principalmente Rac-1 tem um papel fundamental (HUANG e HE, 2008; WU *et al.*, 2008).

Sabendo-se da importância de Rac1 para a ativação da via Wnt/ β -catenina e que a transfecção de células epiteliais intestinais com Rac1 constitutivo preveniu os efeitos citopáticos induzidos pela toxina B do *Clostridium difficile* (HALABI-CABEZON *et al.*, 2008), investigou-se se Rac1 está envolvido na inibição dessa via pela toxina A do *Clostridium difficile in vitro*.

Interessantemente, encontrou-se que apenas a transfecção de células epiteliais intestinais com Rac1 constitutivo, pcDNA3-EGFP- Rac1-Q61L, não foi capaz de ativar a via Wnt/ β -catenina e nem estimular a proliferação celular, ambos inibidos pela toxina A do *Clostridium difficile*. No entanto, na presença de Wnt-3a, a transfecção de células epiteliais intestinais de rato (IEC-6) com Rac1 constitutivo, pcDNA3-EGFP- Rac1-Q61L Rac1 reverteu os efeitos inibitórios dessa toxina na via Wnt/ β -catenina, conforme demonstrado pelo ensaio do TCF reporter. Observou-se na imunofluorescência, que na presença do Rac1 constitutivo, quando a via foi estimulada por Wnt3a, houve translocação e β -catenina para o núcleo e proliferação celular mesmo na presença de toxina A. Esse dado mostra claramente que o efeito inibidor da toxina A sobre a via do Wnt/ β -catenina é mediada por sua ação inibidora de Rac-1. Similares resultados foram evidenciados em cultura de células embriogênicas renais, HEK 293, onde foi investigado o mecanismo pelo qual Rac1 estimula a interação β -catenina/TCF (JAMIESON *et al.*, 2015).

Segundo dado da literatura, toxina B mostrou inibe a via Wnt/ β -catenina por ligar-se ao receptor Frizzled-7 (FZD-7) no epitélio colônico. A toxina B se liga ao sítio de ligação do Wnt, conhecido como domínio rico em cisteína (CRD), com uma grande afinidade para FZD 1, 2 e 7. Além de se ligar a esse receptor,

impedindo a ligação de ativadores da via, como Wnt-3a, essa toxina mostrou utilizá-lo como meio para ser internalizada dentro dessas células (TAO *et al.*, 2016). Diferente da toxina B, toxina A não tem apresentado afinidade por FZD-7, ou outros receptores dessa família, como FZD-1 ou FZD-2 (GUPTA *et al.*, 2017).

Além de participar da translocação de β -catenina para o núcleo, dados da literatura mostram que em células de carcinoma de cólon humano que possuem a via de Wnt constitutivamente ativada, o uso de dominante negativo de Rac1 inibe a transcrição dos genes alvo de β -catenina (ESUFALI e BAPAT, 2004) e a inibição de um regulador negativo de Rac1 (RacGAP50C) promoveu a sinalização canônica de Wnt em embriões de *Drosophila* (JONES e BEJSOVEC, 2005). Em outro estudo realizado com *Drosophilas*, Rac1 foi suficiente para estimular a proliferação e regeneração de células tronco intestinais dependente de espécies reativas de oxigênio (MYANT *et al.*, 2013). Ademais, sabe-se que a ativação de JNK mediada por Rac1 culmina com fosforilação e translocação de β -catenina para o núcleo (WU *et al.*, 2008). Wnt-3a (ligante da via de Wnt) foi descrito por promover a ligação de Rac1 ao GTP e, após ativação da via pelo ligante, Tiam1 (regulador positivo de Rac1) foi encontrada coprecipitada com β -catenina (BUONGIORNO *et al.*, 2008). DOCK4, regulador negativo de Rac1, foi observado como um dos integrantes do complexo de destruição de β -catenina (UPADHYAY *et al.*, 2008).

Adicionalmente as Rho GTPases também são necessárias para a fosforilação do co-receptor LRP5/6, imprescindível para a ativação da via de Wnt/ β -catenina, e a síntese do lipídeo PIP2 está envolvida neste processo (SCHELSSINGER *et al.*, 2009). A síntese de PIP2 requer a atividade consecutiva de duas kinases, PIP4K e PIP5K, que, por sua vez, são ativadas por Rho e Rac1 (SCHELSSINGER *et al.*, 2009). Portanto a inativação de Rac1 ou outras Rho GTPases por toxina A do *Clostridium difficile* pode interferir em várias etapas da via do Wnt/ β -catenina e a continuidade dos estudos poderão esclarecer seu papel e colaborar com o entendimento da patogênese da lesão induzida por essa toxina bem como esclarecer passos da biologia celular ligada a participação de Rho GTPases na via do Wnt/ β -catenina.

Os achados deste estudo mostram o mecanismo pelo qual a toxina A do *Clostridium difficile* inibe a via Wnt/ β -catenina. Ao inibir Rac1, toxina A reduz a translocação nuclear de β -catenina mediada por essa Rho GTPase, impossibilitando

que a via seja ativada pelo seu agonista Wnt-3a, resultando em redução da proliferação celular que culmina no rompimento da barreira epitelial intestinal. Enquanto que a suprarregulação de Rac1 constitutivo, que não é glicosilado por essa toxina, na presença de Wnt-3a é capaz de reverter os efeitos dessa toxina na via Wnt/ β -catenina e proliferação celular.

Sabendo-se que a toxina A do *Clostridium difficile* inibe essa via em células epiteliais intestinais *in vitro* é obvio o questionamento sobre a inibição da via *in vivo*. Dessa forma, investigou-se se a toxina A do *Clostridium difficile* é capaz de alterar componentes da via Wnt/ β -catenina em duas linhagens de camundongos (Swiss e C57BL6), uma vez que o estudo em linhagens de células nem sempre reflete de fato no que ocorre no ambiente *in vivo*, onde as células epiteliais interagem com componentes do sistema imune e microbiota intestinal. Além disso, o epitélio intestinal é formado por diferentes células (enterócitos, células enteroendócrinas, células caliciformes, células de Paneth e células tronco-intestinais) que estão em constante processo de proliferação, migração e diferenciação que ocorrem de forma coordenada para a renovação desse tecido (GREGORIEFF; CLEVERS, 2005).

Assim, utilizou-se o modelo de alça ileal para induzir ileíte induzida pela toxina A do *Clostridium difficile*. Esse modelo é amplamente utilizado com a finalidade de investigar os diversos mecanismos envolvidos na lesão induzida por essa toxina no intestino (TINOCO *et al.*, 2017; KOON *et al.*, 2014; JUNQUEIRA *et al.*, 2011; MEDEIROS *et al.*, 2011; MYKONIATIS, 2003).

No presente estudo, diferentes doses de toxina A foram utilizadas dependendo da espécie de camundongos (Swiss 50 μ g e C57BL/6 10 μ g) devido à diferente susceptibilidade dessas espécies para desenvolver a lesão intestinal induzida por essa toxina. Em ambas as espécies, as doses utilizadas promoveram importantes alterações histológicas, como perda da integridade das vilosidades e das criptas intestinais, bem como, formação de intenso infiltrado de células inflamatórias, como mostrado por estudos prévios em camundongos Swiss (TINOCO *et al.*, 2017) e C57BL/6 (KOON *et al.*, 2014; WARNY *et al.*, 2000), administrando doses semelhantes.

Confirmado o efeito da toxina A do *Clostridium difficile* no íleo de camundongos, prosseguiu-se o estudo investigando as alterações induzidas pela toxina A do *Clostridium difficile* em componentes da via Wnt/ β -catenina. No presente

estudo, evidenciou-se diferentes respostas de camundongos Swiss e C57BL/6 quando expostos à essa toxina no que concerne a expressão de β -catenina e de genes alvos da via Wnt/ β -catenina (LGR5, ciclina D1 e c-MYC).

De forma semelhante aos achados evidenciados neste estudo, diferenças entre espécies de camundongos tem sido demonstrado em modelo de cicatrização de feridas pós-infarto do miocárdio (BORNE *et al.*, 2009), infecção hepática induzida por *Plasmodium berghei* (SCHELLER; WIRTZ; AZAD, 1994), assim como na angiogênese e inflamação de feridas em modelo experimental de diabetes (ALMEIDA *et al.*, 2017) e de biocompatibilidade (MARQUES *et al.*, 2011).

