



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

DEIZIANE VIANA DA SILVA COSTA

**PAPEL DA VIA DE SINALIZAÇÃO S100B/RAGE NA APOPTOSE E GLIOSE
REATIVA INDUZIDA PELAS TOXINAS A E B DO *Clostridioides difficile* EM
CÉLULAS GLIAIS ENTÉRICAS**

FORTALEZA

2019

DEIZIANE VIANA DA SILVA COSTA

**PAPEL DA VIA DE SINALIZAÇÃO S100B/RAGE NA APOPTOSE E GLIOSE
REATIVA INDUZIDA PELAS TOXINAS A E B DO *Clostridioides difficile* EM
CÉLULAS GLIAIS ENTÉRICAS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de doutor em Ciências Morfofuncionais. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais.

Orientadora: Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito

FORTALEZA
2019

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)

- C871p Costa, Deiziane Viana da Silva.
Papel da via de sinalização S100B/RAGE na apoptose e gliose reativa induzida pelas toxinas A e B do *Clostridioides difficile* em células gliais entéricas / Deiziane Viana da Silva Costa. – 2019.
164 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Gerly Anne de Castro Brito.
1. *Clostridium difficile*. 2. Sistema Nervoso Entérico. 3. Subunidade beta da Proteína Ligante de Cálcio S100. 4. Apoptose. 5. Interleucina-6. I. Título.

CDD 611

DEIZIANE VIANA DA SILVA COSTA

**PAPEL DA VIA DE SINALIZAÇÃO S100B/RAGE NA APOPTOSE E GLIOSE
REATIVA INDUZIDA PELAS TOXINAS A E B DO *Clostridioides difficile* EM
CÉLULAS GLIAIS ENTÉRICAS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de doutor em Ciências Morfofuncionais. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais.

Orientadora: Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Vivaldo Moura Neto
Unstituto Estadual do Cérebro Paulo Niemeyer (IECPN)

Prof. Dr. Armênio Aguiar dos Santos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Andrea Gonçalves Trentin
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Dr. Carlos Quesada Gómez
Universidade da Costa Rica (UCR)

À Deus

Que sabe tudo que é de melhor para a nossa vida, nos guiando em direção aos caminhos mais lindos que vão além do que imaginamos um dia!

À minha mãe (Maria José Viana) por todas as batalhas nessa vida, por todos os ensinamentos e por todo o apoio que me deste nesses 27 anos de vida.

Á minha irmã Daniely Viana por ser mais do que uma irmã, por ser minha grande amiga, com quem posso contar a qualquer momento. Muito obrigada por todo apoio que me deste!

À minha irmã Darlyane Viana por ser a pessoa mais guerreira que conheço nessa vida. Por me apoiar em minhas decisões e por dedicar uma parte do seu dia para conversar comigo, te amo!!!

Obrigada por me apoiarem nas minhas decisões e estarem comigo em todos os momentos de minha vida apesar da distância.

Ao meu pai por me proteger lá do céu. Pai, não consigo esquecer o dia que você nos deixou e foi morar com Deus. Mas com o meu peito cheio de saudade eu lembro os bons momentos que tivemos e sei que estás muito orgulhoso dessa conquista como todas as outras que o senhor pode presenciar em vida.

AGRADECIMENTOS

A caminhada, até aqui, não foi fácil, mas foi muito prazerosa. Muito obrigada Deus por me encher de bons sentimentos e me dar força para que eu conseguisse superar as batalhas dessa vida!

À minha mãe, Maria José, e minhas duas irmãs que são os meus tesouros nessa vida, Daniely Viana e Darlyane Viana por me apoiarem em todos os momentos de minha vida!

À Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito, por ser uma excelente orientadora desde a ideia do trabalho à finalização do mesmo. Por ter me dado a oportunidade de crescer como pessoa e profissionalmente tendo como base o seu exemplo. Por ser uma orientadora que permite que seus alunos pensem criticamente e desenvolvam habilidades científicas. Por ser como uma mãe para seus alunos, e como uma boa mãe participa ativamente de sua criação. Por sua humildade de não querer apenas alunos que aparentam ser brilhantes, e graças a isso, encontrei um laboratório que abriu as portas para mim, permitindo que eu aprendesse com os demais, aprendesse com os erros cometidos e aprendesse a aprender. Por ter me inspirado a gostar de estudar o sistema nervoso entérico e inflamação intestinal, bem como o *C. difficile*, sua linha de pesquisa favorita. Por ter me incentivar a fazer o doutorado sanduíche nos Estados Unidos, naquele período não sabia a magnificância e qual benéfico seria para o meu desenvolvimento pessoal e profissional. Agradeço ainda pela confiança depositada em mim nesses 5 anos e meio, juntando mestrado e doutorado. Agradecerei sempre e direi a quem perguntar que é a responsável por minha criação.

Ao Prof. Dr. Vivaldo Moura Neto, por ter compartilhado e colaborado com a ideia inicial desse projeto que se iniciou em 2014, quando investigamos o papel do S100B na morte de neurônios entéricos e ativação de células gliais entéricas induzidos por 5-FU. Por ter aberto as portas de seu laboratório (Laboratório de Morfogênese celular- LMC) para que eu pudesse iniciar um processo de capacitação em meu mestrado vendo outras formas de desenvolver pesquisa, pelo incentivo nessa caminhada e por ter aceitado a participar da banca de defesa dessa tese. Muitíssimo obrigada por tudo!

À Dra. Cirle Alcântara Warren por ter me recebido em seu laboratório da *University of Virginia* para desenvolver o projeto que foi proposto em minha tese de doutorado. Por toda a paciência na co-orientação do projeto e por compartilhar comigo sua expertise em *C. difficile*. Agradeço ainda pela confiança e por contribuir para meu crescimento profissional e pessoal.

Além disso, muito obrigado por ter confiado em mim me engajando em suas pesquisas e permitido que eu desenvolvesse duas outras pesquisas relacionadas ao *C. difficile*, incluindo um estudo clínico.

Ao David Bolick que não tenho palavras para agradecer por tudo que fizeste por mim. Por ter me incentivado e ajudado na execução do projeto no laboratório da *University of Virginia*. Por ter sido mais que um amigo, um pai, por todas as vezes que precisei de um ombro amigo para chorar devido à distância do meu verdadeiro habitat (Fortaleza) e quando os experimentos não funcionavam como esperado. Obrigado ainda por tornar o laboratório e a vida em Charlottesville mais do que um ambiente de trabalho. E que tenhamos muitos passeios no lago, competições de dança, sushi no Sushi King e futebol americano no campo do lado do laboratório, além de muitos experimentos semanais. Um brinde a tudo isso que vivemos nesses dois anos!!

Ao Dr. Richard Guerrant por ter me mostrado que a pesquisa, mesmo sendo básica, deve ser voltada para resolver um problema enfrentado pelos humanos. Por ter partilhado o seu entusiasmo no desenvolvimento da pesquisa. Por ser um grande exemplo de cientista.

À Professora Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão, pela participação na minha banca de qualificação de doutorado e por partilhar a sua experiência de vida e profissional no exterior. Muito obrigada por sempre reservar parte de seu tempo para compartilhar seus valiosos conhecimentos. Além de sua amizade e seus conselhos e pelo exemplo de pesquisadora, professora e pessoa.

Ao Prof. Dr. Armênio Aguiar, Prof. Dra. Andrea Tretin e Prof. Dr. Carlos Quesada-Gomez por aceitarem a participar dessa banca de defesa de doutorado.

Aos doutorandos Solanka Ellen Ledwaba (África do Sul) e Pedro Henrique Quintela Soares de Medeiros (Brasil) por partilharem seus conhecimentos e me ajudarem. Além de terem sido como irmãos para mim, podemos partilhar desde o laboratório ao apartamento onde moramos. Pedro, muito obrigada por ter me ajudado a me instalar em Charlottesville e por ter partilhado a sua fé, angústias e experiências de vida. Ellen, obrigada por compartilhar um pouco da sua cultura da África do Sul.

A Profa. Associada Glynis, ao doutorando John Moore e ao Dr. Jae Shin por compartilharem seus conhecimentos e tornarem o laboratório um ambiente agradável.

À minha irmã Darlyane Viana por ter despertado em mim a criatividade para desenhar, mesmo que não sejam perfeitos. Além de ser uma pessoa espetacular e que me mostra

como precisamos valorizar a vida independentemente das dificuldades. Te amo muito minha guerreira!!!!

À minha irmã Daniely Viana por ter me incentivado e ajudado na minha formação. Provavelmente, eu não teria evoluído no mundo científico, caso ela não tenha me ajudado a me dedicar apenas ao mestrado e doutorado. Sou eternamente grata por tudo minha irmã!!!!

À minha amiga Pós-doutoranda Conceição da Silva Martins (Josiane) por ter me apoiado ao longo dessa caminhada. Além de sua contribuição com os experimentos iniciais. Obrigada por sempre me apoiar e proteger!!

Ao mestrando Lauro Inácio de Moura Neto pela sua amizade e por sempre está disposto a ajudar. Muito obrigada!

A aluna de iniciação científica Angeline Holanda pelo apoio durante o seu estágio na *University of Virginia*.

Ao doutorando Gildênio pela sua amizade e sempre está disponível. Muito obrigada!!

À mestranda Izabela Hawro (Polônia), por compartilhar a sua maturidade, apesar de ser dois anos mais jovem do que eu, por estudar inglês comigo nas sextas-feiras após o laboratório, por compartilhar um pouco da sua cultura polonesa da forma mais diversificada e por ter sido uma grande amiga em Charlottesville.

À doutoranda Mônica Rodrigues (Brasil/São Paulo), À Dr. Sagal Mohamed (Somália/EUA), À doutoranda Rikhotso Xongile (África do Sul) e a mestre Rose Ita (Alemanha) por serem excelentes amigas para todas as horas. Muito obrigada pelo apoio e incentivo.

Aos meus amigos que cultivei durante esses dois anos em Charlottesville: Flávio Mesquita (SP/Brasil), André Landim (SP/Brasil), Naiara Santos (Paraná/Brazil), Zaqueu Ferreira (Paraná/Brazil), George (Brasil/Minas Gerais), Patryk Krakowiak (Polônia), Maria Murach (Polônia), Maria Eugenia Cortina (Argentina), (Elias Osteicoechea (Venezuela), Cory (EUA) Ivan Shabalin (Rússia), Waleska Saitz Rojas (Chile), Tshifhiwa Magoro (África do Sul), Faith Mary (Zimbabué), Maano Masiphephethu (África do Sul), Flor Martinez (Argentina), Naro Fiordalizzo (México), Rachel Zephyry Smith (EUA), Batabyal Tamal (India), Ankur Sarker (Bangladesh), Magdalena Woinska (Polônia),...Muito obrigada por partilharem suas experiências e por fazerem meus dias em Charlottesville leves.

Às técnicas de laboratório Maria do Socorro França Monte, Flávia de Araújo Silva Adalberto Júnior pelo processamento das amostras para a realização de imunohistoquímica e apoio diário.

À secretária Laisa Albuquerque Alves de Souza do programa de pós-graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará pela ajuda nas burocracias da tese.

À Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES)/PDSE pela bolsa de doutorado sanduíche.

À Fundação cearense de apoio ao desenvolvimento científico e tecnológico (FUNCAP) e ao conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico (CNPQ) pelo apoio financeiro necessário para o desenvolvimento deste estudo.

Muito obrigada a todos!!!!

“Se você quer alcançar algo,
Precisa ter dedicação total,
Buscar seu último limite
e dar o melhor de si”.

RESUMO

Papel da via de sinalização S100B/RAGE na apoptose e gliose reativa induzida pelas toxinas A e B do *Clostridioides difficile* em células glias entéricas

A infecção por *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) (ICD) continua a ser a causa mais comum de diarreia associada a antibióticos. As células glias entéricas (CGEs) estão envolvidas na regulação da motilidade intestinal, inflamação e integridade da barreira epitelial intestinal. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi investigar as alterações na expressão de S100B por CGEs em tecidos intestinais de pacientes com ICD, bem como em modelos de camundongos, e o papel da sinalização de S100B/RAGE na expressão de S100B e IL-6, bem como na apoptose, induzidas por TcdA e TcdB em CGEs. A expressão de S100B foi examinada por imunohistoquímica em biópsias do cólon de pacientes com ICD ativa, tecidos cecais de camundongos infectados com VPI10463 e alça ileal de camundongo tratados com TcdA. Linhagem de células enterogliais CRL2690 (ATCC), provenientes do jejuno de ratos, foram incubadas com TcdA e TcdB para avaliar a viabilidade celular por meio do ensaio de MTT, a morfologia celular e a apoptose por um ensaio em tempo real. A expressão gênica de S100B, RAGE e IL-6 foi avaliada por qPCR. Os níveis de S100B extracelular foram avaliados por ELISA. A ativação de NFκB e STAT3 foi avaliada por imunofluorescência. Para investigar o papel da sinalização S100B/RAGE nos efeitos promovidos por TcdA e TcdB em CGEs, Pentamidina, FPSZM1, LY294002 e Galielalactona foram adicionados uma hora antes da incubação com as toxinas na presença ou ausência da proteína S100B recombinante. A expressão de S100B foi significativamente aumentada no íleo de camundongos expostos à TcdA, no ceco de camundongos infectados com *C. difficile*, bem como em biopsias colônicas de pacientes com ICD ativa. TcdA e TcdB diminuíram significativamente a viabilidade de CGEs, induziram arredondamento e apoptose em CGEs, bem como aumentaram a expressão gênica de S100B e IL-6, a liberação de S100B e a ativação de NFκB e STAT-3 em CGEs, mas não aumentaram a expressão de RAGE em comparação com o grupo de células controle. A pentamidina (10μM), um inibidor de S100B, suprimiu a expressão de S100B e IL-6 induzida por TcdA, mas não por TcdB. O FPSZM1 (30μM), um antagonista de RAGE, diminuiu significativamente a expressão gênica de IL-6 e S100B induzida por TcdA e TcdB em CGEs, bem como a apoptose induzida por TcdA. Enquanto o LY294002 (10μM), um inibidor de PI3K, diminuiu a expressão de IL-6, mas não a de S100B, induzida por ambas as toxinas. A galielalactona (10μM), um inibidor STAT-3, reduziu significativamente a expressão do gene S100B induzido por TcdA e TcdB, bem como a sua liberação e apoptose em CGEs. No entanto, a galielalactona foi incapaz de prevenir a apoptose induzida por TcdA e TcdB em CGEs na presença da proteína S100B (0,5 e 5μM). Além disso, S100B (0,5 e 5μM) estimulou a apoptose em CGEs de forma direta. Nossos achados sugerem que a sinalização S100B/RAGE/PI3K/NFκB está envolvida na expressão de IL-6 induzida por TcdA e TcdB. Adicionalmente, a via S100B/RAGE/STAT3 está envolvida na expressão de S100B e IL-6 e apoptose induzida por TcdB e expressão de S100B e apoptose induzida por TcdA. Um importante achado evidenciado no presente estudo é que apoptose induzida por TcdB parece ser mediada por S100B/STAT-3 de uma maneira independente de RAGE.

Palavras-chave: *Clostridium difficile*; Sistema nervoso entérico; Subunidade beta da proteína ligante de cálcio S100; Apoptose; Interleucina-6.