Essas diferenças encontradas nas espécies de camundongos podem ser resultado de alterações genéticas que podem influenciar em parâmetros fisiológicos ou patológicos (MARQUES *et al.*, 2011; PAL-GHOSH, 2008; MASINDE *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2004).

No camundongo C57BL/6 a toxina A reduziu significativamente a expressão de β -catenina bem como sua translocação para o núcleo, sugerindo uma inibição da via Wnt/ β -catenina. Em camundongos Swiss, entretanto, a toxina A do *Clostridium difficile* aumentou a expressão de β -catenina. Pela imunohistoquímica, esse aumento foi observado, principalmente, no citoplasma de células do epitélio intestinal. De acordo com o dado em camundongo Swiss apresentado aqui, a expressão proteica aumentada de β -catenina foi demonstrada na colite experimental induzida por DSS, assim como em biopsias de pacientes com colite ulcerativa (BRADFORD *et al.*, 2017).

No entanto, diferente do que foi observado neste estudo, na colite ulcerativa há aumento da translocação de β -catenina para o núcleo de células da cripta intestinal (BRADFORD *et al.*, 2017; BROWN *et al.*, 2010). A patogênese da colite ulcerativa e da lesão intestinal induzida pelas toxinas do *C. difficile* apresentam mecanismos distintos. Vale enfatizar que a colite ulcerativa é considerada uma subcategoria de doença inflamatória intestinal com potencial risco de câncer associado à colite.

Em camundongos, foi evidenciado que a manutenção da proliferação de células epiteliais intestinais na fase adulta é dependente da via Wnt/ β -catenina, uma vez que camundongos nocautes de β -catenina ou TCF4 apresentaram reduzida proliferação nas criptas (TAO *et al.*, 2014; VANES *et al.*, 2012).

Apesar da aumentada expressão proteica de β -catenina no íleo de camundongos Swiss, não houve aumento da proliferação celular e nem da expressão de genes alvos dessa via. Esse achado indica que apenas níveis proteicos aumentados de β -catenina não são suficientes para estimular a transcrição de genes alvos da sinalização Wnt. A translocação dessa proteína para o núcleo é essencial para ativar a via.

A via de Wnt/ β -catenina constitui um instrumento fundamental para controlar o desenvolvimento apropriado e a manutenção dos tecidos de embriões e adultos, inclusive do epitélio intestinal. Isso se dá por meio de uma série de genes que promovem o controle espacial e temporal do crescimento, movimentação e sobrevivência celular. Se esses genes forem expressos continuamente, ocorre ativação aberrante da via de Wnt, provocando um crescimento descontrolado, que pode culminar com desenvolvimento de câncer em tecidos como cólon, mama, pele e ovários (BARKER; CLEVERS, 2006).

A ativação da via de Wnt depende da secreção de proteínas da família Wingless (Wnt) que se ligam ao complexo Frizzled (Fzd) de receptores na superfície da célula-alvo para ativar distintos mecanismos intracelulares por meio da via canônica ou de vias não-canônicas, sendo que a composição específica do complexo Wnt/Fzd determina qual delas será ativada (HUANG; HE, 2008). Por outro lado, na presença de Wnt, forma-se um complexo com o receptor Fzd e o co-receptor LRP 5/6 que se liga a proteína Dishevelled (Dvl), responsável por realocar a Axina do complexo de destruição para a membrana celular. Isso impede que a β -catenina seja degradada e permite que ela se acumule no citoplasma e entre no núcleo (HUANG; HE, 2008). Provavelmente, devido à elevada expressão de β -catenina no citoplasma de células epiteliais intestinais expostas à toxina A do *Clostridium difficile*, sugere-se que a ligação de Wnt-3a aos seus receptores encontra-se preservada.

No núcleo, β -catenina interage com membros da família Tcf/Lef, convertendo as proteínas TCF em potentes ativadores transcripcionais ao recrutar proteínas co-ativadoras, levando a uma eficiente ativação dos genes alvo da via de Wnt, incluindo c-MYC, ciclina-D1, LGR5, survivina, bcl-2, Rac1, Rho, Cdc42, dentre outros (BUONGIORNO *et al.*, 2008; HUANG; HE, 2008; BARKER; CLEVERS, 2006). Dentre estes genes, no presente estudo investigou-se a expressão de *c-Myc*, ciclina D1, LGR5 e Rac1.

Após o desafio com toxina A do *Clostridium difficile* A, evidenciou-se reduzida expressão gênica de ciclina D1 e cMyc no íleo de camundongos Swiss e C57BL/6, respectivamente. No entanto, em camundongos Swiss houve uma redução não significativa da expressão de c-Myc e LGR5. Diferente do que foi observada nessa linhagem, em camundongos C57BL/6 observou-se aumentada expressão de LGR5. De forma semelhante, porém em estudo *in vitro*, foi demonstrado que toxina A do *Clostridium difficile* reduz a expressão de c-Myc (LIMA *et al.*, 2014).

Camundongos nocautes para c-Myc morrem no período embrionário (STAPPENBECK; MILLS; GORDON, 2003). Além do seu papel na proliferação celular, c-Myc tem demonstrado importante papel na diferenciação celular por meio da sinalização de TCF-4 em cultura de células epiteliais intestinais (BETTESS *et al.*, 2005; WETERING *et al.*, 2002).

Assim como c-Myc, ciclina D1 regula a proliferação celular. O ciclo celular das células eucarióticas é composto pela primeira fase GAP (G1), fase de síntese do DNA (S), segunda fase GAP (G2) e mitose (M). Ciclina D1 liga-se a quinases dependentes de ciclina (CDKs), promovendo a progressão da fase G1 para a fase S (SHERR, 2000).

LGR5 é um marcador de células-tronco intestinal e receptor para R-espondina, um agonista endógeno da via Wnt/ β -catenina (BARKER *et al.*, 2007). A interação de R-espondina com o receptor LGR5 resulta na neutralização de Rnf43 e ZnrF3, duas ligases E3 transmembrana, que removem receptores Wnt da superfície de células tronco-intestinais (YAN *et al.*, 2017; LAU *et al.*, 2014). Estudos prévios tem relacionado a regulação da expressão gênica de LGR5, principalmente, à via Wnt/ β -catenina, porém os achados deste estudo sugerem que há outro fator regulador em camundongos C57BL/6. Portanto, mais investigações são necessárias para identificá-lo.

Assim como R-espondina, Wnt-3a é outro agonista endógeno da via Wnt/ β -catenina, ambos são sintetizados pelas células de Paneth. Esta encontra-se localizada na base das criptas intestinais (SATO *et al.*, 2013; FARIN; VAN ES; CLEVERS, 2012).

Para investigar, se a inibição da via Wnt/ β -catenina induzida pela toxina A do *Clostridium difficile* no íleo de camundongos tem alguma relação com a redução de Wnt-3a, realizou-se imuno-histoquímica para este agonista. Os achados deste estudo mostraram aumento da expressão de Wnt-3a em resposta a toxina A em

células da lâmina própria e do epitélio intestinal. Wnt-3a, além de ser sintetizado por células de Paneth, pode ser produzido por macrófagos do tipo M2 (KOCH, 2017; COSIN-ROGER *et al.*, 2016; COSIN-ROGER *et al.*, 2013). Possivelmente, um dos tipos de célula evidenciados na lâmina própria do íleo de camundongos expostos à toxina A do *Clostridium difficile* são macrófagos. Esse resultado não diferiu entre as linhagens de camundongos estudadas. De forma semelhante, expressão aumentada de Wnt-3a foi observada em biopsias de pacientes com colite ulcerativa (YOU *et al.*, 2008). O aumento de expressão de Wnt-3a no tecido ileal de camundongos em resposta a toxina A, à semelhança do que é encontrado em pacientes com colite ulcerativa, pode ser uma resposta do hospedeiro à lesão, na tentativa de induzir proliferação celular e cicatrização.

Associado a esses achados, evidenciamos reduzida proliferação celular na cripta ileal de camundongos Swiss e C57BL/6 expostos à toxina A do *C. difficile*, mesmo na presença de aumento de expressão do ativador a via Wnt3a.

As alterações de componentes da via Wnt/ β -catenina no íleo de camundongos submetidos à ileíte induzida pela toxina A do *Clostridium difficile* ocorreram concomitantemente às alterações histológicas e reduzida proliferação celular na cripta ileal que podem estar diretamente relacionadas ao bloqueio da via, diminuição de proliferação e a incapacidade de reparo.