ABSTRACT

Role of S100B/RAGE signaling pathway in apoptosis and reactive gliosis induced by *Clostridioides difficile* toxins A and B in enteric glial cells

Clostridioides difficile (*C. difficile*) infection (CDI) continues to be the most common cause of antibiotic-associated diarrhea. EGCs is involved in intestinal motility, inflammation, and barrier function. We investigated the alterations in enteric glial cell-derived S100B expression in intestinal tissues from patients with CDI, as well as, in the mouse models, and the role of S100B signaling in TcdA and TcdB-induced S100B and IL-6 expression and apoptosis in EGCs. Expression of S100B was examined by immunohistochemistry in colonic biopsies from patients with active CDI, cecal tissues of VPI10463-infected mice and mouse ileal loop treated with TcdA. Rat EGC line CRL2690 (ATCC) was incubated with TcdA and TcdB to evaluate cell viability through MTT assay, cell morphology and apoptosis by a live-cell real-time assay. Gene expression of S100B, RAGE and IL-6 was performed by qPCR. The levels of extracellular S100B were evaluated by ELISA. NF κ B and STAT3 activation was evaluated by immunofluorescence. To investigate the role of S100B/RAGE signaling, EGCs were incubated with Pentamidine, FPSZM1, LY294002 and Galiellalactone 1h before toxins challenge in presence or absence of recombinant S100B protein. S100B expression was significantly increased in mouse ileal loop tissue treated with TcdA, in cecal tissues from *C. difficile*-infected mice, as well as, in colonic biopsies from patients with active CDI. TcdA and TcdB significantly decreased EGC viability, induced EGC rounding and apoptosis, as well as upregulated S100B and IL-6 gene expression, increased S100B release and induced NF κ B and STAT-3 activation in EGCs, but did not increase RAGE expression compared with control cells. Pentamidine, a S100B inhibitor, suppressed TcdA, but not TcdB-induced S100B and IL-6 expression. FPSZM1, a RAGE antagonist, significantly decreased TcdB and TcdA-induced IL-6 and S100B gene expression in EGCs, as well as, TcdA-induced apoptosis. Whereas LY294002, a PI3K inhibitor, decreased IL-6 expression, but not S100B, induced by both toxins. Galiellalactone (10 μ M), a STAT-3 inhibitor, significantly reduced TcdB and TcdA-induced S100B gene expression, as well as its release, and apoptosis on EGCs. However, galiellalactone was unable to prevent apoptosis induced by TcdA and TcdB on EGCs in presence of S100B protein (0.5 and 5 μ M). In addition, S100B (0.5 and 5 μ M) induced apoptosis on EGCs by itself. Our findings suggest that S100B/RAGE/PI3K/NF κ B signaling is involved in TcdA and TcdB-induced IL-6. In addition, S100B/RAGE/STAT-3 pathway is involved in TcdB-induced S100B and IL-6 expression and TcdA-induced S100B expression and apoptosis. Whereas apoptosis induced by TcdB appears to be mediated by S100B/STAT-3 in a RAGE-independent manner.

Keywords: *Clostridium difficile*; Enteric nervous system; S100 calcium binding protein beta subunit; Interleukin-6; Apoptosis.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	- Sondas Taqman e primers para amostras de camundongos utilizadas no qPCR.....	75
Quadro 2	- Primers para amostras de ratos utilizadas no qPCR.....	84

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- <i>Clostridioides difficile</i>	30
Figura 2	- Transmissão, colonização e proliferação de <i>C. difficile</i> após antibioticoterapia.....	32
Figura 3	- Resposta das células do hospedeiro aos fatores de virulência do <i>C. difficile</i>	33
Figura 4	- Mapa genético dos locos das toxinas em <i>C. difficile</i>	35
Figura 5	- Estrutura e função das TcdA e TcdB.....	37
Figura 6	- Efeito de TcdA e TcdB em células do sistema imune e em células epiteliais.....	42
Figura 7	- Embriologia do sistema nervoso entérico.....	44
Figura 8	- Estrutura do intestino e distribuição dos plexos mucoso, submucoso e mioentérico.....	46
Figura 9	- Tipos de células gliais entéricas baseado nos seus aspectos morfológicos.....	48
Figura 10	- Desenvolvimento pós-natal das CGEs da mucosa.....	49
Figura 11	- Classificação das CGEs de acordo com a sua localização no intestino.....	50
Figura 12	- Representação esquemática do motif EF-hand.....	53
Figura 13	- Estrutura do receptor RAGE.....	55
Figura 14	- Mecanismo de ativação e regulação de RAGE.....	57
Figura 15	- Efeito da ativação do receptor RAGE por S100B em diferentes células.....	58
Figura 16	- Esquema de indução do modelo de ICD e protocolo experimental.....	68
Figura 17	- Esquema de alça ileal para indução de ileíte pela administração de TcdA e protocolo experimental.....	70
Figura 18	- Esquema de tratamento das CGEs com TcdA e TcdB e protocolo experimental.....	75
Figura 19	- Esquema de tratamento de CGEs com moduladores da via S100B/RAGE na presença de TcdA e protocolo experimental.....	76

Figura 20	- Esquema de tratamento de CGEs com moduladores da via S100B/RAGE na presença de TcdB e protocolo experimental.....	77
Figura 21	- Esquema de tratamento de CGEs com galielalactona na presença de TcdA e TcdB e/ou proteína S100B recombinante e protocolo experimental.....	78
Figura 22	- Esquema de tratamento de CGEs com galielalactona na presença de TcdA e TcdB e/ou proteína S100B recombinante e protocolo experimental.....	79
Figura 23	- ICD aumenta a imunomarcagem de S100B no cólon de pacientes.....	87
Figura 24	- ICD e TcdA aumentam a imunomarcagem para S100B no ceco e íleo de camundongos respectivamente.....	89
Figura 25	- ICD e TcdA aumentam a imunomarcagem para GFAP no ceco e íleo de camundongos respectivamente.....	91
Figura 26	- TcdA eleva a expressão gênica dos fatores gliais S100B, GFAP e GDNF no íleo de camundongos.....	92
Figura 27	- TcdA e TcdB reduzem a viabilidade de CGEs.....	94
Figura 28	- Efeito da TcdA na morfologia de CGEs.....	95
Figura 29	- Efeito da TcdB na morfologia de CGEs.....	96
Figura 30	- TcdA e TcdB induzem apoptose em CGEs.....	97
Figura 31	- TcdA e TcdB induzem secreção de S100B em CGEs.....	99
Figura 32	- TcdA e TcdB suprarregulam S100B em CGEs.....	100
Figura 33	- Efeito das TcdA e TcdB nos níveis de S100B intracelular em CGEs.....	101
Figura 34	- Efeito das TcdA e TcdB na expressão de GDNF e GFAP em CGEs.....	102
Figura 35	- TcdA e TcdB suprarregulam IL-6 em CGEs.....	104
Figura 36	- Correlação entre a expressão gênica de S100B e IL-6 induzida por TcdA e TcdB em CGEs.....	106
Figura 37	- TcdA e TcdB aumentam a translocação nuclear de NFκBp65 em CGEs.....	108
Figura 38	- Efeito da Pentamidina, um inibidor de S100B, na viabilidade de CGEs.....	110
Figura 39	- Inibidor de S100B reverte a suprarregulação de S100B e IL-6 induzidas por TcdA, mas não por TcdB, em CGEs.....	111

Figura 40	- CGEs expressam o receptor RAGE, mas TcdA e TcdB não alteram a sua expressão gênica.....	113
Figura 41	- Efeito do FPSZM1, um antagonista do receptor RAGE, na viabilidade de CGEs.....	114
Figura 42	- Antagonista do receptor RAGE (FPSZM1 1 e 10 μ M) não reverte a suprarregulação de S100B e IL-6 induzidas por TcdA e TcdB em CGEs.....	115
Figura 43	- Antagonista do receptor RAGE (FPSZM1 30 μ M) reduz a suprarregulação de S100B e IL-6, bem como a secreção de S100B, induzidas por TcdA e TcdB em CGEs.....	116
Figura 44	- Antagonista do receptor RAGE (FPSZM1 30 μ M) diminui a apoptose induzida por TcdA e TcdB em CGEs.....	117
Figura 45	- Efeito do LY294002, um inibidor de PI3K, na viabilidade de CGEs.....	119
Figura 46	- Inibidor de PI3K diminui a suprarregulação de IL-6, mas não a de S100B, induzida por TcdA e TcdB em CGEs.....	120
Figura 47	- Inibidor de PI3K aumenta a apoptose induzida por TcdA e TcdB em CGEs.....	121
Figura 48	- TcdA e TcdB aumentam a translocação nuclear de STAT3 em CGEs...	124
Figura 49	- Efeito da galielalactona, um inibidor de STAT3, na viabilidade de CGEs.....	125
Figura 50	- Inibidor de STAT3 reverte a suprarregulação de S100B, bem como a sua liberação, induzida por TcdA e TcdB e diminui a de IL-6 induzida por TcdB em CGEs.....	125
Figura 51	- Inibidor de STAT3 diminui a apoptose induzida por TcdA e TcdB em CGEs.....	127
Figura 52	- S100B estimula a apoptose em CGEs.....	129
Figura 53	- Reposição de S100B inibe o efeito antiapóptico do inibidor de STAT3 em CGEs expostas à TcdA e TcdB.....	130
Figura 54	- Modelo esquemático do mecanismo TcdA e TcdB em CGEs.....	139

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus centígrados
μL	Microlitro
μg	Micrograma
μmol	Micromol
15d-PGJ2	15-deoxi-Δ ^{12,14} -prostaglandina J2
15-HETE	15-hidroxieicosatetraenoico
5-HT	Serotonina
AChE	Acetilcolinesterase
ADAM10	Desintegrina e metaloproteinase 10
AKT	Serina-treonina quinase
Aldh1L1	Membro da família L1 da aldeído desidrogenase 1
AMPK	Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina
ANOVA	Análise de variância
AP-1	Proteína ativadora-1
AT1	Receptor de angiotensina II do subtipo 1
ATP	Trifosfato de adenosina
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BHI	Caldo de infusão de cérebro e coração
Ca ²⁺	Cálcio
CCL19	Quimiocina (C-C motif) ligante-19
CCR7	Receptor de quimiocina C-C do tipo 7
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridioides difficile</i>
DNAc	Ácido desoxirribonucléico complementar

CDT	Toxina binária do <i>Clostridioides difficile</i>
cdtA	Gene que codifica a subunidade ligante A da toxina binária
CdtA	Proteína correspondente à subunidade ligante A da toxina binária
CdtB	Gene que codifica a subunidade ligante B da toxina binária
CdtB	Proteína correspondente à subunidade ligante B da toxina binária
CdtLoc	Locus da toxina binária
CdtR	Gene que codifica CdtR
CEPA	Comissão de ética em pesquisa animal
CGEs	Células gliais entéricas
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
ChaT	Colina acetiltransferase
cm	Centímetro
CO	Monóxido de carbono
COX-2	Ciclooxigenase-2
CROPS	do inglês “combined repetitive oligopeptides” (oligopeptídeos repetitivos combinados)
CSPG4	do inglês “chondroitin sulfate proteoglycan 4” (proteoglicano sulfato de condroitina-4)
CX3CR1	Receptor de quimiocina do motif C-X3-C-1
CX3CL1	Ligante de quimiocina do motif C-X3-C -1
CXCL-2	Ligante de quimiocina do motif CXC- -2
CXCL-4	Ligante de quimiocina do motif CXC -4
DAB	Diaminobenzidina
DAMP	Padrão molecular associado a dano
DAP	Domínio autoproteolítico
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol
DGT	Domínio glicosiltransferase
DLR	Domínio de ligação ao receptor

DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase	Desoxirribonuclease
DSS	Sulfato de sódio dextrano
DT	Domínio de translocação
EDN3	Endotelina-3
EDNRB	Receptor de endotelina B
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
ELISA	Ensaio imunoenzimático
ENC	Encefalinas
EPM	Erro padrão da média
ERK	Quinase reguladora de sinais extracelulares
<i>et al</i>	E colaboradores
FasL	Ligante de Faz
FPG	Fragmentos de petideoglicano
FZD	receptor <i>Frizzled</i>
GADD45 α	Gene 45 α indutor de dano ao DNA e interrupção do crescimento
GAP43	Proteína associada ao crescimento 43
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
G-CSF	Fator estimulador de colônias granulocitária
GDNF	Fator neurotrófico derivado de células gliais
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
GFR α 1	Receptor α 1 da família de GDNF
GSH	Glutationa reduzida
GSK-3 β	Glicogênio sintase quinase-3 β
GSNO	S-nitrosoglutationa
GTPase	Guanosina trifosfatase

H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
H&E	Hematoxilina e eosina
HMGB1	Grupo de alta mobilidade Box 1
IκB	Proteína inibitória kappa B
IA	Intestino anterior
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
ICD	Infecção por <i>Clostridioides difficile</i>
IEC-6	Células epiteliais intestinais-6
IgA	imunoglobulina A
IgG	imunoglobulina G
IL-1β	Interleucina -1β
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-18	Interleucina-18
IL-23	Interleucina-23
IM	Intestino médio
INF-γ	Interferon gama
Inos	Óxido nítrico sintase induzida
i.p.	Intraperitoneal
InsP6	Inositol-hexaquisfosfato
IP	Intestino posterior
JNK	C-JUN kinase aminoterminal
kDa	KiloDalton
KCl	Cloreto de potássio
Kg	Kilograma

LEICA	Sistema de aquisição de imagens
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
M2	Receptor muscarínico do tipo 2
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MDA	Malondialdeído
mDia1	<i>Diaphanous-1</i>
mg	Miligrama
MHC II	Complexo principal de histocompatibilidade de classe II
Min	Minuto
mL	Mililitro
MMP	Metaloproteinases
MIP-1 α	Proteína inflamatória derivada de macrófagos-1 α
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio
MYD88	Resposta primária de diferenciação mielóide 88
N	Número
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NAP	do inglês “North American pulsotype” (Pulsotipo americano)
NAP1v	Pulsotipo americano-1 variante
NF κ B	Fator de transcrição nuclear- κ B
NK1	Neurocinina-1
NOS	Óxido nítrico sintase
NOD	Do inglês “ <i>nucleotide-binding oligomerisation</i> ” (Domínio de oligomerização ligante de nucleotídeo)
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOx	Metabólitos de óxido nítrico

NPY	Neuropeptídeo Y
P	Página
PaLoc	Locus de patogenicidade
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia de polimerase
Pg	Picograma
PGD2	Prostaglandina D2
PGE2	Prostaglandina E2
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PMLC	Cadeia leve de miosina fosforilada
PPAR- γ	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma-gama
proEGF	Pró-fator de crescimento epidérmico
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
PVRL3	do inglês “poliovirus receptor-like protein 3” (proteína relacionada ao receptor de poliovírus-3)
qPCR	Reação em cadeia de polimerase em tempo real
RAGE	Receptor de produtos finais de glicação avançada
RET	Receptor de tirosina quinase
RNA	Acido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
RNase	Ribonuclease
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPM	Rotações por minuto
RT027	Ribotipo 027
S100 β	Fração beta da proteína S100
SDS	Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE	Proteínas em gel de poliacrilamida-SDS
SF	Soro fisiológico
S-layer	camada S
SlpA	proteína de superfície A
SNC	Sistema nervoso central
SNE	Sistema nervoso entérico
SOX10	SRY- <i>box</i> 10
sRAGE	Região do RAGE de ligação para o ligante extracelular
SP	Substância P
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TcdA	Toxina A do <i>Clostridioides difficile</i>
tcdA	Gene que codifica o RNAm da Toxina A do <i>Clostridioides difficile</i>
TcdB	Toxina B do <i>Clostridioides difficile</i>
tcdB	Gene que codifica o RNAm da Toxina B do <i>Clostridioides difficile</i>
tcdC	Gene que codifica TcdC
tcdE	Gene que codifica um holin do bacteriófago
tcdR	Gene que codifica um fator sigma da RNA polimerase
TGF- β	Fator de crescimento transformador- β
TK	Tirosina quinase
TLRs	Receptores toll-like
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
TRPV-1	Receptor de potencial transiente vaniloide do tipo 1
TUJ1	Classe de β -tubulina III específica de neurônios
UFC	Unidades formadoras de colônias
V	Volume
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

VIP	Polipeptídeo intestinal vasoativo
Wnt	Wingless
Zn ²⁺	Zinco
ZO-1	Zônulas de oclusão-1

LISTA DE SÍMBOLOS

A	Alfa
B	Beta
K	Kappa
Γ	Gama
σ	Sigma
Δ	Delta
®	Marca registrada
+	Mais
±	Mais ou menos
%	Porcentagem
&	E