Sabendo-se que Rac1 medeia a translocação de β -catenina para o núcleo (HENDERSON; FAGOTTO, 2002) e que Rac-1 é uma proteína cujo gene é alvo da via Wnt/ β -catenina, investigou-se, primeiramente se a sua expressão se encontra alterada no íleo de camundongos submetidos à ileíte induzida pela toxina A do *Clostridium difficile*. Os achados do presente estudo demonstraram que a expressão de Rac1 não é alterada pela toxina A do *Clostridium difficile*. No entanto, a inibição da atividade de Rac-1 por toxina A é amplamente demonstrada na literatura (CHEN *et al.*, 2016; GENISYUERK *et al.*, 2011; EGERER *et al.*, 2007; REINEK *et al.*, 2007; SEHR *et al.*, 1998).

Nossos dados *in vivo* mostram que em camundongos C57BL/6, a toxina A do *Clostridium difficile* reduz a expressão de β -catenina conforme demonstrada por PCR, redução de imunomarcação dessa proteína para o núcleo, redução de expressão de cMyc (gene alvo da via Wnt/ β -catenina) e da expressão de ciclina D1 e inibição da proliferação celular. Tudo isso associado ao aumento da

imunomarcção para Wnt3a, agonista da via. Esses dados mostram uma clara inibição da via do Wnt/ β -catenina em camundongos C57BL/6.

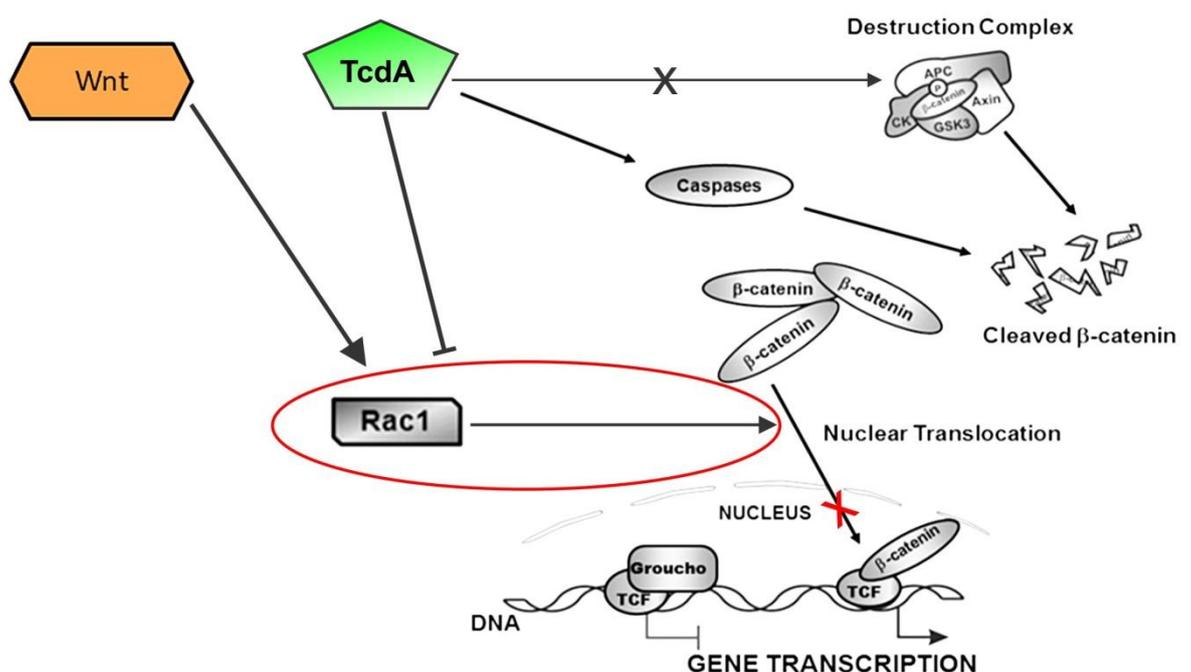
Em camundongos Swiss, nossos dados mostram um aumento de β -catenina no tecido total, associada à diminuição dos genes alvo da via principalmente ciclina D1, tanto por PCR quanto na imuno-histoquímica, inibe proliferação celular, mesmo na presença de expressão aumentada de Wnt-3a, também sugerindo uma inibição da via do Wnt/ β -catenina.

Este trabalho contribuiu para compreensão da patogênese da doença induzida pelo *Clostridium difficile* e sugere que a modulação de Rac-1 e da via Wnt/beta catenina podem ser importantes alvos para tratamento farmacológico da lesão induzida por toxina A do *Costridium difficile*.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os achados obtidos pelo presente estudo conclui-se que:

- ❖ A toxina A do *Clostridium difficile* causa redução da expressão de β -catenina, redução de imunomarcção dessa proteína no núcleo, redução de expressão de *cMyc* (gene alvo da via Wnt/ β -catenina) e de ciclina D1 e inibição da proliferação celular, mesmo na presença de expressão aumentada de Wnt-3a agonista da via em camundongos C57BL/6, indicando a inibição da via Wnt/ β -catenina;
- ❖ Em camundongos Swiss, nossos dados mostram um aumento de β -catenina no tecido total, associada à diminuição de ciclina D1, bem como redução da proliferação celular, mesmo na presença de expressão aumentada de Wnt-3a, também sugerindo uma inibição da via Wnt/ β -catenina;
- ❖ Toxina A não causou alteração da expressão gênica de Rac1 nas duas linhagens de camundongos;
- ❖ Em células epiteliais intestinais de rato (IEC-6), a supra-regulação de Rac-1 reverte os efeitos da toxina A na presença de Wnt-3a com consequente translocação de β -catenina para o núcleo e aumento da proliferação celular, sugerindo que a toxina A inibe a via Wnt/ β -catenina por seu efeito inativador de Rac-1 conforme modelo a seguir:



Fonte: Adaptado Lima (2014).

REFERÊNCIAS

- ABERLE, H.; et al. Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* v. 16, n 13, p. 3797-804, jul. 1997.
- AKTORIES, K. Bacterial protein toxins that modify host regulatory GTPases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 7, p. 487–498, 2011.
- ANJUWON-FOSTER, B. R.; TAMAYO, R. Phase variation of *Clostridium difficile* virulence factors. **Gut Microbes**, v. 976, p. 1-8, 2017.
- ANTUNES, E. N. *et al.* Pattern III non-toxigenic *Bacteroides fragilis* (NTBF) strain in Brazil. **Anaerobe**, v. 8, p. 17-22, 2002.
- ARTEAGA, A. *et al.* 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.
- ASEMPA, T.; NICOLAU, D. *Clostridium difficile* infection in the elderly: an update on management. **Clinical Interventions in Aging**, v. 12, n [s.i], p. 1799-1809, out. 2017.
- ASPENSTROM, P. Effectors for the Rho GTPases. *Curr. Opin. Cell. Biol.* ,v. 11, p. 95-102, 1999.
- AUSIELLO, C.M, *et al.* Surface layer proteins from *Clostridium difficile* induce inflammatory and regulatory cytokines in human monocytes and dendritic cells. **Microbes Infect.**,v. 8, p. 2640-2646, 2006.
- AYABE, T. *et al.* Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. **Nat Immunol**, v. 1, p. 113-118, 2000.
- BADDOUR, Joëlle A.; SOUSOUNIS, Konstantinos; TSONIS, Panagiotis A. Organ repair and regeneration: an overview. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, v. 96, n. 1, p. 1-29, 2012
- BALASSIANO, I. T. *et al.* *Clostridium difficile*: A problem of concern in developed countries and still a mystery in Latin America. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 169–179, 2012.
- BARON, R. M.; KNEISSEL. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. **Nat. Med.**, v.19, p. 179-192, 2013.
- BARROSO, L. A. *et al.* Mutagenesis of the *Clostridium difficile* toxin B gene and effect on cytotoxic activity. **Microbial pathogenesis**, v.16,n.4 p.297-303
- BARTH, H. *et al.* Low pH-induced formation of ion channels by *Clostridium difficile* toxin B in target cells. **J Biol Chem.**, v.276, p.10670-10676, 2001.
- BARTH, H. *et al.* Binary bacterial toxins: biochemistry, biology, and applications of common *Clostridium* and *Bacillus* proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68,n. 3, p. 373-402, 2004.