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	29
1.1	<i>Clostridioides difficile</i>	29
1.2	Toxinas do <i>C. difficile</i>	34
1.3	TcdA e TcdB: Patogênese da lesão intestinal e mecanismo da lesão celular.....	38
1.4	Sistema nervoso entérico.....	43
1.5	Célula glial entérica (CGE).....	47
1.6	Via S100B/RAGE.....	53
1.7	Sistema nervoso entérico e doenças inflamatórias intestinais.....	60
2	RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....	63
3	OBJETIVO.....	65
3.1	Objetivo geral.....	65
3.2	Objetivos específicos.....	65
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	66
4.1	Fármacos, reagentes, materiais e soluções utilizados no estudo.....	66
4.2	Experimentos com biópsias humanas e em camundongos.....	66
4.2.1	Amostras clínicas.....	66
4.2.2	Aspectos éticos em pesquisa animal.....	66
4.2.3	Animais.....	66
4.2.4	Preparação da bactéria.....	67
4.2.5	Modelo de infecção por <i>C. difficile</i>	67
4.2.6	Grupos experimentais para o modelo de infecção.....	67
4.2.7	Modelo de ileíte induzida por TcdA.....	68
4.2.8	Grupos experimentais para o modelo de lesão ileal induzida pela TcdA.....	69
4.2.9	Parâmetros avaliados.....	70
4.2.9.1	Imunohistoquímica.....	70
4.2.9.2	Expressão Gênica de S100B, GFAP e GDNF por qPCR.....	72
4.2.9.2.1	Preparação das amostras.....	72
4.2.9.2.2	Extração do RNA.....	72
4.2.9.2.3	Síntese do cDNA.....	73

4.2.9.2.4	PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....	73
4.3	Experimentos <i>in vitro</i> em linhagem de CGEs.....	74
4.3.1	Cultura de CGEs.....	74
4.3.2	Administração de toxinas, fármacos e proteína em CGEs.....	75
4.3.3	Parametros avaliados.....	79
4.3.3.1	Ensaio de viabilidade celular.....	79
4.3.3.2	Avaliação da morfologia celular.....	80
4.3.3.3	Ensaio de apoptose.....	80
4.3.3.4	Dosagem dos níveis de S100B.....	81
4.3.3.5	Avaliação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias.....	81
4.3.3.6	Expressão Gênica de S100B, GFAP, GDNF, IL-6 e RAGE por qPCR.....	82
4.3.3.7	Avaliação da expressão proteica de S100B intracelular e fração nuclear de NFκBp65.....	83
4.3.3.8	Imunofluorescência para NFκBp65 e pSTAT3.....	84
4.4	Análise estatística.....	85
5	RESULTADOS.....	86
5.1	Alterações da expressão de S100B em biopsias colônicas de pacientes com ICD.....	86
5.2	Alterações de fatores gliais em modelo experimental de ICD e ileíte induzida pela TcdA.....	88
5.2.1	Alterações da expressão de S100B no intestino de camundongos submetidos ao modelo experimental de ICD e ileíte induzida pela TcdA.....	88
5.2.2	Alterações da expressão de GFAP no intestino de camundongos submetidos ao modelo experimental de ICD e ileíte induzida pela TcdA.....	90
5.2.3	Alterações da expressão gênica de fatores gliais em modelo de ileíte induzida pela TcdA.....	92
5.3	Efeito da TcdA e TcdB em linhagem de CGEs.....	93
5.3.1	Alterações da viabilidade e morfologia de CGEs induzidas por TcdA e TcdB.....	93
5.3.2	Efeito das TcdA e TcdB na apoptose de CGEs.....	97
5.3.3	Efeito de TcdA e TcdB na secreção de S100B e expressão de fatores gliais em CGEs.....	98

5.3.4	Efeito das TcdA e TcdB na expressão de IL-6 e outras citocinas pró-inflamatórias em CGEs.....	103
5.3.5	Correlação entre a expressão de IL-6 e S100B induzida por TcdA e TcdB em CGEs.....	105
5.3.6	Efeito das TcdA e TcdB na ativação de NFκB em CGEs.....	107
5.3.7	Participação da sinalização S100B/RAGE na expressão gênica de S100B e IL-6, bem como na secreção de S100B, e apoptose induzidos por TcdA e TcdB em CGEs.....	109
5.3.7.1	Efeito do inibidor de S100B na expressão de S100B e IL-6 induzidos por TcdA e TcdB em CGEs.....	109
5.3.7.2	Efeito do antagonista do receptor RAGE na expressão de S100B e IL-6, secreção de S100B e apoptose induzidos por TcdA e TcdB em CGEs.....	112
5.3.7.3	Efeito do inibidor de PI3K na expressão de S100B e IL-6 e apoptose induzidos por TcdA e TcdB em CGEs.....	118
5.3.7.4	Efeito do inibidor de STAT3 na expressão de S100B e IL-6 e apoptose induzidas por TcdA e TcdB em CGEs.....	122
5.3.7.5	Participação de S100B no efeito antiapoptótico do inibidor de STAT3 em CGEs expostas a TcdA e TcdB.....	126
6	DISCUSSÃO.....	131
7	CONCLUSÕES.....	140
	REFERÊNCIAS.....	141
	APÊNDICE A.....	161

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Clostridioides difficile*

A incidência da infecção por *Clostridioides difficile* (*C. difficile*), ICD, tem aumentado em todo o mundo. Nos Estados Unidos (EUA), o número de casos aumentou acentuadamente nos anos de 2000 até 2011, atingindo, desde então, um platô. Em hospitais da Europa, sete casos de ICD ocorrem a cada 10,000 pacientes (PEERY *et al.*, 2019; DAVIES *et al.*, 2014). Estudo realizado em um hospital da China isolou *C. difficile* em 12,8% das amostras fecais de pacientes com diarreia (ZHOU *et al.*, 2019). Em hospital da Costa Rica 9,6% de cepas de *C. difficile* toxigênicas foram isoladas a partir de amostras fecais de pacientes adultos coletadas no período de 2010 a 2012 (LÓPEZ-URENA *et al.*, 2016). Em três hospitais da Colômbia, uma incidência de 7-17,9% de *C. difficile* foi identificada (SALAZAR *et al.*, 2017).

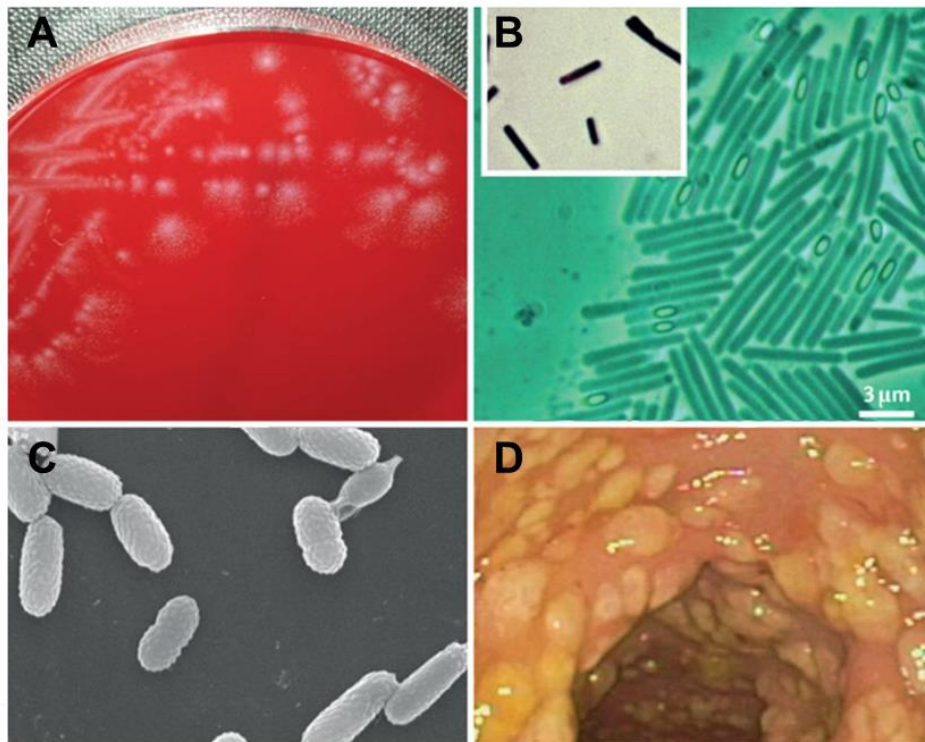
No Brasil, a identificação de *C. difficile* como causador de diarreia tem aumentado crescentemente. Um trabalho realizado em hospital do Rio de Janeiro detectou espécies de *C. difficile* em 28,5% de amostras de fezes de pacientes com imunossupressão (BALASSIANO *et al.*, 2009). Em outro hospital dessa mesma cidade, uma incidência de 5,4% nesse mesmo perfil de pacientes foi identificada (SECCO *et al.*, 2014). Uma pesquisa realizada com pacientes adultos de um hospital de Porto Alegre mostrou 6,8 % de *C. difficile* em amostras fecais. Enquanto que em hospital de Minas Gerais, *C. difficile* foi identificado em 31.8% de amostras fecais de pacientes com diarreia associada ao uso de antibióticos (LOPES-CANÇADO *et al.*, 2018).

Até 2013, a literatura disponível não continha dados a respeito da incidência da doença induzida pelo *C. difficile* no nordeste do Brasil, com exceção de estudo no Hospital Universitário Walter Cantídio que cita um achado de colite pseudomembranosa e positividade das amostras de fezes para toxina A do *C. difficile* (TcdA) em 18,75% dos pacientes com diarreia internados no setor de hematologia desse hospital no período de 1991-1993 (MESQUITA *et al.*, 2011). No nordeste, nosso grupo de pesquisa foi um dos pioneiros em pesquisar a incidência e identificar cepas de *C. difficile* em hospital de tratamento oncológico do Ceará (COSTA *et al.*, 2017, 2016, 2014). Até então, uma incidência de 48% de diarreia associada ao *C. difficile* foi identificada em hospital oncológico cearense (COSTA *et al.*, 2017).

Um aspecto preocupante na infecção por *C. difficile* é a recorrência da doença que ocorre aproximadamente 8 semanas após a infecção em cerca de 6 a 25% dos pacientes, com custo anual em torno de 2,8 bilhões de dólares (HOPKINS; WILSON, 2018; JOHNSON, 2009; KELLY, 2012; KYNE; KELLY, 2001). Pacientes com pelo menos uma recorrência tem cerca de 45% e 65% de chance de ter a segunda e a terceira recorrência, respectivamente (McFARLAND; ELMER; SURAWICZ, 2002). Geralmente, o mesmo tipo de cepa é responsável pela recorrência da doença (CHEN *et al.*, 2015).

A primeira cepa de *C. difficile*, conhecida anteriormente como *Clostridium difficile*, foi isolada em 1935 por Hall e O'Toole a partir de amostra fecal de neonato saudável (HOPKINS; WILSON, 2018; HALL; O'TOOLE, 1935). *C. difficile* é um bacilo gram positivo anaeróbio estrito formador de esporos (SMITS *et al.*, 2016) (figura 1).

Figura 1- *Clostridioides difficile*



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

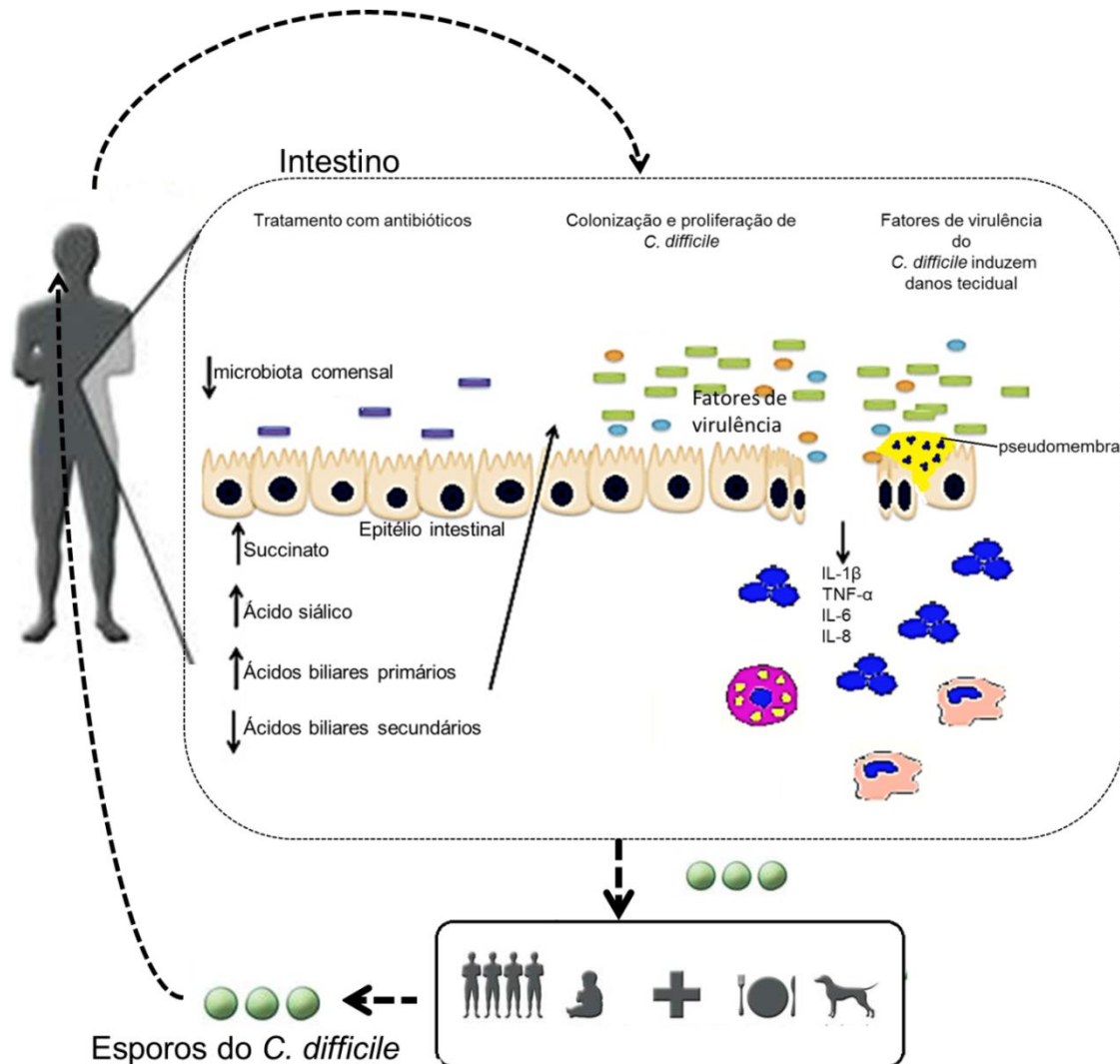
C. difficile é uma espécie geneticamente diversa, abrangendo cepas não patogênicas e patogênicas (produtoras de toxinas). As cepas de *C. difficile* patogênicas são uma das maiores causadoras de diarreia nosocomial (MARTIN; MONAGHAN; WILCOX, 2016; SMITS *et al.*, 2016).

A forma de transmissão de *C. difficile* é via fecal-oral ou via de contato com superfícies ou mãos contaminadas com os esporos dessa bactéria. Esses esporos podem ser facilmente encontrados em superfícies que foram previamente contaminadas por serem resistentes a diferenças de temperatura, ao congelamento, à irradiação e a uma variedade de soluções antissépticas como, por exemplo, os géis contendo álcool (HOPKINS; WILSON, 2018; BEST *et al.*, 2010). Os esporos de *C. difficile* também podem ser disseminados por meio de neonatos advindos das unidades de terapia intensiva, água, alimentos e animais domésticos, como cachorros (RABOLD *et al.*, 2018; SEEKATZ; YOUNG, 2014).

Apenas a aquisição dos esporos não é suficiente para causar a doença por *C. difficile*. Após adquirir esses esporos, os fatores de riscos para a aquisição de ICD incluem: idade (≥ 65 anos), sexo feminino, comorbidades (doença renal crônica, diabetes melitus, leucemia, câncer e doença inflamatória intestinal), hospitalização, dieta enteral por sonda nasogástrica e imunossupressão. Ademais, o uso de fármacos como antibióticos, inibidores de bomba de prótons, anti-inflamatórios não esteroidais e uso de ópioides contribuem para o desenvolvimento de ICD (EZE *et al.*, 2017).

Um dos maiores fatores associados ao surgimento da ICD é o uso de antibióticos, como, por exemplo, clindamicina e moxifloxacino. Estes alteram a microbiota intestinal, ocasionando redução de ácidos biliares secundários (litocolato e deoxicolato) e aumento de ácidos biliares primários (taurocolato, colato e quenodeoxicolato), propiciando, assim, a eclosão dos esporos, proliferação de bacilos do *C. difficile* e liberação de seus fatores de virulência (WEINGARDEN *et al.*, 2016). Estes, por sua vez, levam a ruptura da barreira epitelial intestinal e ativação do sistema imune (BUONOMO; PETRI, 2016; SEEKATZ; YOUNG, 2014) (figura 2).