- BAUER, M. P. *et al.* *Clostridium difficile* infection in Europe: A hospital-based survey. **The Lancet**, v. 377, n. 9759, p. 63-73, 2011.
- BADOUR, J. A., SOUSOUNIS, K. & Tsonis, P. A. Organ repair and regeneration: an overview. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today* v. 96, p.1–29 2012
- BARKER, N.; CLEVERS, H. Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* v. 5, n. 12, p. 997-1014, dec. 2006.
- BRADFORD, Emily M. *et al.* Myo-inositol reduces β -catenin activation in colitis. *World journal of gastroenterology*, v. 23, n. 28, p. 5115, 2017.
- BROWN, Jeffrey B. *et al.* Mesalamine inhibits epithelial β -catenin activation in chronic ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v. 138, n. 2, p. 595-605., 2010.
- BETTESS, Michael D. *et al.* c-Myc is required for the formation of intestinal crypts but dispensable for homeostasis of the adult intestinal epithelium. *Molecular and cellular biology*, v. 25, n. 17, p. 7868-7878, 2005.
- BELLA, S. *Diet et al.* Toxinas A e B de *Clostridium difficile*: Insights sobre propriedades patogênicas e efeitos extraintestinais. **Abstrato**, v. 8, n. 5, p. 1–27, 2018.
- BRITO, G. A. *et al.* Mechanism of *Clostridium difficile* toxin A-induced apoptosis in T84 cells. **The Journal of infectious diseases**, v. 186, n. 10, p. 1438-47, nov. 2002.
- BRITO, G. A. *et al.* *Clostridium difficile* toxin A alters in vitro-adherent neutrophil morphology and function. **The Journal of infectious diseases**, v. 185, n. 9, p. 1297-306, mai. 2002.
- BRITO, G. A. C. *et al.* *Clostridium difficile* toxin A induces intestinal epithelial cell apoptosis and damage: Role of Gln and Ala-Gln in toxin A effects. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 50, n. 7, p. 1271–1278, 2005.
- BUONGIORNO, P.; *et al.* Rac1 GTPase and the Rac1 exchange factor Tiam1 associate with Wnt-responsive promoters to enhance beta-catenin/TCF-dependent transcription in colorectal cancer cells. *Mol Cancer.* v. 7, n. 73, sep. 2008
- CARNEIRO, B. A. *et al.* Caspase and BID involvement in *Clostridium difficile* toxin A-induced apoptosis and modulation of toxin A effects by glutamine and Alanyl-glutamine in vivo and in vitro. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 81-87, 2006.
- CARTER, G. P. *et al.* Defining the roles of TcdA and TcdB in localized gastrointestinal disease, systemic organ damage, and the host response during *Clostridium difficile* infections. **mBio**, v. 6, n. 3, p. 1–10, 2015.
- CHAVES-OLARTE, E.; *et al.* Toxins A and B from *Clostridium difficile* differ with respect to enzymatic potencies, cellular substrate specificities, and surface binding to cultured cells. *JClin Invest.* v. 100, n. 7, p. 1734-41, oct. 1997

CHEN, Q.; MA, J. X. Canonical Wnt signaling in diabetic retinopathy. **Vision Research**, v. 139, p. 47–58, 2017.

CHITNIS, A. S. *et al.* Epidemiology of community-associated *Clostridium difficile* infection, 2009 through 2011. **JAMA Internal Medicine**. v.173, n. 14, p.1359-1367, 2013.

CHUMBLER, N. M. *et al.* *Clostridium difficile* toxins TcdA and TcdB cause colonic tissue damage by distinct mechanisms. **Infection and Immunity**, v. 84, n. 10, p. 2871–2877, 2016.

CLEVERS, H.; NUSSE, R. Wnt/ β -catenin signaling and disease. **Cell**, v.149, n. 6, p.1192-1205, jun. 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria**. Approved Standard, 8th ed. CLSI M11-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2012.

COSÍN-ROGER, Jesús *et al.* M2 macrophages activate WNT signaling pathway in epithelial cells: relevance in ulcerative colitis. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e78128, 2013.

COWARDIN, Carrie A. *et al.* Inflammasome activation contributes to interleukin-23 production in response to *Clostridium difficile*. **MBio**, v. 6, n. 1, p. e02386-14, 2015.

COWARDIN, Carrie A.; PETRI JR, William A. Host recognition of *Clostridium difficile* and the innate immune response. **Anaerobe**, v. 30, p. 205-209, 2014.

COHEN, S. H. *et al.* Society for Healthcare Epidemiology of America; Infectious Diseases Society of America. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA). **Infection Control and Hospital Epidemiology**. v.31, p.431–455, 2010.

COSO, O.A. *et al.* The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. **Cell**, v. 81, n[s.i], p. 1137–1146, 1995.

COSTA, C. L. *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.

COWARDIN, Carrie A.; PETRI JR, William A. Host recognition of *Clostridium difficile* and the innate immune response. **Anaerobe**, v. 30, p. 205-209, 2014.

COWARDIN, Carrie A. *et al.* Inflammasome activation contributes to interleukin-23 production in response to *Clostridium difficile*. **MBio**, v. 6, n. 1, p. e02386-14, 2015

DENG, F. *et al.* YAP triggers the Wnt/ β -catenin signalling pathway and promotes enterocyte self-renewal, regeneration and tumorigenesis after DSS-induced injury. **Cell Death and Disease**, v. 9, n. 2, 2018.

DE ALMEIDA, Simone Aparecida et al. Murine strain differences in inflammatory angiogenesis of internal wound in diabetes. **Biomedicine&Pharmacotherapy**, v. 86, p. 715-724, 2017

DI SABATINO, A. et al. Distribution, proliferation, and function of Paneth cells in uncomplicated and complicated adult celiac disease. **Am J Clin Pathol.**, v. 130, p. 34–42, 2008.

DOLGIN, E. 'Game changer' antibiotic and others in works for superbug. **Nature medicine**, v. 17, n. 1, p. 10, jan. 2011.

DRUDY, D. et al. Human antibody response to surface layer proteins *Clostridium difficile* infection. **FEMS Immunol Med. Microbiol.** v. 41, p. 273-242, 2004.

EATON, S. et al. CDC42 and Rac1 control different actin-dependent processes in the *Drosophila* wing disc epithelium. **J. Cell Biol.**, v.131, n. 1, p.151-164, 1995.

EGERER, M. et al. Auto-catalytic cleavage of *Clostridium difficile* toxins A and B depends on cysteine protease activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 35, p. 25314–25321, 2007.

ENOCH, D.A. et al. *Clostridium difficile* in children: colonisation and disease. **J Infect.** v. 63, n.2, p.105-13, ago. 2011.

ESUFALI, S.; BAPAT, B. Cross-talk between Rac1 GTPase and dysregulated Wnt signaling pathway leads to cellular redistribution of beta-catenin and TCF/LEF-mediated transcriptional activation. **Oncogene.** v. 23, n. 50, p. 8260-71, oct. 2004.

ETIENNE-MANNEVILLE, S.; HALL, A. Rho GTPases in Cell Biology. *Nature.*, v. 420, n. 3-, p. 629–635, dez. 2002.

FERREIRA, C.E.A et al. 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.

FURUYA-KANAMORI, L. et al. Asymptomatic *Clostridium difficile* colonization: epidemiology and clinical implications. BMC Infect Dis., v. 14, n. 15, p. 516-539, nov. 2015.

FLORIN, I.; THELESTAN, M. Internalization of *Clostridium difficile* toxin into cultured human lung fibroblasts. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 763, p.383-392, 1983.

GENISYUERK, S. et al. Structural determinants for membrane insertion, pore formation and translocation of *Clostridium difficile* toxin B. **Mol. Microbiol.** v.79, n.6, p.1643–1654, mar. 2011.

GERIC, B. et al. Distribution of *Clostridium difficile* variant toxinotypes and strains with binary toxin genes among clinical isolates in an American hospital. **Journal of**

Medical Microbiology, v. 53, n. 9, p. 887–894, 2004.

GRIGORYAN, T.; et al. Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice. *Genes Dev.* v. 22, n. 17, p. 2308-41, sep. 2008.

GIRINATHAN, B. P. *et al.* Importance of glutamate dehydrogenase (GDH) in *Clostridium difficile* colonization in vivo. **PLoS ONE**, v. 11, n. 7, p. 1–18, 2016.