Figura 2- Transmissão, colonização e proliferação de *C. difficile* após antibioticoterapia

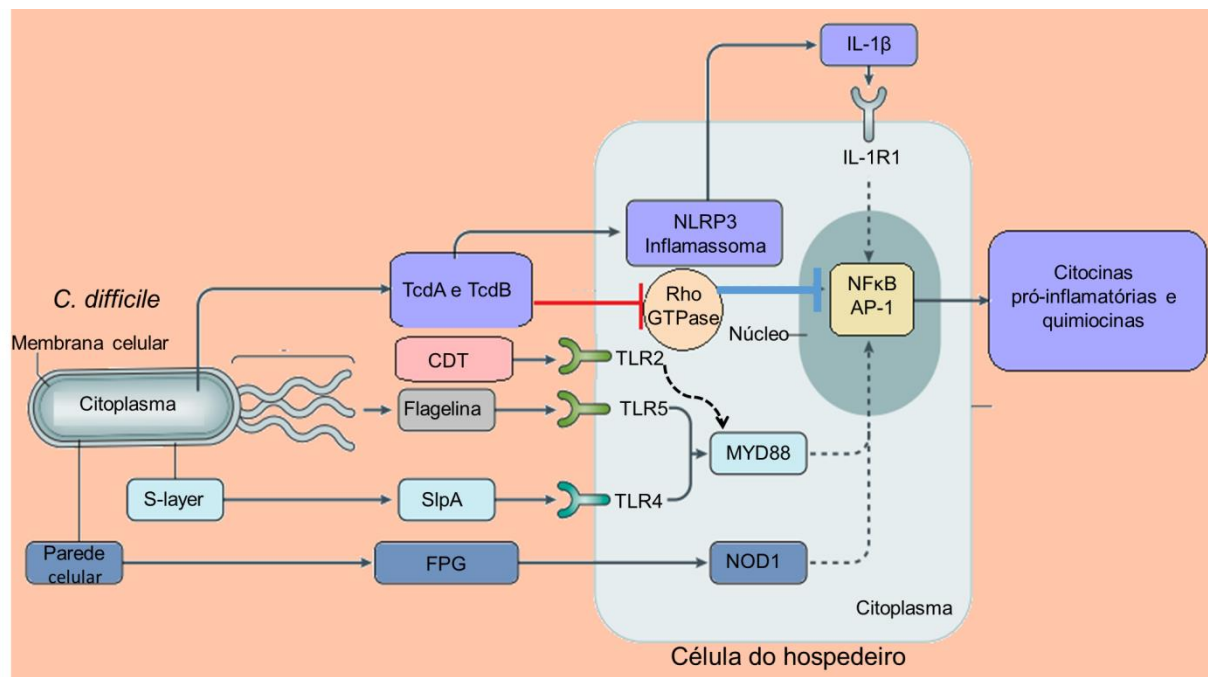


Fonte: Adaptado de Buonomo *et al.* (2016) e Seekatz e Young (2014). Os esporos do *C. difficile* são transmitidos por via oral por meio de fezes de humanos ou neonatos com hospitalização prévia, água, alimentos e cachorros que foram contaminados com os esporos. O uso de antibióticos reduz a microbiota intestinal, aumentando a disponibilidade de nutrientes e a produção de ácidos biliares primários, bem como reduzindo a produção de ácidos biliares secundários. Estes, por sua vez, tornam o lúmen intestinal um ambiente propício para a germinação dos esporos, proliferação da forma vegetativa do *C. difficile* e liberação de seus fatores de virulência, que causam ruptura do epitélio intestinal, recrutamento e ativação de células do sistema imune. O recrutamento exacerbado de neutrófilos contribui para a formação de pseudomembranas. Uma vez infectado, esse indivíduo pode ser uma fonte de esporos.

Ao germinar e proliferar, o *C. difficile* pode liberar diversos fatores de virulência que podem contribuir para a resposta das células do hospedeiro a essa bactéria. Dentre esses

fatores de virulência estão as proteínas localizadas na camada S (S-layer), que inclui a proteína de superfície A (SlpA), fragmentos de peptidoglicano (FPG), flagelina e toxinas. As principais toxinas produzidas pelo *C. difficile* são TcdA e toxina B (TcdB). Algumas cepas de *C. difficile* como as do ribotipo 027 e 078, as denominadas cepas hipervirulentas associadas com pior prognóstico, produzem a toxina binária (CDT) (COWARDIN *et al.*, 2016; JANOIR, 2016; SMITS *et al.*, 2016). Por meio de distintos mecanismos de ação, todos esses fatores de virulência podem induzir a ativação do fator de transcrição nuclear κ B (NF κ B) e da proteína ativadora-1 (AP-1) resultando na suprarregulação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (SMITS *et al.*, 2016) (figura 3).

Figura 3- Resposta das células do hospedeiro aos fatores de virulência do *C. difficile*



Fonte: Adaptado de Smits *et al.* (2016). O *C. difficile* apresenta diversos fatores de virulência como: toxina A (TcdA), B (TcdB) e binária (CDT); flagelina, proteína de superfície A (SlpA), uma proteína localizada na camada S (*S-layer*) e fragmento de peptidoglicano (FPG). TcdA e TcdB inativam as Rho GTPases, que atuam inibindo o fator de transcrição nuclear κ B (NF κ B) e a proteína ativadora-1 (AP-1), e ativando o inflamassoma. Este, por sua vez, estimula a liberação de IL-1 β que se liga ao receptor IL-1R1, ativando também os fatores de transcrição NF κ B e AP-1. Estes, uma vez ativados, promovem a expressão de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. Estes dois fatores de transcrição também podem ser ativados por CDT, flagelina, SlpA e FPG via interação com receptores toll-like 2 (TLR2), TLR5, TLR4 e domínio de oligomerização ligante de nucleotídeo-1 (NOD1), respectivamente. A molécula de resposta primária de diferenciação mielóide 88 (MYD88) medeia a ativação de NF κ B e AP-1 pela ativação dos receptores TLRs.

As manifestações clínicas da infecção por essa bactéria variam de diarreia à colite pseudomembranosa, podendo também levar a morte (RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2004).

As opções terapêuticas para o tratamento da ICD incluem antibioticoterapia, transplante fecal, probióticos e anticorpos monoclonais. A antibioticoterapia consiste em metronidazol e vancomicina. Apesar de o metronidazol ser amplamente usado em vários países, como no Brasil, como fármaco de primeira escolha para o tratamento da ICD, seu uso tem sido reduzido nos EUA, por menor resposta, sendo substituído por vancomicina. Outros antibióticos, como fidaxomicina, tigeciclina e rifaximin, são prescritos para casos de diarreia recorrente por *C. difficile* por serem mais efetivos. No entanto, o transplante fecal, geralmente após o tratamento com os antibióticos, tem sido uma das melhores alternativas para esses casos (HOPKINS; WILSON, 2018).

A resposta inflamatória dos pacientes aos fatores de virulência, como as toxinas do *C. difficile*, é um dos maiores determinantes da gravidade da ICD (Yu *et al.*, 2017; MADAN; PETRI, 2012; KELLY; KYNE, 2011). Além disso, o nível desses mediadores tem mostrado importante correlação positiva com diarreia persistente e pior desfecho da doença (WALKER *et al.*, 2013; EL FEGHALY *et al.*, 2013).

1.2 Toxinas do *C. difficile*

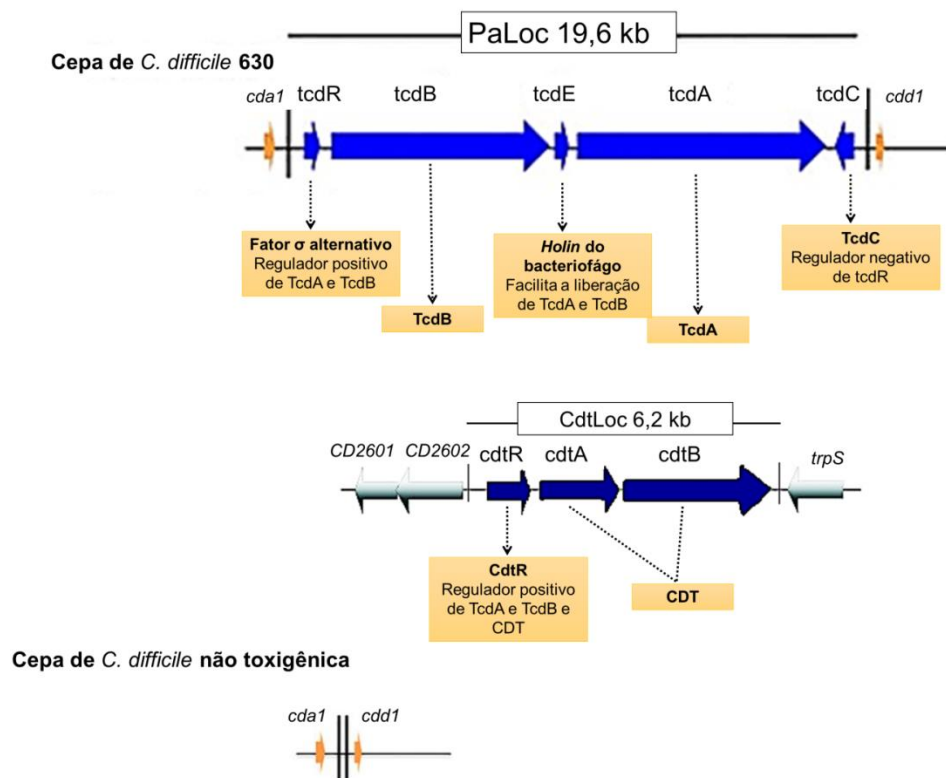
Os maiores fatores de virulência do *C. difficile* são as toxinas A e B (TcdA e TcdB). Os genes que codificam a TcdA (*tcdA*) e TcdB (*tcdB*) estão localizados dentro do locus de patogenicidade (PaLoc), uma região do cromossomo que apresenta 19,6 kb de comprimento, que também contém três genes adicionais (*tcdR*, *tcdE* and *tcdC*). O *tcdR* codifica um fator sigma da RNA polimerase, responsável por regular positivamente a expressão de TcdA e TcdB (CHEN *et al.*, 2017; MANI; DUPUY, 2001). O *tcdE* codifica um holin do bacteriófago (proteína formadora de poros na membrana) que é requerido para a secreção das toxinas (GOVIND; DUPUY, 2012). O *tcdC* codifica TcdC, um regulador negativo de *tcdR* (MATAMOUROS; ENGLAND; DUPUY, 2007).

O PaLoc é sempre encontrado na mesma localização genômica. Esse locus é substituído por uma região altamente conservada não-codificante de 175/75 bp em cepas de *C. difficile* não toxigênicas (DINGLE *et al.*, 2014; BRAUN *et al.*, 1996). A composição genética do PaLoc é dependente do Clade (do inglês “ancestral”) ao qual a cepa de *C. difficile* faz parte.

Atualmente, essas cepas são distribuídas em seis distintos clades filogenéticos 1, 2, 3, 4, 5 e C-I (CHEN *et al.*, 2017; DINGLE *et al.*, 2014; STABLER *et al.*, 2012).

Um terceiro tipo de toxina, a toxina binária (CDT), não é requerido para ocasionar a ICD, porém aumenta a virulência de cepas que podem produzi-la (COWARDIN *et al.*, 2016; BAUER *et al.*, 2011). Essa toxina é codificada em um região a parte denominada locus do CDT (CdtLoc). Este contém genes para ambos os componentes de CDT (*cdtA*, gene que codifica a subunidade ligante A da CDT, and *cdtB*, gene que codifica a subunidade ligante B de CDT) e CdtR (*cdtR*), que é responsável por regular positivamente a expressão de CDT, TcdA e TcdB (LYON *et al.*, 2016; CARTER *et al.*, 2007) (figura 4).

Figura 4- Mapa genético dos locos das toxinas em *C. difficile*



Fonte: Adaptado de Chen *et al.* (2017) e Carter, Rood e Lyras (2012). O PaLoc da cepa de *C. difficile* 630 contém os genes *tcdR* (gene que codifica o fator σ alternativo, um regulador positivo da expressão da toxina A do *C. difficile*, TcdA, e toxina B do *C. difficile*, TcdB), *tcdB* (gene que codifica TcdB), *tcdE* (codifica o holin do bacteriófago que facilita a liberação de TcdA e TcdB), *tcdA* (gene que codifica TcdA) e *tcdC* (gene que codifica TcdC, um regulador negativo da expressão de TcdA e TcdB). Os genes *cdtA* (gene que codifica a subunidade ligante A da toxina binária do *C. difficile*) e *cdtB* (gene que codifica a subunidade ligante B da toxina binária do *C. difficile*), que codificam a toxina binária do *C. difficile* (CDT), estão localizados no locus de CDT (CdtLoc). Este locus também apresenta o gene *cdtR* que codifica CdtR, um regulador positivo de CDT, TcdA e TcdB. Enquanto que a cepa de *C. difficile* não toxigênica não apresenta esses genes.

Como CDT não é requerida para ocasionar a ICD, o mecanismo pelo qual TcdA e TcdB ocasionam alterações celulares continua sendo o mais investigado (COWARDIN *et al.*, 2016).

TcdA e TcdB são proteínas de alto peso molecular, correspondendo respectivamente a 308 e 270 kDa. Essas toxinas são formadas por quatro domínios funcionais: um domínio glicosiltransferase aminoterminal (DGT), um domínio autoproteolítico (DAP), um domínio de translocação (DT) e um domínio de ligação ao receptor (DLR). O DLR é constituído por oligopeptídeos repetitivos combinados (CROPS) (SMITS *et al.*, 2016; CHUMBLER *et al.*, 2016; PRUIT *et al.*, 2012; PAPTAEODOROU *et al.*, 2010).

CROPS se liga a carboidratos da membrana promovendo a entrada de TcdA e TcdB por meio de endocitose. Além de CROPS, há outros domínios que podem conduzir a entrada dessas toxinas para o meio intracelular, uma vez que a deleção desse domínio não inibiu os seus efeitos tóxicos dessas toxinas em células 3T3 (linhagem de fibroblastos de camundongos) e Caco-2 (linhagem de células epiteliais do carcinoma do cólon humano) (OLLING *et al.*, 2011). No entanto, CROPS é importante para a ligação de TcdB ao receptor de proteoglicano sulfato de condroitina-4 (CSPG4) (TAO *et al.*, 2016). Este e o receptor proteína relacionada ao receptor de poliovírus-3 (PVRL3) também contribuem para a internalização de TcdB em miofibroblastos e células epiteliais colônicas, respectivamente (LaFRANCE *et al.*, 2015; YUAN *et al.*, 2015). Adicionalmente, os receptores *Frizzled* (FZDs)-1, 2 e 7 foram reconhecidos recentemente como importantes receptores para TcdB em células colônicas humanas (CHEN *et al.*, 2018; TAO *et al.*, 2016). Contudo, até o momento, não foram evidenciados outros receptores para TcdA além de CROPS.

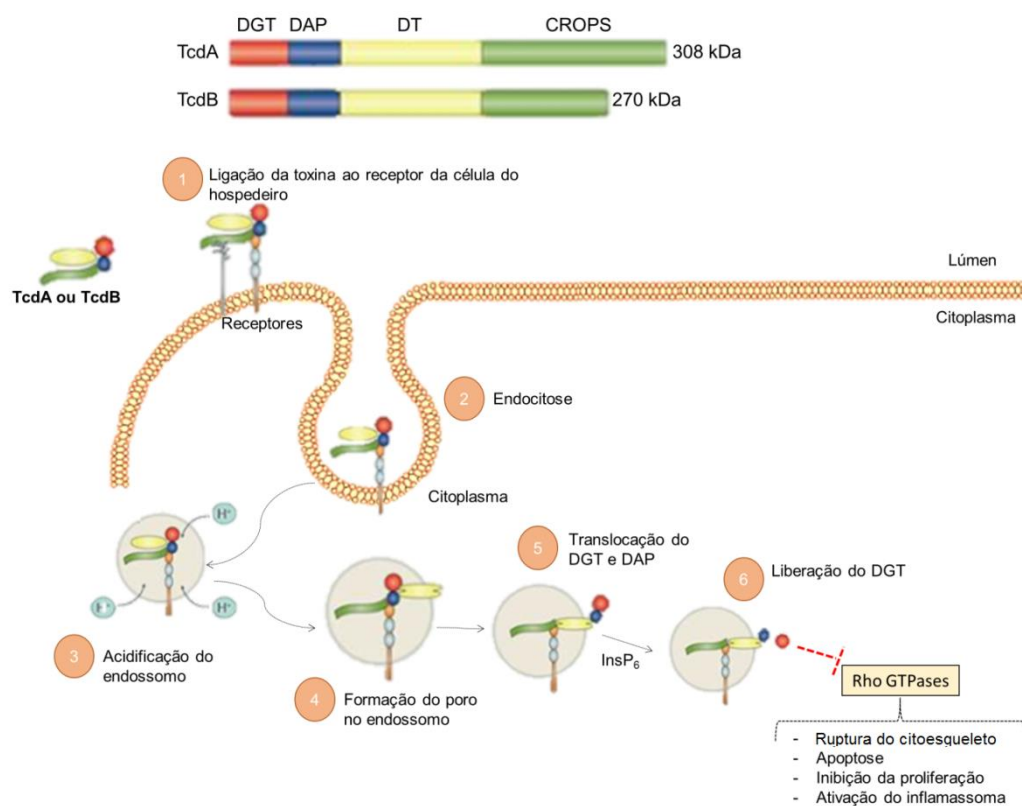
Há duas isoformas de TcdB, TcdB1 e TcdB2 que apresentam 92% de similaridade, com menor grau (88%) no DLR, em sua estrutura (HUNT; LARABEE; BALLARD, 2017; LANIS; BARU; BALLARD, 2010). Essas isoformas apresentam distintas antigenicidade e citotoxicidade. TcdB2 é produzida principalmente por cepas do pulstotipo norte americano (NAP)1/027/BI, que tem sido associada com maior virulência e pior desfecho da doença (LANIS; BARU; BALLARD, 2010). TcdB2 é mais potente do que TcdB1 por se ligar e entrar nas células de forma mais eficiente em consequência de uma variação na sequência de aminoácidos da região 1753 a 1851 do CROP (HUNT; LARABEE; BALLARD, 2017).

Uma vez endocitadas, TcdA e TcdB sofrem uma mudança conformacional no DT, como consequência da acidificação do endossomo mediado pelo transporte ativo de H⁺. O DT, uma vez estruturalmente modificado, forma um poro na membrana do endossomo, propiciando

a translocação do DAP e DGT. Um estudo identificou que uma variação de 8 aminoácidos no DT da TcdB resulta em redução da toxicidade da cepa de *C. difficile* VPI10463 (ZHANG *et al.*, 2014).

No citoplasma, DAP é ativado por inositol-hexaquisfosfato (InsP₆), com consequente liberação de DGT para o citosol, que por sua vez, inibe as Rho GTPases (BELLA *et al.*, 2016; SMITS *et al.*, 2016) (figura 5). Além de participar na liberação das toxinas do *C. difficile*, DAP regula a atividade pró-inflamatória dessas toxinas (ZHANG *et al.*, 2018).

Figura 5 – Estrutura e função das TcdA e TcdB



Fonte: Adaptado de Bella *et al.* (2016) e Smits *et al.* (2016). A toxina A (TcdA) e toxina B (TcdB) do *C. difficile* são formadas pelo domínio glicosiltransferase (DGT), domínio autoproteolítico (DAP), domínio de translocação (DT) e e domínio de ligação ao receptor (CROPS). As toxinas se ligam a receptores presentes na membrana plasmática das células do hospedeiro por meio de CROPS. Essa interação promove sua endocitose. A acidificação do endossomo ocasiona uma mudança conformacional na toxina, favorecendo a formação de um poro na membrana pelo DT. Por meio desse poro, o DGT e DAP são translocados para o citoplasma. No citoplasma, inositol-hexaquisfosfato (InsP₆) ativa DAP, com consequente liberação de DGT no citoplasma. Por sua vez, DGT inibe as Rho GTPases resultando em ruptura do citoesqueleto de actina, apoptose, inibição da proliferação e ativação do inflamassoma a depender do tipo celular afetado.

Uma nova cepa de *C. difficile* (ICC45/RTSLO231/UK/CE/821), que foi isolada pelo nosso grupo de pesquisa a partir de amostra fecal de uma paciente com câncer de mama que foi a óbito, apresentou uma variação no DAP da TcdB. Além dessa variação, essa cepa produziu menos TcdB do que a conhecida NAP1/RT027 *in vitro*. Apesar dessas alterações, o sobrenadante dessa cepa induziu similar dano tecidual, reposta inflamatória e estresse oxidativo no íleo de camundongos comparado ao da cepa NAP1/RT027 (COSTA *et al.*, 2016).

Variações no DGT da TcdB foram observadas em cepas NAP1v (NAP1 variante), denominada assim por apresentar traços genéticos da cepa NAP1/RT027 e NAP9/RT017, resultando em reduzida resposta inflamatória *in vitro* e *in vivo* (QUESADA-GÓMEZ *et al.*, 2016).

As diversas variações evidenciadas, até o presente momento, na TcdB de diferentes cepas do *C. difficile*, torna difícil a interpretação de dados entre diferentes estudos que utilizam TcdB provenientes de cepas distintas dessa bactéria. Entretanto, a TcdA e TcdB mais utilizada em estudos experimentais é a purificada a partir da cepa VPI10463, cujo DGT da TcdB apresenta 100% de similaridade com o da cepa NAP1/RT027 (QUESADA-GÓMEZ *et al.*, 2016).

1.3 TcdA e TcdB: Patogenêse da lesão intestinal e mecanismo da lesão celular

TcdA e TcdB estimulam a liberação de uma variedade de mediadores como IL-1 β , IL-2, IL-15, IL-16, IL-5, IL-6, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), IL-8, IL-12, IL-13, IL-18, IL-23, IL-17A, IL-10, motif CXC ligante de quimiocina-4 (CXCL-4, conhecido como proteína inflamatória de macrófagos 1 β), motif CXC-ligante de quimiocina-2 (CXCL-2, conhecido como proteína inflamatória de macrófagos 2 α), fator inibitório de migração de macrófagos (MIF) em diversas células, como células epiteliais, células imunes e neurônios entéricos (JOSE *et al.*, 2018; YU *et al.*, 2017; NAKAGAWA *et al.*, 2016; XU *et al.* 2014; BUONOMO *et al.*, 2013; SHEN, 2012; NG *et al.*, 2010).

O mecanismo da lesão intestinal induzido por TcdA e TcdB vem sendo amplamente estudados, assim como seus efeitos diretos em células. Ambas as toxinas agem de forma semelhante nas células epiteliais, células endoteliais e macrófagos. No entanto, essas células demonstram ser mais sensíveis à TcdB (D'AURIA *et al.*, 2015).

O mecanismo de como as células epiteliais e células do sistema imune respondem à TcdA e TcdB é detalhado a seguir:

- Células epiteliais intestinais

As toxinas do *C. difficile* são semelhantes à glicosiltransferases que monoglicosilam Rho GTPases (Rho, Rac e Cdc42). Essa glicosilação leva a inativação funcional dessas GTPases. Pelo fato de as Rho GTPases regularem o citoesqueleto de actina, a inativação delas por TcdA e TcdB ocasiona desorganização dos filamentos de actina, resultando em mudanças morfológicas em células epiteliais, assim como em macrófagos e outras células. A inibição das Rho GTPases também inibe a migração, morfogênese e divisão celular (JAFFE; HALL, 2005). Adicionalmente, as Rho GTPases estão envolvidas na regulação da transcrição e da apoptose celular (AZNAR; LACAL, 2001).

Brito *et al* (2002b) mostrou que a TcdA de forma dose dependente inibe a migração e induz apoptose em células epiteliais intestinais humanas (T84) pelas vias intrínseca e extrínseca com ativação das caspases 9 e 8, resultando em ativação de caspase 3 e 6, de forma dependente de Rho. Além disso, demonstrou que ativação precoce de Bid independente de caspase e está envolvida na apoptose induzida por TcdA (CARNEIRO *et al.*, 2006).

Além disso, a ativação de caspase 3, com consequente apoptose, em células epiteliais colônicas induzida por TcdA ocorre de forma independente ao seu efeito no citoesqueleto de actina (GERHARD *et al.*, 2008).

O tratamento de células epiteliais intestinais de ratos (IEC-6) com Alanil-glutamina ou glutamina previne o efeito pró-apoptótico induzido pela TcdA por meio da suprarregulação de RhoA (SANTOS *et al.*, 2013; BRITO *et al.*, 2005). A depleção de glutamina em animais submetidos à lesão ileal induzida por TcdA potencializa os processos inflamatórios dependentes de leucócitos (NASCIMENTO *et al.*, 2005).

A inibição da proliferação, da migração e da diferenciação de células epiteliais por TcdA é mediada pela inibição da via *Wingless* (Wnt)/ β -catenina induzido por essa toxina de forma independente de caspases (LIMA *et al.*, 2014). Embora o mecanismo de TcdA na inibição da via Wnt/ β -catenina é desconhecido, o de TcdB é mediado pela interação dessa toxina com os receptores FZDs (TAO *et al.*, 2016).

TcdA ativa a via de sinalização de TGF- β em células epiteliais intestinais *in vitro* e em modelo de ileíte. *In vitro*, TGF- β 1 é um mediador protetor em células epiteliais intestinais expostas à TcdA por estimular a proliferação e migração, bem como inibir a apoptose, (TINOCO-VERAS *et al.*, 2017).

In vitro, a liberação de mediadores inflamatórios, como IL-8, por células epiteliais intestinais de humanos induzida por TcdB teve importante participação da ativação da via do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR)-ERK/MAPK (NA *et al.*, 2005).

- Macrófagos

Em biópsias de cólon de pacientes com diarreia recorrente e não recorrente associada ao *C. difficile* foi evidenciada a redução de macrófagos (JOHAL *et al.*, 2004).

Adicionalmente, macrófagos expressando a proteína IL-1 β foram encontrados em amostras colônicas de biópsias de pacientes com ICD. Em cultura de macrófagos, TcdA e TcdB estimula a liberação de IL-1 β de forma dependente da ativação do inflamassoma, um complexo multiproteico responsável pela ativação de citocinas como IL-1 β e IL-18 (NG *et al.*, 2010). O aumento de IL-23 induzido por TcdA e TcdB também demonstrou ser dependente da ativação do inflamassoma e da liberação de IL-1 β (COWARDIN *et al.*, 2015).

Em cultura de macrófagos peritoneais de ratos, ambas TcdA e TcdB estimularam a liberação de TNF- α por macrófagos, mas não de óxido nítrico (NO). No entanto, TcdB em altas concentrações, mais do que TcdA, estimulou a morte desses macrófagos (MELO-FILHO *et al.*, 1997).

Em cultura de monócitos humanos, ambas as toxinas estimularam a expressão de molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), IL-8, IL-1 β e TNF- α (LINEVSKY *et al.*, 1997). A síntese de TNF- α por macrófagos induzida por TcdA e TcdB é dependente da endocitose dessas toxinas (SUN *et al.*, 2009).

In vivo, TcdA aumentou a expressão do receptor de quimiocina do motif C-X3-C-1 (CX3CR1) por macrófagos e do ligante de quimiocina do motif C-X3-C-1 (CX3CL1) que tem efeito protetor contra a colite induzida por essa toxina em modelo murinho (INUI *et al.*, 2011).

- Mastócitos

TcdA, em baixas concentrações, ativou diretamente os mastócitos peritoneais, induzindo a liberação de TNF- α , mas não de NO ou de histamina. No entanto, em altas concentrações, essa toxina ocasionou ruptura do citoesqueleto de actina e apoptose (CALDERON *et al.*, 1998).

In vitro, ambas TcdA e TcdB estimularam a liberação de IL-8 por via dependente da ativação de p38 MAPK, PGE2 e PGD2 em mastócitos humanos (MEYER *et al.* 2007).

- Linfócitos

Um estudo evidenciou redução de células produtoras de imunoglobulina A, IgA, (Linfócitos B) em biópsias de cólon de pacientes com diarreia recorrente e não recorrente associada ao *C. difficile* (JOHAL *et al.*, 2004).

Outra pesquisa mostrou que pacientes assintomáticos que são colonizados por *C. difficile* apresentam elevado nível sérico de anticorpos imunoglobulina G (IgG) para TcdA comparado aos pacientes colonizados que desenvolveram diarreia tardiamente (KYNE *et al.*, 2000).

TcdA, mas não TcdB, diminui a quimiotaxia de linfócitos T humanos a quimiocina (C-C motif) ligante-19 (CCL19), sem alterar a expressão de seu receptor CCR7 (receptor de quimiocina C-C do tipo 7). Além disso, o sobrenadante de células epiteliais intestinais desafiadas com TcdA, mas não com TcdB, diminui ainda mais a quimiotaxia de linfócitos T induzida por essa toxina (WU *et al.*, 2013).

-Neutrófilos

Neutrófilos tem importante participação na patogênese da ICD, sendo um preditor da gravidade dessa doença (FUJITANI *et al.*, 2011).

Um trabalho do nosso grupo mostrou que TcdA induz inativação de Rho em neutrófilos humanos, ocasionando alterações morfológicas e redução de L-selectinas que contribuem para a redução da migração e aderência dessas células de forma dependente de β 2-integrinas (BRITO *et al.*, 2002a).

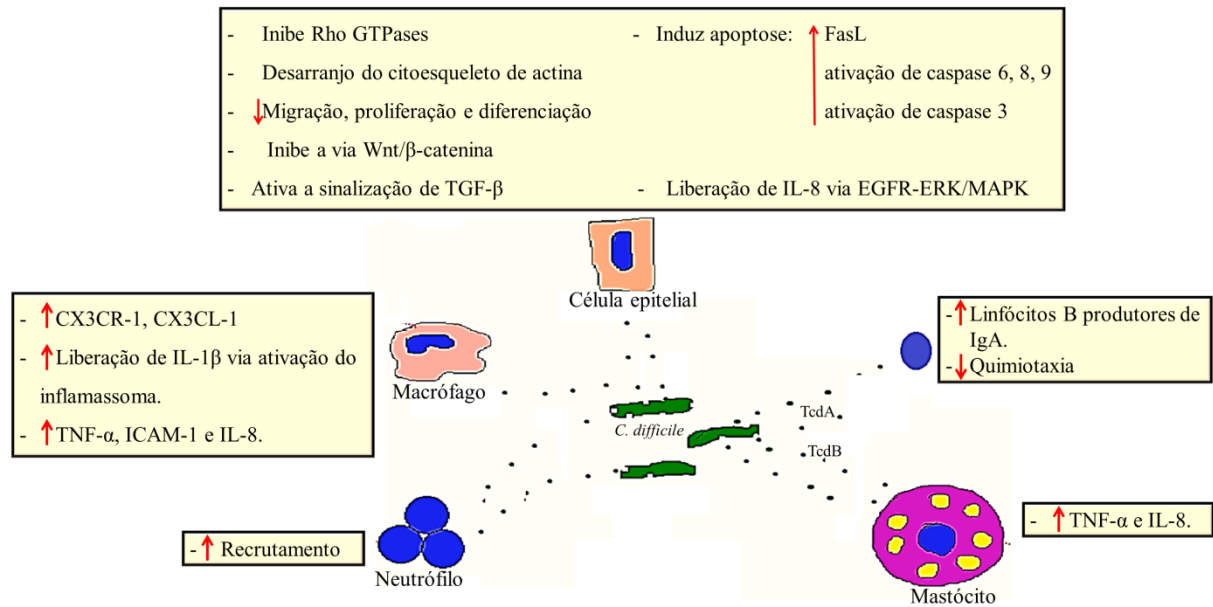
TcdA injetada no lúmen ileal aumentou os níveis de substância P (SP), TNF- α e MPO. A ativação do receptor de SP, a neurocinina (NK-1), é responsável pelo aumento de TNF- α e do recrutamento de neutrófilos, mas não de SP (CASTAGLIUOLO *et al.*, 1998).

O recrutamento de neutrófilos tem importante papel na patogênese da lesão ileal induzida pela TcdA, uma vez que a sua inibição por meio de fucoidina protege os animais da lesão induzida por essa toxina (BARRETO *et al.*, 2008).