GOVIND, R.; DUPUY, B. Secretion of *Clostridium difficile* toxins A and B requires the holin-like protein tcdE. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 6, p. 1-14, 2012.

GUPTA, P. *et al.* Functional defects in *Clostridium difficile* TcdB toxin uptake identify CSPG4 receptor-binding determinants. **Journal of Biological Chemistry**, v.292, n.42, p. 17290–17301, ago. 2017.

HALL, A. J. *et al.* The roles of *Clostridium difficile* and norovirus among gastroenteritis-associated deaths in the United States, 1999-2007. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 2, p. 216–223, 2012.

HE, X. C. *et al.* BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. **Nat Genet.**, v. 36, p. 1117–1121, 2004.

HENRIQUES, B.; FLORIN, I.; THELESTAM, M. Cellular internalisation of *Clostridium difficile* toxin A. **Microbial Pathogenesis**, v. 2, n. 6, p. 455–463, 1987.

HENSGENS, M. P. M. *et al.* *Clostridium difficile* infection in the community: a zoonotic disease? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 7, p. 45, 2012.

HENDERSON, B. R.; FAGOTTO, F. The ins and outs of APC and beta-catenin nuclear transport. *EMBO Rep.* v. 3, n. 9, p. 834-9, sep. 2002.

HOOKMAN, P.; BARKIN, J.S. *Clostridium difficile* associated infection, diarrhea and colitis. **World Journal of Gastroenterology.**, v.15, n.13, p.1554-1580, 2009.

HUANG, H.; HE, X. Wnt/beta-catenin signaling: new (and old) players and new insights. *Curr Opin Cell Biol.* v. 20, n. 2, p. 119-25, apr. 2008.

HUMPHRIES, A.; WRIGHT, N. A. Colonic crypt organization and tumorigenesis. **Nat Rev Cancer.** v. 8, n. 6, p. 415-24, jun. 2008.

HUNT, J. J.; BALLARD, J. D. Variations in Virulence and Molecular Biology among Emerging Strains of *Clostridium difficile*. **Microbiol. Mol. Biol. Ver.**, v. 77, p. 4567-5811, 2013. Disponível em: < doi: 10.1128/MMBR.00017-13 >.

INUI, Masanori et al. Protective roles of CX3CR1-mediated signals in toxin A-induced enteritis through the induction of heme oxygenase-1 expression. *The Journal of Immunology*, v. 186, n. 1, p. 423-431, 2011

JAFARI, Nazila V. *et al.* *Clostridium difficile* modulates host innate immunity via toxin-independent and dependent mechanism (s). **PLoSOne**, v. 8, n. 7, p. e69846, 2013.

JANK, T; AKTORIES, K. Structure and mode of action of clostridial glucosylating toxins: the ABCD model. **Trends Microbiol.**, 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.**, v.17, p.15-22, 2007.

JARCHUM, Irene et al. Toll-like receptor 5 stimulation protects mice from acute *Clostridium difficile* colitis. **Infection and immunity**, v. 79, n. 4, p. 1498-1503, 2011.

JAFARI, Nazila V. et al. *Clostridium difficile* modulates host innate immunity via toxin-independent and dependent mechanism (s). **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e69846, 2013.

JARCHUM, Irene et al. Toll-like receptor 5 stimulation protects mice from acute *Clostridium difficile* colitis. *Infection and immunity*, v. 79, n. 4, p. 1498-1503, 2011.
JAMIESON, Cara et al. Rac1 augments Wnt signaling by stimulating β -catenin–lymphoid enhancer factor-1 complex assembly independent of β -catenin nuclear import. **J Cell Sci**, v. 128, n. 21, p. 3933-3946, 2015.

JOU, T. S.; NELSON, W.J. Effects of regulated expression of mutant RhoA and Rac1 small ATPases on the development of epithelial (MDCK) cell polarity. **J Cell Biol.**, v.142, p. 85-100. 1998.

JONES, W. M.; BEJSOVEC, A. RacGap50C negatively regulates wingless pathway activity during *Drosophila* embryonic development. *Genetics*. v. 169, n. 4, p. 2075-86, apr. 2005.

KEELY, P.J. *et al.* Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3) K. **Nature**, v.11, n.390, p. 632-636, 1997.

KRISHNAMURTHY, N.; KURZROCK, R. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors. **Cancer Treatment Reviews**, v. 62, p. 50–60, 2018

LALA, S. et al. Crohn's Disease and the NOD2 Gene: A Role for Paneth Cells. **Gastroenterology** v. 125, p. 47–57, 2003.

LEONE, D. P. et al. The Rho GTPase Rac1 is required for proliferation and survival of progenitors in the developing forebrain. *Dev Neurobiol.*, v. 70, n.9, p.659-678, ago. 2010.

LESSA, F. C. *et al.* Burden of *Clostridium difficile* Infection in the United States. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 9, p. 825-834, 2015.

LICA, M.; *et al.* Difference in the biological effects of *Clostridium difficile* toxin B in proliferating and non-proliferating cells. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.** v. 383, n. 3, p. 275-83, mar. 2011.

LIMA, B. B. *et al.* Clostridium difficile toxin A attenuates Wnt/ β -catenin signaling in intestinal epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 7, p. 2680-2687, 2014.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analyses of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LI, Tong-Tong *et al.* Genetic variation responsible for mouse strain differences in integrin $\alpha 2$ expression is associated with altered platelet responses to collagen. **Blood**, v. 103, n. 9, p. 3396-3402, 2004.

LOO, V. G. *et al.* Host and pathogen factors for Clostridium difficile infection and colonization. **N Engl J Med**, v. 365, n. 18, p. 1693-703, nov. 2011.

LYERLY, D. M. *et al.* Biological activities of toxins A and B of *Clostridium difficile*. **Infect. Immun.**, v. 35, n. 3, p.11-47 a 11-50, mar.1982.

LYRAS, D. *et al.* Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. **Nature**, v. 458, p.1176-1179, 2009.

MA, C.L. *et al.* Physical exercise induces hippocampal neurogenesis and prevents cognitive decline. **Behavioural Brain Research**, v.317, p.332–339, 2017.

MARQUES, Suzane M. *et al.* Genetic background determines mouse strain differences in inflammatory angiogenesis. **Microvascular research**, v. 82, n. 3, p. 246-252, 2011.

MASINDE, Godfred L. *et al.* New quantitative trait loci that regulate wound healing in an intercross progeny from DBA/1J and 129 \times 1/SvJ inbred strains of mice. **Functional & integrative genomics**, v. 6, n. 2, p. 157-163, 2006.

MANI, N., DUPUY, B. Regulation of toxin synthesis in *Clostridium difficile* by an alternative RNA polymerase sigma factor. **PNAS**, v.98, n.10, p. 5844-5849, mai. 2001.

MARTIN-VERSTRAETE, I.; PELTIER, J.; DUPUY, B. The regulatory networks that control *Clostridium difficile* toxin synthesis. **Toxins**, v. 8, n. 5, p. 1–24, 2016.

MCDONALD, L. C. *et al.* Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile* Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). **Clinical Infectious Diseases**, v. 66, n. 7, p. e1–48, mar. 2018.

MASINDE, Godfred L. *et al.* New quantitative trait loci that regulate wound healing in an intercross progeny from DBA/1J and 129 \times 1/SvJ inbred strains of mice. **Functional&integrativegenomics**, v. 6, n. 2, p. 157-163, 2006.

MERRIGAN, M.M.; GERDING, D.N; 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.

MINDEN, A. et al. Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc 42 Hs. *Cell*, v. 81, p. 1147–1157, 1995.

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

MYANT, K.B. et al. ROS production and NF- κ B activation triggered by RAC1 facilitate WNT-driven intestinal stem cell proliferation and colorectal cancer initiation. **Cell Stem Cell**, v. 12, n. 6, p. 761–773, jun. 2013.

NAM, S. T. et al. NQO1-knockout mice are highly sensitive to clostridium difficile toxin a-induced enteritis. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 8, p. 1446–1451, 2016.

NEGM, Ola H. et al. Protective antibodies against Clostridium difficile are present in intravenous immunoglobulin and are retained in humans following its administration. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 188, n. 3, p. 437–443, 2017.

NEGRÓN, M. E. et al. Ulcerative Colitis Patients With Clostridium difficile are at Increased Risk of Death, Colectomy, and Postoperative Complications: A Population-Based Inception Cohort Study. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 111, n. 5, p. 691–704, 2016.

NELSON, R.L., SUDA, K. J. Antibiotic treatment for Clostridium difficile-associated diarrhea in adults. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 3, p. 1–64, 2017.

NUSRAT, A. et al. Clostridium difficile toxins disrupt epithelial barrier functions by altering membrane microdomain localization of tight junction proteins. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 1329–1336, 2001.

ORRELL, KATHLEEN. et al. Clostridium difficile toxins A and B: receptors, pores, and translocation into cells. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, v. 52, n. 4, p. 461–473, 2017.

PAREDES-SABJA, Daniel; SHEN, Aimee; SORG, Joseph A. Clostridium difficile spore biology: sporulation, germination, and spore structural proteins. *Trends in microbiology*, v. 22, n. 7, p. 406–416, 2014.

PAPATHEODOROU, P. et al. Clostridial glucosylating toxins enter cells via clathrin mediated endocytosis. **PLoS One**, v. 5, n. 5, 2010.

PAL-GHOSH, Sonali et al. BALB/c and C57BL6 mouse strains vary in their ability to heal corneal epithelial debridement wounds. **Experimental eyeresearch**, v. 87, n. 5, p. 478–486, 2008.

POPOFF, M. R.; GENY, B. Rho/Ras-GTPase-dependent and -independent activity of clostridial glucosylating toxins. **Journal of medical microbiology**, v. 60, n. Pt 8, p. 1057-1069, ago. 2011.

PORTER, E. M. *et al.* The multifaceted Paneth cell. **Cell Mol Life Sci.**, v. 59, p. 156-170, 2002.

POTHOULAKIS, C. R. J. *et al.* Rabbit sucrase-isomaltase is a functional intestinal receptor for *Clostridium difficile* toxin A. **J. Clin. Invest.**, v. 98, 1996.

POTHOULAKIS, C.; LAMONT, J. T. Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions II. The integrated response of the intestine to *Clostridium difficile* toxins. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v. 280, p. 178-183, 2001.

POUTANEN, S. M.; SIMOR, A. E. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults. **Canadian Medical Association Journal.** , v.171, p. 51-58, 2004.

QA'DAN, M.; SPYRES, L.M.; BALLARD, J.D. pH – induced conformational changes in *Clostridium difficile* toxin B. **Infect Immun.** , v. 68, p. 2470-2474, 2000.

RAY, R.M. et al. The Requirement for Polyamines for Intestinal Epithelial Cell Migration Is Mediated through Rac1. The Journal of Biological Chemistry., v. 11, n. [s.i], abr. 2003.

REINEKE, J. *et al.* Autocatalytic cleavage of *Clostridium difficile* toxin B. **Nature.**, v.22, n. 446, p.415-419, mar. 2007.

RIDLEY, A. J. Rho GTPases and cell migration. **J. Cell Sci.**, v.114, n. 15, p. 2713-2722, ago. 2001.

RIDLEY, A.J. Rho-related proteins: actin cytoskeleton and cell cycle. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 5, p. 24–30, 1995.

RUBIO, C. A. Lysozyme-rich mucus metaplasia in duodenal crypts supersedes Paneth cells in celiac disease. **Virchows Arch.**, v.459, p. 339–346, 2011.

RUPNIK, M; JUST, I. The comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxin 3rd ed (eds Alouf, JA; POPOFF, MR;) **Academic Apress, Burlington, Massachusetts, USA**, v20, 409-429, 2006.

RUPNIK, M. *et al.* Revised nomenclature of *Clostridium difficile* toxins and associated genes. **J Med Microbiol**, v. 54, n. 2, p. 113-117, fev. 2005.

RUPNIK, M.; WILCOX, M. H.; GERDING, D. N. *Clostridium difficile* infection: New developments in epidemiology and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 7, p. 526–536, 2009.

SANDER, E.E. *et al.* Matrix-dependent Tiam1/Rac signaling in epithelial cells promotes either cell-cell adhesion or cell migration and is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. **J Cell Biol.** , v.143, n.5, p. 1385-1398, nov.1998.

SANTOS, A. A. Q. A. *et al.* Glutamine and alanyl-glutamine increase RhoA expression and reduce clostridium difficile toxin-a-induced intestinal epithelial cell damage. **BioMed Research International**, v. 2013, n. Cdi, 2013.

SATO, T. *et al.* Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. **Nature**, v. 459, p. 262-265, 2009.

SAUERBORN, M.; EICHEL-STREIBER, C. Nucleotide sequence of Clostridium difficile toxin A. **Nucleic Acid Research.**, v. 16, p. 1619- 1630, 1990.

SCHMITZ, A.A. *et al.* Rho GTPases: signaling, migration, and invasion. **Exp. Cell Res.** , v.261, p.1–12, 2000.

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

SHELLER, Libia F.; WIRTZ, Robert A.; AZAD, Abdu F. Susceptibility of different strains of mice to hepatic infection with Plasmodium berghei. **Infection and immunity**, v. 62, n. 11, p. 4844-4847, 1994.

SCHLESSINGER, K; HALL, A.; TOLWINSK, N. Wnt signaling pathways meet Rho GTPases. **Gens Dev.** v. 23, n. 3, p. 265-77, feb. 2009.

SHIN, J. H.; WARREN, C. A. Warren Collateral damage during antibiotic treatment of *C. difficile* infection in the aged host: Insights into why recurrent disease happens. **Gut Microbes.**, v.8, n. 5, p. 504–510, abr. 2017.

SKLAVOS, A. *et al.* Efeitos do bloqueio de Wnt-1 em adenomas hepatocelulares induzidos por DEN de camundongos. **Abstrato.**, v. 15, n. 1, p. 1211–1219, 2018.

SMITS, W. K. *et al.* Clostridium difficile infection. **Nature Reviews Disease Primers**, v.2, p.1-20.2016.

STAPPENBECK, T. S.; GORDON, J. I. Rac1 mutations produce aberrant epithelial differentiation in the developing and adult mouse small intestine. **Development.**, v.127, n.12, p. 2629-2642, 2000.

STAPPENBECK, Thaddeus S.; MILLS, Jason C.; GORDON, Jeffrey I. Molecular features of adult mouse small intestinal epithelial progenitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 3, p. 1004-1009, 2003.

- STOESSER, N. *et al.* Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* strains in children compared with that of strains circulating in adults with *Clostridium difficile*-associated infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 11, p. 3994–3996, 2011.
- SUNDBOM, M. *et al.* Alteration in human defensin-5 expression following gastric bypass surgery. **J Clin Pathol.**,v. 60, p. 1029–1034, 2007.
- TAO, Junyan *et al.* Activation of β -catenin and Yap1 in human hepatoblastoma and induction of hepatocarcinogenesis in mice. **Gastroenterology**, v. 147, n. 3, p. 690-701, 2014.
- TAKAISHI, K. *et al.* Regulation of cell-cell adhesion by rac and rho small G proteins in MDCK cells. **J. Cell Biol.**, v. 131, p.1047–1059, 1997.
- TIENNE-MANNEVILLE, S.; HALL, A. Rho GTPases in Cell Biology.**Nature**, v. 420, n. December, p. 629–635, 2002.
- TINOCO-VERAS, C. M. *et al.* Transforming growth factor β 1/SMAD signaling pathway activation protects the intestinal epithelium from *Clostridium difficile* toxin A-induced damage.**Infection and Immunity**, v. 85 (10),2017.
- TRIADAFILOPOULOS, G. C. *et al.* Comparative study of *Clostridium difficile* toxin A and cholera toxin in rabbit ileum: role of prostaglandins and leukotrienes.**Gastroenterology**, v. 92, 1989.
- UPADHYAY, G. *et al.* Molecular association between beta-catenin degradation complex and Rac guanine exchange factor DOCK4 is essential for Wnt/beta-catenin signaling. *Oncogene*. v. 27, n. 44, p. 5845-55, oct. 2008.
- VAN DE WETERING, Marc *et al.* The β -catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. **Cell**, v. 111, n. 2, p. 241-250, 2002.
- VAN DER FLIER, L. G.; CLEVERS, H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium.**Annual review of physiology**, v. 71, p. 241-60, 2009.
- VEDANTAM, G.*etal.**Clostridium difficile* infection contributions to disease establishment and host response. **Gut Microbes**3, v. 3, n. 2, p. 121–134, 2012.
- VIVIAN, G.*et al.* A Predominantly Clonal Multi-Institutional Outbreak of. **The new england journal of medicine**, v. 353, p. 2442–2449, 2005.
- VON EICHEL-STREIBER, C. *et al.* Comparative sequence analysis of the *Clostridium difficile* toxins A and B. **Mol Gen Genet**, v. 233(1-2), p. 260- 268, 1992.
- VON EICHEL-STREIBER, C. *et al.* Large clostridial cytotoxins - A family of glycosyltransferases modifying small GTP-binding proteins. **Trends in Microbiology**, v. 4, n. 10, p. 375–382, 1996.