IL-17, uma citocina pró-inflamatória que é regulada positivamente por IL-23, é um importante mediador inflamatório envolvido no recrutamento de neutrófilos durante a ICD (NAKAGAWA *et al.*, 2016).

Os efeitos das TcdA e TcdB em células epiteliais, macrófagos, mastócitos, linfócitos e neutrófilos foram sintetizados na figura 6.

Figura 6 – Efeito de TcdA e TcdB em células do sistema imune e em células epiteliais



Fonte: Elaborada pela autora. No intestino, *C. difficile* libera TcdA e TcdB que agem em células epiteliais, macrófagos, mastócitos, linfócitos e neutrófilos estimulando uma variedade de respostas celulares.

Em modelo de alça ileal, TcdA elevou a expressão de interleucina-12 (IL-12), interleucina-18 (IL-18), interferon- γ (INF- γ), mieloperoxidase (MPO), TNF- α , molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), proteína inflamatória derivada de macrófagos-1 α (MIP-1 α) e interleucina-8 (IL-8) (ISHIDA *et al.*, 2004).

A inibição de adenosina desaminase, uma enzima que metaboliza a adenosina liberada no meio extracelular, preveniu a secreção intestinal, o dano tecidual, o recrutamento de neutrófilos e a síntese de TNF- α induzidos por TcdA em modelo de enterite experimental (JUNQUEIRA *et al.*, 2011).

TcdA aumenta a expressão de COX-2 na mucosa e submucosa ileal de camundongos. COX-2 está envolvido na secreção intestinal induzida por essa toxina, uma vez que o tratamento dos animais com celecoxibe, um inibidor seletivo de COX-2, a reduziu (ALCANTARA *et al.*, 2001). De forma semelhante, o antagonista do receptor de angiotensina II do subtipo 1 (AT1) apresentou efeito semelhante na secreção intestinal induzida por TcdA (ALCANTARA *et al.*, 2005).

Em modelo de alça cecal, a TcdA aumentou a síntese de prostaglandina E2 (PGE2), causou apoptose em colónocitos, bem como elevou a expressão de ligante de Fas (FasL), um ligante de Fas que ativa caspase-3, estimulando apoptose. A ausência de FasL em animais submetidos a lesão cecal por TcdA reduziu as alterações histológicas e a síntese de IL-8 (KIM *et al.*, 2007).

A cepa NAP-1/RT027 induz aumento de IL-1 β , fator estimulador de colônias granulocitária (G-CSF) e MCP-1 e diminui IL-12, INF- γ e interleucina-10 (IL-10), porém não altera os níveis de TNF- α , no ceco e no cólon de animais submetidos à ICD (PAWLOWSKI *et al.*, 2010).

Em cultura da camada mucosa e submucosa do íleo, TcdB aumentou os níveis de IL-8 mais na mucosa do que na submucosa, porém em co-cultura dessas duas camadas a produção de IL-8 foi elevadamente maior TIXIER *et al.*, 2005). Esses achados sugerem o potencial papel do sistema nervoso entérico (SNE) na resposta inflamatória à toxina do *C. difficile*.

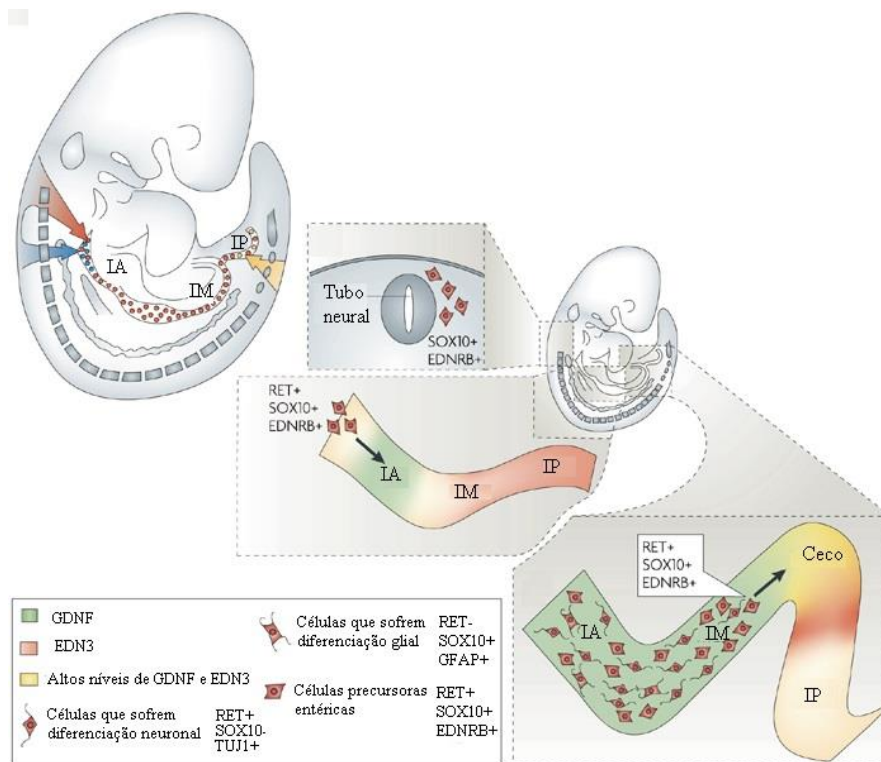
1.4 Sistema nervoso entérico

No século XIX, L. Auerbach e G. Meissner descobriram a existência de neurônios na parede intestinal e, no mesmo período, W. M. Bayliss e E. H. Starling, em 1899, descobriram a atividade funcional do SNE. W. M. Bayliss e E. H. Starling isolaram alça intestinal de cachorro, elevaram a pressão no interior da alça e observaram contração muscular, que resultou em movimento propulsivo. Este evento foi nomeado como “a lei do intestino” que é conhecida atualmente como reflexo peristáltico. Na etapa seguinte, eles romperam os nervos que mediavam à comunicação do intestino com o sistema nervoso central (SNC) e observaram que o reflexo peristáltico não era alterado, dessa forma nomearam esse fenômeno como “mecanismo nervoso local” (COSTA, 2016; HANSEN, 2003).

O SNE é originado, em sua maior parte, a partir da migração de células da crista neural vagal anterior para o intestino anterior. Uma fração pequena do SNE do intestino anterior também é derivada da migração de células tronco da crista neural da região vagal posterior (COSTA, 2016; HEANUE; PACHNIS, 2007; LE DOUARIN *et al.*, 2004). Em humanos, a migração dessas células inicia-se na quarta semana do período embrionário e em camundongos na segunda semana (COSTA, 2016; FARLIE *et al.*, 2004; SASSELLI; PACHNIS; BURNS, 2012). Ao entrarem no intestino, as células da crista neural passam a ser denominadas células

entéricas derivadas da crista neural. Estas células migram do sentido rostral ao caudal, colonizando sequencialmente o intestino anterior (esôfago, estômago e duodeno), o intestino médio (porção distal do duodeno, jejuno, íleo, ceco, colo ascendente, colo transversos, e apêndice) e o intestino posterior (colo descendente, colo sigmoide e reto). No último estágio, células da crista neural sacral migram e contribuem para a formação de uma população restrita de neurônios e glia entérica do intestino médio e posterior (COSTA, 2016; HEANUE; PACHNIS, 2007; KAPUR, 2000). A completa colonização do intestino pelas células entéricas derivadas da crista neural em humanos ocorre por volta da sétima semana do período embrionário e em camundongos no fim na segunda semana (COSTA, 2016; DRUCKENBROD; EPSTEIN, 2005; FU *et al.*, 2003; SASSELLI; PACHNIS; BURNS, 2012) (figura 7).

Figura 7 - Embriologia do sistema nervoso entérico



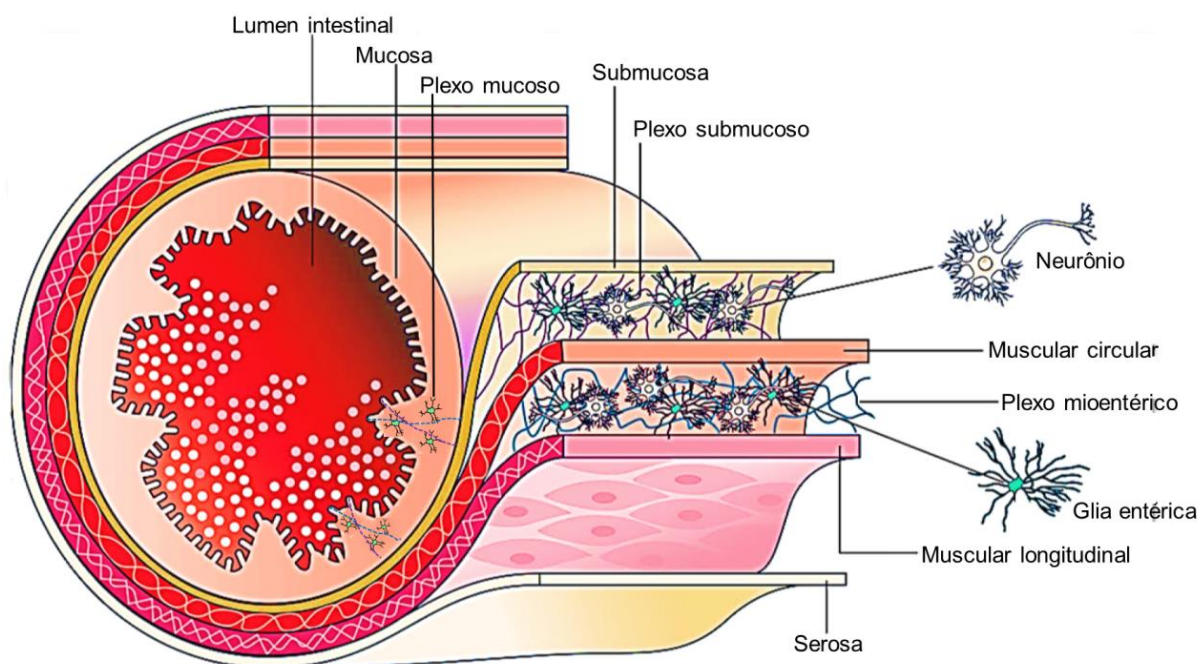
Fonte: Heanue e Pachnis (2007); Costa (2016). Células da crista neural vagal anterior e posterior migram para o intestino anterior (IA). No intestino essas células passam a ser denominadas células precursoras entéricas que expressam RET, SOX10 e EDNRB. Essas células migram, proliferam e se diferenciam no sentido rostral-caudal. Células da crista neural sacral migram para o intestino posterior (IP) e intestino médio (IM) para contribuir na formação de neurônios e glias entéricas. Células que sofrem diferenciação neuronal expressam RET e Classe de β -tubulina III específica de neurônios (TUJ1), enquanto células que se diferenciarão em glia apresentam SOX10 e GFAP. Fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF) estimula a migração, sobrevivência e diferenciação. Endotelina-3 (EDN3) inibe a migração e diferenciação, porém estimula a proliferação dessas células precursoras entéricas.

No período embrionário, fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF) e endotelina-3 (EDN3) desempenham importante função na regulação da proliferação, da migração e da diferenciação das células entéricas derivadas da crista neural ao longo do trato gastrintestinal. O GDNF estimula a sobrevivência, proliferação, migração e diferenciação, enquanto que a EDN3 inibe a migração e diferenciação e estimula a proliferação dessas células (BONDURAND *et al.*, 2006; COSTA, 2016; HEANUE; PACHNIS, 2007). O mecanismo pelo qual essas proteínas geram esses efeitos é distinto: GDNF liga-se ao receptor $\alpha 1$ da família de GDNF (GFR $\alpha 1$) que se dimeriza com o receptor RET, ativando uma cascata de sinalização dependente de tirosina quinase (TK), enquanto que EDN3 liga-se ao receptor de endotelina B (EDNRB) (BARLOW; GRAAF; PACHNIS, 2003; COSTA, 2016; HEANUE; PACHNIS, 2007; NATARAJAN *et al.*, 2002).

O SNE, uma divisão do sistema nervoso autonômico, é chamado o cérebro do intestino por apresentar características independentes ao sistema nervoso central, como a funcionalidade. Apresenta repertório de neurotransmissores similar, elevado número de neurônios e sistema nervoso intrínseco extenso e diferenciado. Esse sistema se estende do esôfago ao esfíncter anal interno e inclui elementos localizados nas paredes da vesícula biliar, do ducto cístico e do ducto biliar comum, e no pâncreas (GULBRASSEN, 2014; VON BOYEN *et al.*, 2002).

O intestino é formado pelas camadas mucosa (epitélio cilíndrico simples e lâmina própria de tecido conjuntivo), submucosa, muscular e serosa. Neste órgão, o SNE é constituído pelos plexos ganglionares e aganglionares. O plexo ganglionar é formado pelos plexos submucoso e mioentérico. O mioentérico está localizado entre a camada muscular circular interna e a longitudinal externa, enquanto o submucoso encontra-se na camada submucosa. Estes dois plexos ganglionares são formados por neurônios e células gliais entéricas (CGEs). O plexo aganglionar, assim denominado devido à ausência de neurônios organizados em gânglios, está localizado na camada mucosa, precisamente na lâmina própria, sendo contituido por CGEs (GRUBISIC; GULBRANSEN, 2017; VON BOYEN; STEINKAMP, 2011) (figura 8).

Figura 8 – Estrutura do intestino e distribuição dos plexos mucoso, submucoso e mioentérico



Fonte: Adaptado de Grubisic e Gulbransen (2017). O intestino é formado pela camada mucosa, submucosa, muscular (muscular circular e muscular longitudinal) e serosa. O sistema nervoso entérico é composto pelos plexos mucoso, submucoso e mioentérico. O plexo mucoso, localizado na camada mucosa, é constituído por células gliais entéricas (CGEs) e terminações nervosas. O plexo submucoso pode ser encontrado na camada submucosa próxima à camada muscular circular interna. Enquanto o plexo mioentérico encontra-se entre a camada muscular circular interna e a longitudinal externa. Os plexos submucoso e mioentérico são constituídos por CGEs e neurônios.

O SNE é formado por aproximadamente 100 milhões de neurônios entéricos que são cercados por CGEs na proporção de 1:1-7 a depender da espécie (GRUBISIC; GULBRANSEN, 2017; GULBRANSEN, 2014). No plexo mioentérico do íleo de camundongos, ovelhas e humanos a proporção de neurônios entéricos para CGEs é de 1:1, 1:4 e 1:7, respectivamente (GULBRANSEN, 2014; HOFF *et al.*, 2008; GABELLA; TRIGG, 1984).

O SNE regula diversas funções intestinais, incluindo motilidade, absorção de nutrientes, secreção de muco, função sensorial, fluxo sanguíneo e secreção hormonal, bem como interage com as células do sistema imune (BISCHOFF *et al.*, 2009; KIBA, 2006). Além disso, também regula a barreira epitelial, participando no controle da proliferação e da diferenciação das células epiteliais (COSTA, 2016; FURNESS, 2012).

1.5 Célula glial entérica (CGE)

As CGEs são essenciais para a manutenção da homeostase intestinal. A completa ablação dessas células induziu colite fulminante em camundongos (BUSH *et al.*, 2001). A maioria das células gliais localizadas fora do cérebro e medula espinhal são encontradas no intestino como um componente do sistema nervoso entérico (GULBRASSEN, 2014).

As células gliais foram observadas dentro do gânglio entérico pela primeira vez em 1899 por Dogiel e, a partir de então, passou ser definida como célula de Schwann. Em 1970, após a análise morfológica por Gabela, as células gliais passaram a ser reconhecidas como uma classe única de glia periférica com características distintas (COSTA, 2016; GULBRANSEN; SHARKEY, 2012). Atualmente, as células gliais no intestino são denominadas como CGEs.

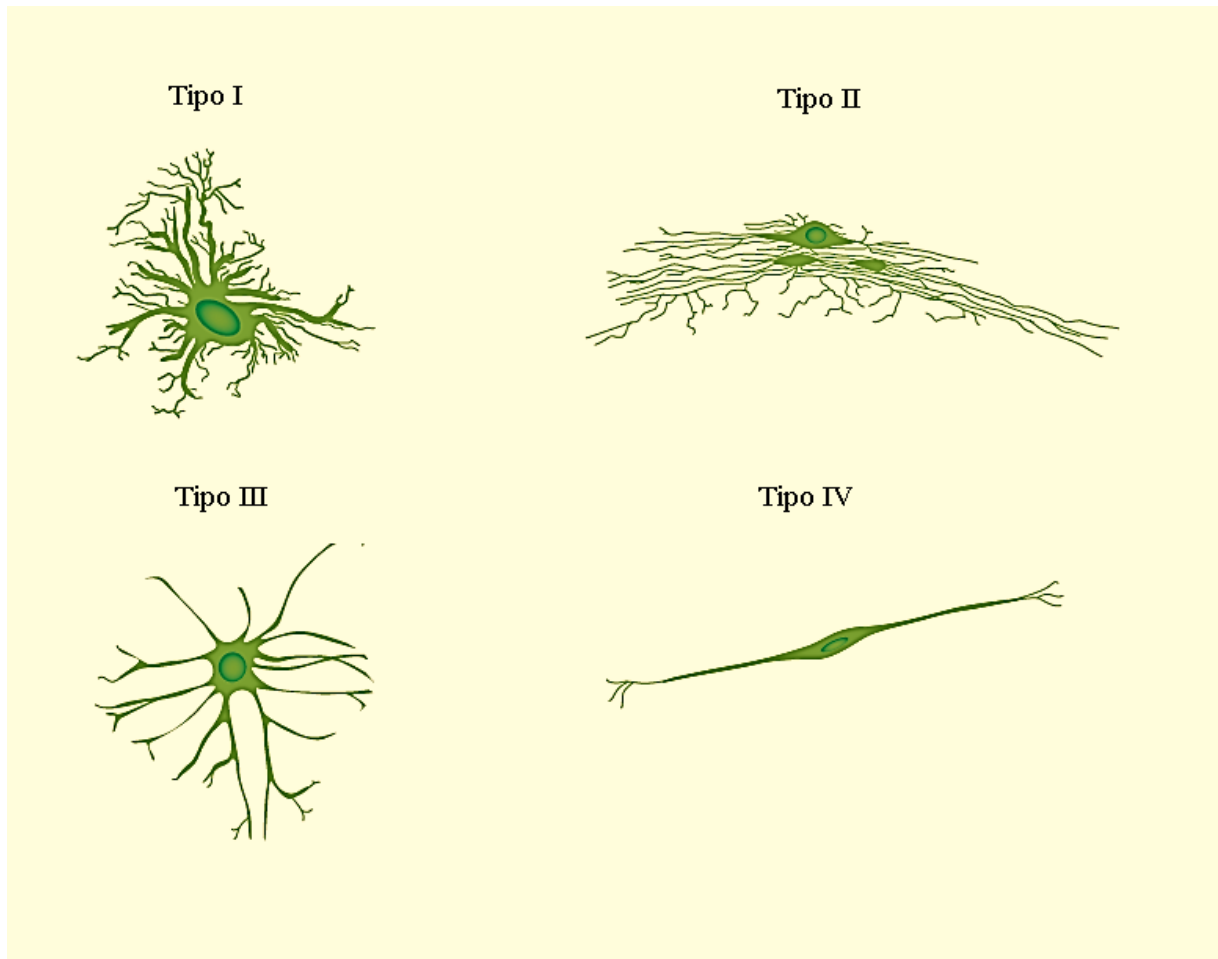
As CGEs maduras são morfológicamente semelhantes aos astrócitos do SNC, bem como apresentam similaridade no padrão molecular de expressão em S100B, GFAP, vimentina e conexina-43 (GRUBISIC; GULBRANSEN, 2017). Apesar do grau de semelhança entre esses dois tipos celulares, algumas diferenças tem sido relatadas como a dependência da via de sinalização de neuregulina por meio do receptor ErbB3 para o desenvolvimento de CGEs, mas não para astrócitos (RIETHMACHER *et al.*, 1997). Assim como a perda da expressão de algumas proteínas astrocíticas importantes como membro da família L1 da aldeído desidrogenase-1 (Aldh1L-1) e expressão de moléculas não astrocíticas como Sox10 e proteína proteolípida-1 (PLP-1), que são implicados na produção de mielina encontrado em oligodendrócitos (RAO *et al.*, 2015; BOESMANS *et al.*, 2014; YOUNG; JONES; MCKEOWN, 2002).

As CGEs podem ser classificadas de acordo com a sua morfologia (tipo I, II, III ou IV) ou com a sua localização nas camadas do trato gastrintestinal, que é a mais utilizada, (mucosa, intragangliônica ou intramuscular).

A classificação morfológica das CGEs foi estabelecida por Hanani. Ele notou a semelhança estrutural das células gliais entéricas com os astrócitos do SNC e descreveu cada tipo da seguinte forma: Tipo I são as CGEs que apresentam processos curtos, ramificados e irregulares, assemelhando-se aos astrócitos protoplasmáticos do SNC; Tipo II, caracterizam-se como células com aspecto alongado, encontradas dentro de feixes de fibras interganglionares, similares aos astrócitos fibrosos do SNC; Tipo III ou mucosas englobam as CGEs que apresentam vários processos longos ramificados e tipo IV ou intramuscular caracteriza CGEs

alongadas que se alinham às fibras nervosas (COSTA, 2016; GULBRANSEN; SHARKEY, 2012) (figura 9).

Figura 9 - Tipos de células glias entéricas baseado nos seus aspectos morfológicos

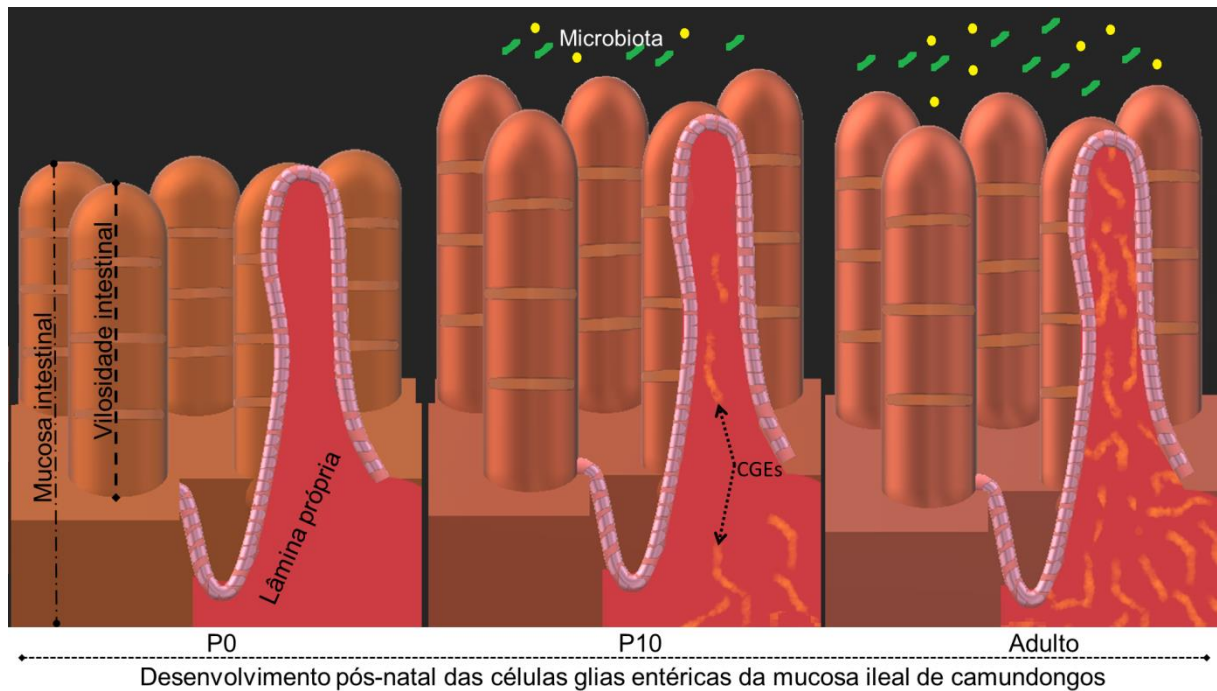


Fonte: Gulbransen e Sharkey (2012).

A classificação das CGEs de acordo com a sua localização nas camadas do trato gastrintestinal (mucosa, intragangliônica ou intramuscular) pode também ser correlacionada com a função dessas células.

Diferentes dos demais tipos, o desenvolvimento pós-natal das CGEs da mucosa é dependente da interação do TGI com a microbiota intestinal, aumentando à medida que a microbiota intestinal se desenvolve (figura 10). Esse achado foi evidenciado por estudo onde foi mostrado que camundongos livres de germes ou camundongos tratados com antibióticos não apresentaram células glias na camada mucosa do intestino (KABOURIDIS *et al.*, 2015).

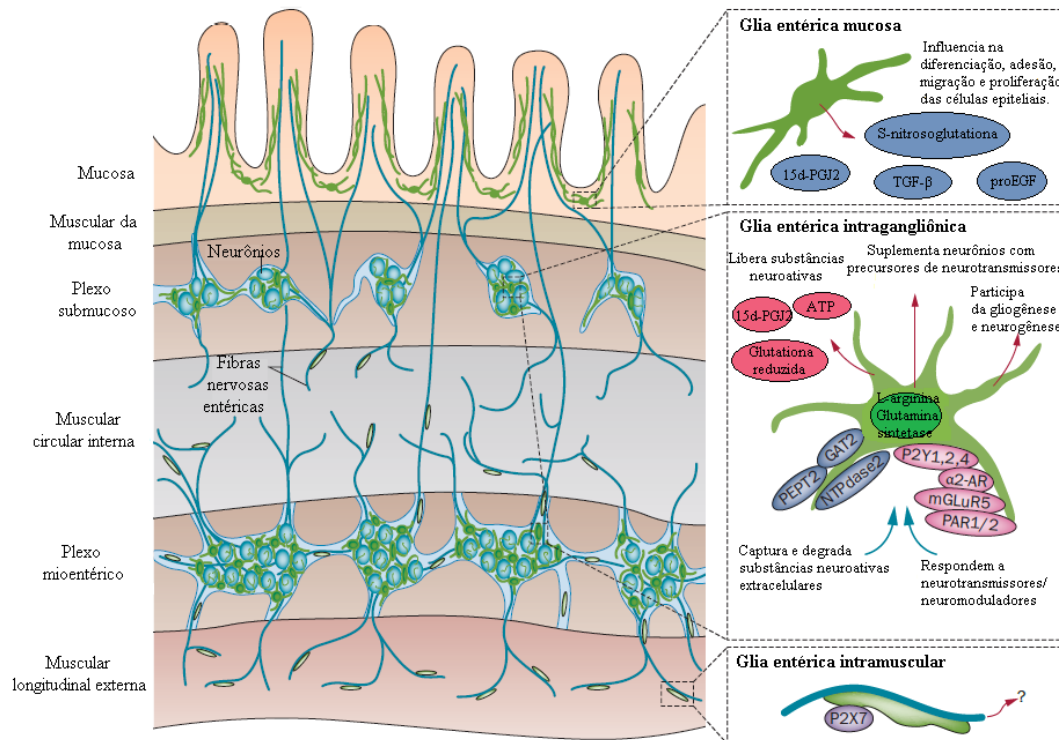
Figura 10 – Desenvolvimento pós-natal das CGEs da mucosa



Elaborado pela autora. Ao nascer (P0), camundongos não apresentam células glias entéricas (CGEs) mucosa na lâmina própria ileal. Após 10 dias de vida (P10), bactérias e outros microorganismos iniciam o processo de colonização e interação com a mucosa intestinal, resultando em recrutamento de CGEs para a mucosa intestinal. A densidade de CGEs, assim como a interação entre as mesmas, se torna mais proeminentes na fase adulta desses animais.

A glia entérica mucosa interage com as células epiteliais intestinais, contribuindo na diferenciação, na adesão, na migração e na proliferação por meio da liberação de 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J2 (15d-PGJ2), do fator de crescimento transformador- β (TGF- β), da S-nitrosoglutationa (GSNO) e do pró-fator de crescimento epidérmico (proEGF) (BACHNGOHOU *et al.*, 2010; NEUNLIST *et al.*, 2007; SAVIDGE *et al.*, 2007; VAN LANDEGHEM *et al.*, 2011). A intragangliônica é capaz de liberar substâncias neuroativas (15d-PGJ2), trifosfato de adenosina (ATP), glutatona reduzida e precursores de neurotransmissores (L-arginina e glutamina sintetase), bem como de capturar e degradar substâncias neuroativas extracelulares e de responder a neurotransmissores (GULBRANSEN; SHARKEY, 2012). Enquanto que a glia intramuscular ou extraganglionar expressa o receptor P2X7, porém a sua função específica no trato gastrointestinal ainda é desconhecida (VANDERWINDER; TIMMERMANS; SCHIFFMANN, 2003) (figura 11).

Figura 11 - Classificação das CGEs de acordo com a sua localização no intestino



Fonte: Gulbransen e Sharkey (2012). As CGEs são classificadas em glia entérica da mucosa, glia entérica intragangliônica e glia entérica intramuscular. A glia entérica mucosa secreta S-nitrosoglutationa, fator de crescimento transformador- β (TGF- β), pró-fator de crescimento epidérmico (proEGF) e 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ – prostaglandina J2 (15-d-PGJ2). A glia entérica intragangliônica libera trifosfato de adenosina (ATP), 15d-PGJ2 e glutaciona reduzida, além de ser capaz de capturar e degradar substâncias neuroativas, secretar L-arginina e glutamina sintetase para formar neurotransmissores e expressar receptores para neurotransmissores e neuromodulares. A glia entérica intramuscular expressa o receptor P2X7, porém sua função é desconhecida (COSTA, 2016).

As células gliais desempenham importantes funções no trato gastrointestinal e interagem de forma direta com as células epiteliais intestinais por meio de GDNF, TGF- β , GSNO, 15d-PGJ2 e 15-hidroxicicosatetraenoico (15-HETE) (COSTA, 2016; POCHARD *et al.*, 2016; YAN-BO; YAN-QING, 2014). Os mediadores secretados pelas CGEs demonstraram aumentar a organização de ocludina e F-actina em células epiteliais intestinais (BAUMAN *et al.*, 2017).

No intestino, o GDNF atua como fator antiapoptótico nas células epiteliais intestinais (COSTA, 2016; SAVIDGE *et al.*, 2007; STEINKAMP *et al.*, 2012). O mecanismo pelo qual GDNF inibe a apoptose de células epiteliais é mediado pela ativação das vias de sinalização de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e fosfatidilinositol-3-quinase/serina-treonina quinase (PI3K/AKT) (STEINKAMP *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2010). De forma autócrina, GDNF inibe a apoptose de células gliais entéricas por meio da ativação dos receptores GFR α 1-3 e o co-receptor RET (STEINKAMP *et al.*, 2012). A ativação do

receptor opióide μ por meio de morfina em CGEs diminui a produção de GDNF por essas células, com consequente ruptura da barreira epitelial intestinal. Esses achados apontam GDNF como um importante fator derivado de CGEs responsável por aumentar a função da barreira epitelial intestinal (BAUMAN *et al.*, 2017). Em adição, esse fator glial aumenta a integridade da barreira epitelial intestinal via suprarregulação de ZO-1 (ZHANG *et al.*, 2010).

O TGF- β , sintetizado pelas células gliais entéricas da mucosa, inibe a proliferação e estimula a migração de células epiteliais intestinais (BULUT *et al.*, 2004; COSTA, 2016; GATZA *et al.*, 2011; YAN-BO; YAN-QING, 2014). Os efeitos anti-proliferativos desse mediador são por meio da infrarregulação de quinases dependentes de ciclina e suprarregulação de inibidores de quinase dependente de ciclina, resultando, dessa forma, no bloqueio do ciclo celular (WANG *et al.*, 2004).

No intestino, a CGE é a principal fonte de GSNO que é um potente doador de óxido nítrico (SAVIDGE *et al.*, 2007). O GSNO regula a permeabilidade intestinal por estimular a suprarregulação de proteínas da “tight junctions” como ocludinas e zônulas de oclusão-1 (ZO-1) e inibe o aumento de cadeia leve de miosina fosforilada (PMLC), bem como melhora a localização dessas proteínas (CHEADLE *et al.*, 2013). Diferente do GSNO, 15d-PGJ2 não afeta a permeabilidade paracelular. No entanto, assim como o TGF- β , 15d-PGJ2 inibe a proliferação e estimula a diferenciação de células epiteliais intestinais via ativação do receptor ativado por proliferador de peroxissoma-gama (PPAR- γ) (BACH-NGOHOU *et al.*, 2010).