YOU, Joann *et al.* Wnt pathway-related gene expression in inflammatory bowel disease. *Digestive diseases and sciences*, v. 53, n. 4, p. 1013-1019, 2008.

YU, Hua *et al.* Cytokines are markers of the *Clostridium difficile*-induced inflammatory response and predict disease severity. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 24, n. 8, p. 00037-17, 2017.

WEHKAMP, J. *et al.* NOD2(CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha defensin expression. **Gut**, v.53, p.1658-1664, 2004.

WILSON, C. L. *et al.* Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. **Science**, v. 286, p. 113-117, 1999.

WRIGHT, A. *et al.* Proteomic analysis of cell surface proteins from *Clostridium difficile*. **Proteomics**, v.5, n.9, p. 2443-2452, jun. 2005.

WU, X. *et al.* Rac1 activation controls nuclear localization of beta-catenin during canonical Wnt signaling. **Cell**, v. 133, n. 2, p. 340-353, abr. 2008.

ZANELLA TERRIER, M. C. *et al.* Recurrent *Clostridium difficile* infections: The importance of the intestinal microbiota. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 23, p. 7416–7423, 2014.

ZIEGLER, M. O. P. *et al.* E. Conformational Changes and Reaction of Clostridial Glycosylating Toxins. **Journal of Molecular Biology**, v. 377, n. 5, p. 1346–1356, 2008.

APÊNDICE A



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº19/14, sobre o projeto intitulado: “PAPEL DAS CÉLULAS DE PANETH NA MUCOSITE INDUZIDA PELO IRINOTECANO E ENTERITE INDUZIDA PELA TOXINA A DO *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* EM CAMUNDONGOS”, de responsabilidade de Silvânia Maria Mendes Vasconcelos, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 16 de maio de 2014.

Fortaleza, 26 de maio de 2014.


Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "PAPEL DO RAC1 NAS ALTERAÇÕES DA VIA WNT/ B-CATENINA EM MODELOS IN VIVO E IN VITRO INDUZIDA PELA TOXINA A DO Clostridium difficile", protocolada sob o CEUA nº 2727150218 (ID 000156), sob a responsabilidade de **Gerly Anne de Castro Brito** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 28/03/2018.

We certify that the proposal "RAC1 ROLE IN THE ALTERATIONS OF THE WNT/ B-CATENINA VIA IN IN VIVO MODELS AND IN VITRO INDUCED BY TOXIN A Clostridium difficile", utilizing 48 Isogenics mice (48 females), protocol number CEUA 2727150218 (ID 000156), under the responsibility of **Gerly Anne de Castro Brito** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 03/28/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [03/2018](#) a [03/2020](#)

Área: [Departamento de Morfologia](#)

Origem:	Biotério Setorial da FAMED		
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Fêmeas
Linhagem:	C57BL/6	idade:	21 a 28 dias
		Peso:	20 a 25 g
		N:	24
Origem:	Biotério Setorial da FAMED		
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Fêmeas
Linhagem:	C57BL/6	idade:	21 a 28 dias
		Peso:	20 a 25 g
		N:	24

Local do experimento: NEMPI - Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagem - do Departamento de Morfologia da Faculdade de Medicina da UFC

Fortaleza, 28 de março de 2018

Alexandre Havt Bindá

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

Virgínia Cláudia Carneiro Girão

Profa. Dra. Virgínia Cláudia Carneiro Girão
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

Fármacos

Fármacos	Fabricante	Código do produto
Cloridrato de cetamina 10% (Cetamin [®])	Syntec	-
Xilazina 2% (Calmin [®])	Agener União	-

Reagentes e materiais

Reagentes/materiais	Fabricante	Código do produto
2-Mercaptoetanol	Biorad	1610710
30% de Bis-acrilamida	Biorad	1610154
Albumina sérica bovina	Sigma-Aldrich	A2153-100
<i>Clarity Western ECL Substrate</i>	Biorad	1705060
DAB	Dako	K3468
Dako Pen	Dako	52002
Diluinte do anticorpo	Spring Bioscience	ADS-125
Glicina	Biorad	1610718
High Capacity cDNA(Kit de transcriptase reversa)	Applied biosystems	4368814
Inibidor de protease	Sigma-Aldrich	P8340
Kit de dosagem de proteína	Thermo Scientific	23227
Kit de extração do RNA	Promega	Z3105
Membrana de PVDF	Biorad	1620177
Papel filtro (Western Blotting)	Biorad	1703932
Peróxido de hidrogênio	Abcam	Ab64218
Persulfato de amônia	Biorad	1610700
<i>Precision Plus Protein Kaleidoscope</i> (Western Blotting)	Biorad	1610375
SDS	Biorad	1610301
Solução de parada (dosagem de citocinas)	R&D Systems	DY994
Soro de cavalo	Sigma-Aldrich	H0146-10
SYBER Green PCR master mix	Applied biosystems	4309155
Tampão da amostra (Western Blotting)	Biorad	1610737
Tampão de lavagem 25x concentrado (dosagem de citocinas)	R&D Systems	895126
TEMED	Biorad	1610801
Tris Base	Promega	H5135
Triton-X-100	Sigma-Aldrich	T8787
TWEEN 20	Biorad	1706531

Soluções

Soluções	Preparo
Formol tamponado a 10%	6,5g de fosfato de sódio dibásico 4g de fosfato de sódio monobásico 800 mL de água destilada Após dissolver as substâncias, adicionar 100 mL de formaldeído 37%. Completar para 1000 mL.
PBS(concentrado 10x)	80g de Cloreto de sódio 2g de KCl 11,4g de fosfato de sódio monobásico 4,5 g de fosfato de sódio dibásico 900 mL de água destilada Ajustar o pH para 7,4. Completar para 1000 mL.
PBS (concentrado 1x)	100 mL de PBS 10x 900 mL de água destilada
Tampão citrato (concentrado 10x)	29,4g de Citrato de sódio 900 mL de água destilada Ajustar o pH para 6,0 Completar para 1000 mL.
Tampão citrato (concentrado 1x)	20 mL de tampão citrato 10x 180 mL de água destilada
PBS/0,2% triton-X-100	25 mL de PBS 1x 50µL de triton-X-100
PBS/1% triton-X-100	25 mL de PBS 1x 250µL de triton-X-100

Artigos Publicados no Doutorado como colaboradora

Nogueira et al. *Journal of Neuroinflammation* (2017) 14:79
DOI 10.1186/s12974-017-0854-1

Journal of Neuroinflammation

RESEARCH

Open Access

The involvement of mast cells in the irinotecan-induced enteric neurons loss and reactive gliosis



Ludmila T. Nogueira¹, Deiziane V. S. Costa², Antoniella S. Gomes², Conceição S. Martins², Angelina M. H. P. Silva², Juliana M. Coelho-Aguiar³, Patrícia Castelucci⁴, Roberto C. P. Lima-Júnior⁵, Renata F. C. Leitão², Vivaldo Moura-Neto³ and Gerly A. C. Brito^{2*}

Biochemical Pharmacology 145 (2017) 34–45



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochempharm



5-Fluorouracil induces inflammation and oxidative stress in the major salivary glands affecting salivary flow and saliva composition



Luana E. Bomfim^a, Cíntia M. Braga^b, Thais A. Oliveira^b, Conceição S. Martins^b, Danielle A. Foschetti^b, Ana A.Q.A. Santos^a, Deiziane V.S. Costa^b, Renata F.C. Leitão^b, Gerly A.C. Brito^{a,b,c,*}

^a Department of Medical Sciences, School of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^b Postgraduate Program in Morphofunctional Sciences, Department of Morphology, School of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^c Department of Physiology and Pharmacology, School of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