Por inibir a proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK) e regular a expressão de ZO-1, 15-HETE controla a permeabilidade da barreira epitelial intestinal, influenciando na permeabilidade paracelular da mesma forma que o GSNO, porém por mecanismo distinto (POCHARD *et al.*, 2016).

As CGEs também podem atuar como células do sistema imune inato devido a sua capacidade de reconhecer patógenos por meio de receptores toll-like (TLRs) e liberar fatores quimiotáticos e citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6) (COSTA, 2016). Vale ressaltar que as células gliais do intestino expressam TLRs 1-5, 7 e 9 (TURCO *et al.*, 2014). Um dos efeitos da ativação de um dos tipos desse receptor, o TLR4, por meio da administração de LPS via intraperitoneal foi promover o aumento dos níveis de S100B e GFAP no duodeno, ceco e cólon de ratos após 24h da aplicação (FRANCESCHI *et al.*, 2017).

Propriedade imunossupressora tem sido identificada em CGEs por meio de um estudo realizado em CGEs provenientes do plexo mioentérico de humanos que mostrou que

mediadores liberados por essas células inibem a proliferação de linfócitos T ativados (KERMARREC *et al.*, 2016).

A ativação de CGEs medeia os efeitos anti-inflamatórios da estimulação vagal que é importante para controlar o recrutamento exacerbado de células inflamatórias intestinais, por sua vez, contribui para o dano tecidual durante a inflamação intestinal induzida por lesão por isquemia-reperfusão (LANGNESS *et al.*, 2017).

Além de interagirem diretamente com as células epiteliais intestinais, células do sistema imune e com os patógenos, as CGEs também se conectam de forma dinâmica com os neurônios entéricos. A comunicação entre as CGEs e os neurônios entéricos ocorre de forma bidirecional (COSTA, 2016). Os neurônios entéricos podem estimular as células gliais entéricas por meio da acetilcolina, da serotonina (5-HT) e do ATP (BOESMANS *et al.*, 2013). Enquanto que o ATP liberado por células gliais entéricas pode ativar o receptor P2X7 em neurônios, estimulando a morte dessas células principalmente sob condições inflamatórias (BROWN *et al.*, 2015).

Em condições fisiológicas, as CGEs, a única fonte de L-arginina nos gânglios entéricos, liberam L-arginina que contribui para a síntese de óxido nítrico em neurônios nitrérgicos (NAGAHAMA *et al.*, 2001).

As CGEs também regulam a motilidade gastrintestinal por modular o circuito entérico excitatório (GRUBISIC *et al.*, 2018; RAO *et al.*, 2017; MCCLAIN; FRIED; GULBRANSEN, 2015). A ativação desregulada de CGEs durante a inflamação pode alterar o papel regulador dessas células na motilidade, ocasionando as dismotilidades intestinais.

As CGEs também expressam e secretam a proteína S100B (RAO *et al.*, 2015; BOESMAN *et al.*, 2013). No intestino, a CGE é uma das principais fontes de S100B. Diferente dos outros mediadores, essa proteína tem se destacado por ser largamente distribuída na parede intestinal (RAO *et al.*, 2015).

O S100B apresenta papel dual sobre os neurônios entéricos. Em baixos níveis (nanomolar) estimula a sobrevivência neuronal, enquanto em altas concentrações (micromolar) promove a morte de neurônios do SNC (VILLARREAL *et al.*, 2011). Além disso, S100B inibe a proliferação de células epiteliais intestinais *in vitro* (TURCO *et al.*, 2012).

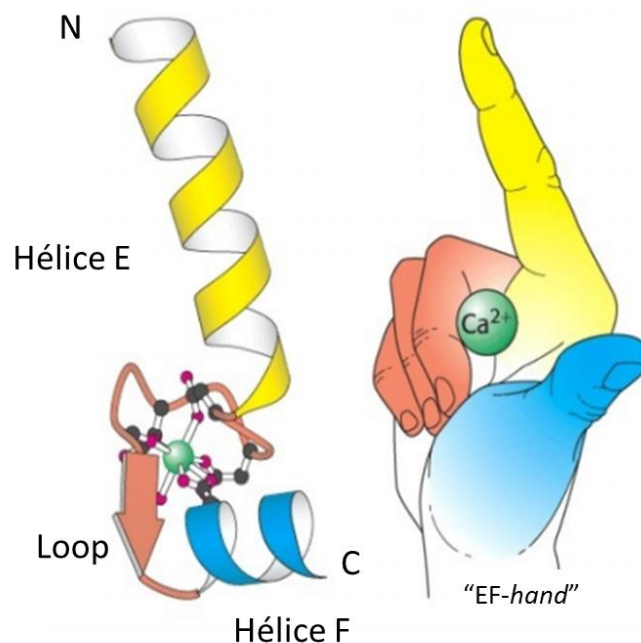
Tanto a morte neuronal quanto o efeito anti-proliferativo sobre as células epiteliais intestinais promovidos por S100B parecem ser mediados pela ativação da via do receptor de produtos finais de glicação avançada (RAGE)/ fator de transcrição nuclear- κ B (NF κ B) (TURCO *et al.*, 2012; VILLARREAL *et al.*, 2011).

1.6 Via S100B/RAGE

A família das proteínas S100 são formadas por 25 membros (AUSTERMANN; SPIEKERMANN; JOHANNES, 2018). Essas proteínas são denominadas assim devido dois de seus membros, S100A1 and S100B, serem solúveis em 100% de sulfato de amônio saturado (BRESNICK, 2018; MOORE, 1965).

As proteínas S100 são pequenas proteínas (9-21,5 kDa) ligantes de cálcio do tipo EF-hand (HEIZMANN; FRITZ; SCHAFER, 2002). Este termo foi criado por R. H Kretsinger mediante um estudo realizado em parvalbumina, uma pequena proteína ligante de cálcio isolada do músculo de carpa. A denominação EF-hand designa um motif do tipo hélice-loop-hélice que apresenta alta afinidade pelo cálcio, sendo que as letras E e F referem-se as hélices E e F da parvalbumina. O clássico motif EF-hand é geralmente formado por uma alça de 10 a 12 aminoácidos, ladeados por duas hélices apontadas para direções opostas e perpendiculares entre si (KRETSINGER; NOCKOLDS, 1973; BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2008) (figura 12).

Figura 12 - Representação esquemática do motif EF-hand



Fonte: Berg, Tymoczko e Stryer (2008). EF-hand designa um *motif* do tipo hélice-loop-hélice que apresenta alta afinidade pelo cálcio (Ca^{2+}). O *motif* EF-hand é formado por um *loop* de 10 a 12 aminoácidos, ladeados por duas hélices, Hélice E e Hélice F, apontadas para direções opostas e perpendiculares entre si.

Além de se ligar ao Ca^{2+} , S100B se liga ao Zn^{2+} em um sítio distinto. A interação do Zn^{2+} , na presença Ca^{2+} , com S100B aumenta a afinidade dessa proteína por seus receptores alvos. No entanto, apenas o Zn^{2+} não induz a ligação dessa proteína aos seus alvos (HARTMAN *et al.*, 2013; GENTIL *et al.*, 2001).

A primeira proteína S100 foi descoberta em 1965 a partir de uma fração proteica subcelular extraída de amostras de cérebro bovino. Posteriormente, duas amostras proteicas foram identificadas e denominadas como S100 α e S100 β , que atualmente são chamadas S100A1 e S100B, respectivamente (HARTMAN *et al.*, 2013; KLIGMAN; HILT, 1988; MOORE, 1965).

Dentre os membros da família S100, o S100B vem se destacando devido aos seus efeitos na neuroinflamação e nas doenças inflamatórias intestinais (COSTA *et al.*, 2019; CIRILLO *et al.*, 2015; ESPOSITO *et al.*, 2012; VILLARREAL *et al.*, 2011).

O S100B é expresso por oligodendrócitos imaturos, células epiteliais de túbulos renais, pituícitos, condrócitos, adipócitos, melanócitos, células de Langerhans e astrócitos (DONATO *et al.*, 2009). No intestino, essa proteína é expressa também por CGEs (COSTA *et al.*, 2019; RAO *et al.*, 2015).

No SNC, S100B é uma proteína solúvel secretada por astrócitos que apresenta efeitos pró-apoptóticos ou pró-sobrevivência em neurônios dependendo da concentração presente no meio extracelular. Além disso, caracteriza-se como proteína de ligação ao cálcio que é abundante no citoplasma de astrócitos cerebrais. No citoplasma, S100B é encontrado na sua forma solúvel, associado à porção interna da membrana plasmática, aos centrossomos, aos microtúbulos ou aos filamentos intermediários do tipo III (DONATO, 2003). Essa proteína apresenta várias ações intracelulares, incluindo a regulação da homeostase do cálcio (XIONG *et al.*, 2000), o controle da estabilidade de microtúbulos (SORCI; AGNELETTI; DONATO, 2000) e a modulação da mitose (DONATO, 2003).

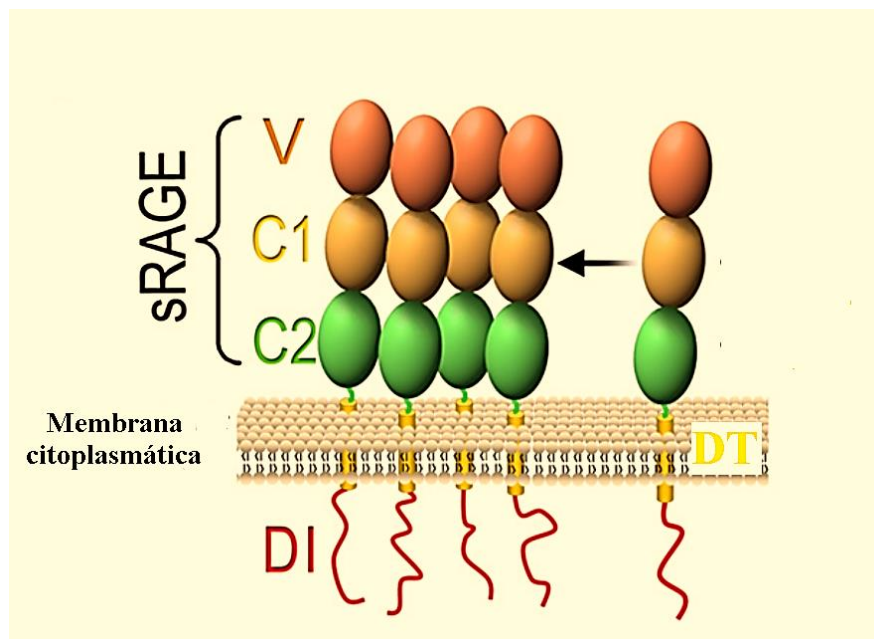
Em adição as suas ações intracelulares, o S100B também exibe atividade extracelular que é mediada por sua interação com o receptor RAGE (DONATO *et al.*, 2009). No SNC, a liberação de S100B por astrócitos é aumentada quando essas células são estimuladas com 5-HT, por meio da ativação do receptor 5-HT_{1A}, ácido lipofosfatídico, glutamato e citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , e submetidas ao estresse metabólico (COSTA, 2016; DONATO *et al.*, 2009; EDWARDS; ROBINSON, 2006; PINTO *et al.*, 2000; CICCARELLI *et al.*, 1999).

De forma semelhante, as CGEs liberam S100B e produzem NO ao serem estimuladas por citocinas pró-inflamatórias *in vitro* (CIRILLO *et al.*, 2011). Quando S100B é liberado em grandes concentrações para o meio extracelular, ele funciona como padrão molecular associado ao dano (DAMP) devido a sua capacidade de estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias por meio da ativação de RAGE (SAVIDGE *et al.*, 2007).

O RAGE é um receptor de superfície celular que pertence a uma família de proteínas de receptores de imunoglobulinas que compartilha homologia estrutural com outros receptores de imunoglobulinas (BARCLAY, 2003; LECLERC *et al.*, 2009). RAGE também pode ser encontrado na forma solúvel, que é implicado na regulação da resposta imune, funcionando como um inibidor da inflamação (PARK *et al.*, 2016).

Em relação à sua estrutura, RAGE é constituído por um domínio extracelular, um transmembranar e uma extremidade citosólica (domínio intracelular). Vale enfatizar que o domínio extracelular de RAGE é denominado como região do RAGE de ligação para o ligante extracelular (sRAGE). O sRAGE é composto por um domínio de imunoglobulina (Ig) do tipo V e por dois domínios de Ig C-terminal (C1 e C2) (HSIEH *et al.*, 2004; KOCH *et al.*, 2010; LECLERC *et al.*, 2009). (figura 13).

Figura 13 - Estrutura do receptor RAGE



Fonte: Leclerc *et al.* (2009). sRAGE= região do RAGE de ligação para o ligante extracelular; V= domínio de imunoglobulina (Ig) do tipo V; C1= domínio de Ig C-terminal 1; C2= domínio de Ig C-terminal 2; DT= Domínio transmembranar e DI= Domínio intracelular.

O S100B promove a ativação do receptor RAGE por ligar-se ao domínio de imunoglobulina (Ig) do tipo V. A sua interação com esse receptor depende dos níveis de cálcio, uma vez que esse íon promove a formação de proteínas S100B tetraméricas, as quais apresentam alta afinidade pelo receptor RAGE (OSTENDORP *et al.*, 2007).

Além de S100B, há outros ligantes para o receptor RAGE que incluem anfoterina (grupo de alta mobilidade Box 1, HMGB1), peptídeo β amiloide e outros membros da família S100 como S100A6 (LECLERC *et al.*, 2009). No entanto, cada um desses ligantes se torna relevante dependendo do processo patológico. Por exemplo, na doença de Alzheimer foi evidenciado aumento da expressão de receptores RAGE no SNC ao qual foi associado com aumento de peptídeo β amiloide, que por sua vez estimulou via RAGE o estresse oxidativo em neurônios e a produção de citocinas pró-inflamatórias em micróglia (YAN *et al.*, 2003).

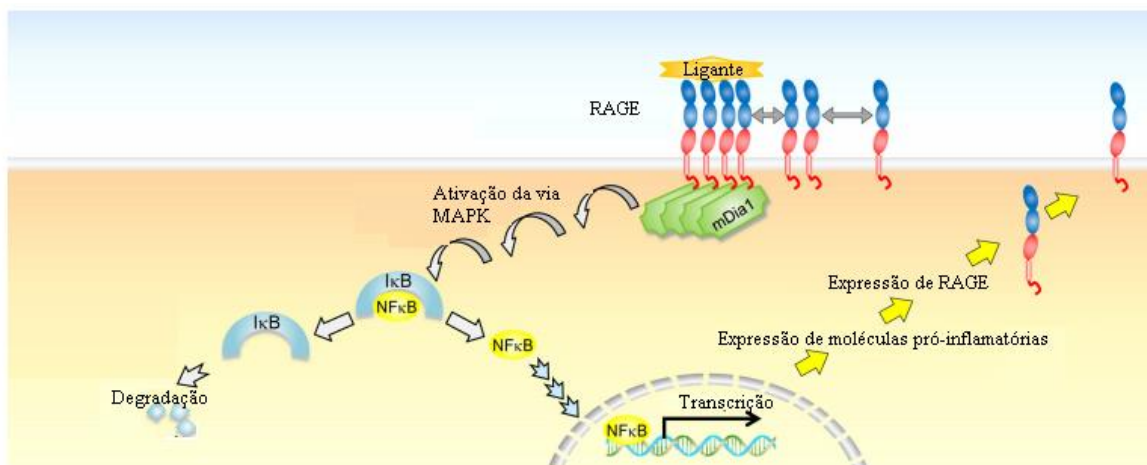
O RAGE pode ser encontrado em neurônios entéricos, células musculares lisas, células mensangiais, CGEs, endotélio vascular, células epiteliais intestinais, macrófagos, linfócitos e neutrófilos (COSTA *et al.*, 2019; HUEBENER *et al.*, 2015; CIRILLO *et al.*, 2011; LECLERC *et al.*, 2009; TURCO *et al.*, 2009).

Pelo fato desse receptor ser expresso por diferentes células, não há um esquema geral para a resposta celular após ativação de