Chemico-Biological Interactions 260 (2016) 129–140



Contents lists available at ScienceDirect

Chemico-Biological Interactions

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chembioint



Carvacrol reduces irinotecan-induced intestinal mucositis through inhibition of inflammation and oxidative damage via TRPA1 receptor activation



Elenice M. Alvarenga^a, Luan K.M. Souza^a, Thiago S.L. Araújo^a, Kerolayne M. Nogueira^a, Francisca Beatriz M. Sousa^a, Alyne R. Araújo^b, Conceição S. Martins^c, Dvison M. Pacífico^c, Gerly Anne de C. Brito^c, Emmanuel P. Souza^c, Damião P. Sousa^d, Jand Venes R. Medeiros^{a,*}

^a Laboratory of Pharmacology of Inflammation and Gastrointestinal Disorders (Lafidg), Federal University of Piauí, Parnaíba, PI, Brazil

^b Biotechnology and Biodiversity Center Research, BIOTEC, Federal University of Piauí, Parnaíba, PI, Brazil

^c Postgraduate Program in Morphofunctional Sciences, Department of Morphology, Faculty of Medicine, Federal University Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

^d Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil



Contents lists available at ScienceDirect

Biomedicine & Pharmacotherapy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biopharm

Epiisopiloturine, an imidazole alkaloid, reverses inflammation and lipid peroxidation parameters in the Crohn disease model induced by trinitrobenzenesulfonic acid in Wistar rats



Lucas Rodrigues de Carvalho^a, Tarcisio Vieira de Brito^a, José Simião da C. Júnior^a, Genilson José Dias Júnior^a, Diva de Aguiar Magalhães^a, Stefany Guimarães Sousa^a, Renan Oliveira Silva^b, Felipe Rodolfo Pereira da Silva^c, Daniel Fernando Pereira Vasconcelos^c, Leiz Maria Costa Vêras^d, José Roberto de Sousa de Almeida Leite^d, Dainesy Santos Martins^e, Conceição da Silva Martins^e, Jefferson Soares de Oliveira^f, André Luiz dos Reis Barbosa^{a,g,*}

^a LAFPEX—Laboratory of Experimental Physiopharmacology, Biotechnology and Biodiversity Center Research (BIOTEC), Federal University of Piauí, Parnaíba, 64202-020, PI, Brazil

^b LEFFAG – Laboratory of Physiopharmacology Study of Gastrointestinal Tract, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

^c IAPHIS - Laboratory of Analysis and Histological Processing, Department of Biomedicine, Federal University of Piauí, Parnaíba, 64202-020, PI, Brazil

^d Biotechnology and Biodiversity Center Research (BIOTEC), Federal University of Piauí, Campus of Parnaíba, Avenida São Sebastião, 64202-020, Parnaíba, PI, Brazil

^e NEMPI - Núcleo for Studies in Microscopy and Image Processing, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

^f Laboratory of Biochemistry and Microorganisms and Plant Biology, Department of Biomedicine, Federal University of Piauí, Campus Ministro Reis Velloso, Parnaíba, Brazil



Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodres

Lycopene rich extract from red guava (*Psidium guajava* L.) displays anti-inflammatory and antioxidant profile by reducing suggestive hallmarks of acute inflammatory response in mice



Andreanne G. Vasconcelos^a, Adriany das G.N. Amorim^a, Raimunda C. dos Santos^a, Jessica Maria T. Souza^a, Luan Kelves M. de Souza^b, Thiago de S.L. Araújo^b, Lucas Antonio D. Nicolau^c, Lucas de Lima Carvalho^c, Pedro Everson A. de Aquino^d, Conceição da Silva Martins^e, Cristina D. Ropke^f, Pedro Marcos G. Soares^c, Selma Aparecida S. Kuckelhaus^g, Jand-Venes R. Medeiros^b, José Roberto de S.A. Leite^{a,g,*}

^a Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia-BIOTEC, Universidade Federal do Piauí-UFPI, Campus Ministro Reis Velloso-CMRV, Parnaíba, PI, Brazil

^b Laboratório de Fisiologia Farmacológica Experimental-LAFPEX, Universidade Federal do Piauí-UFPI, Campus Ministro Reis Velloso-CMRV, Parnaíba, PI, Brazil

^c Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer-LAFICA, Universidade Federal do Ceará-UFC, Fortaleza, CE, Brazil

^d Laboratório de Neurofarmacologia, Universidade Federal do Ceará-UFC, Fortaleza, CE, Brazil

^e Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagens-NEMPI, Universidade Federal do Ceará-UFC, Fortaleza, CE, Brazil

^f Fytabios Nordeste LTDA, Parnaíba, Piauí, Brazil

^g Área de Morfologia da Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília-UnB, Brasília, DF, Brazil



4-Experimental Surgery

Role of the route of leukotrienes in an experimental model of oral mucositis induced by 5-fluorouracil¹

Viviane Carvalho da Silvaⁱ, Renata Ferreira de Carvalho Leitãoⁱⁱ, Gerly Anne de Castro Britoⁱⁱ, Conceição da Silva Martinsⁱⁱ, Gildenio Estevam Freireⁱⁱⁱ, Karoline Saboia Aragão^{iv}, Carlos Wagner de Souza Wanderley^v, Marcos Rabelo de Freitas^{vi}



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical Pharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochempharm

Diminazene aceturate, an angiotensin-converting enzyme II activator, prevents gastric mucosal damage in mice: Role of the angiotensin-(1–7)/Mas receptor axis



Luan Kelves M. Souza^a, Lucas A.D. Nicolau^b, Nayara A. Sousa^c, Thiago S.L. Araújo^c, Francisca Beatriz M. Sousa^c, Douglas S. Costa^d, Fabiana M. Souza^d, Dvison M. Pacífico^e, Conceição S. Martins^e, Renan O. Silva^b, Marcellus H.L.P. Souza^b, Gilberto S. Cerqueira^a, Jand Venes R. Medeiros^{a,c,d,*}

^a Postgraduate Program in Biomedical Sciences, Federal University of Piauí, Parnaíba, Piauí, Brazil

^b Department of Physiology and Pharmacology, Laboratory of Pharmacology of Inflammation and Cancer (LAFICA), Federal University of Ceará, Fortaleza-CE, Brazil

^c Biotechnology and Biodiversity Center Research, BIOTEC, Postgraduate Program in Biotechnology, Federal University of Piauí, Parnaíba, Piauí, Brazil

^d Medical Base Research Center, NPPM, Postgraduate Program in Pharmacology, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil

^e Postgraduate Program in Morphofunctional Sciences, Department of Morphology, Faculty of Medicine, Federal University Ceará, Fortaleza-CE, Brazil



Contents lists available at ScienceDirect

Archives of Oral Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aob

Anti-inflammatory effect of a fatty acid mixture with high ω -9: ω -6 ratio and low ω -6: ω -3 ratio on rats submitted to dental extraction



Radamês Bezerra Melo^a, Paulo Goberlânio de Barros Silva^{b,*}, Reinaldo Barreto Oriá^c, José Ulisses de Souza Melo^d, Conceição da Silva Martins^c, Aline Matos Cunha^a, Paulo Roberto Leitão Vasconcelos^a

^a Department of Surgery, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^b Faculty of Dentistry, University Center Christus, Fortaleza, Ceará, Brazil

^c Department of Morphology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^d Faculty of Medicine, State University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijbiomac

Evaluation of anti-inflammatory potential of aqueous extract and polysaccharide fraction of *Thuja occidentalis* Linn. in mice



Irismaria S. Silva^{a,c}, Lucas A.D. Nicolau^{b,c}, Francisca B.M. Sousa^{a,c}, Simone de Araújo^{a,c}, Ana P. Oliveira^{a,c}, Thiago S.L. Araújo^{a,c}, Luan Kelves M. Souza^{a,c}, Conceição S. Martins^{e,c}, Pedro E.A. Aquino^{b,c}, Lucas L. Carvalho^{b,c}, Renan O. Silva^{b,c}, Pedro J. Rolim-Neto^{d,c}, Jand Venes R. Medeiros^{a,c,*}

^a Laboratory of Experimental Physiopharmacology, Federal University of Piauí, Parnaíba, Piauí, Brazil

^b Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

^c Post-graduation Program in Immunology, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

^d Technology Laboratory of Medicine, Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

^e Department of Morphofunctional Science, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil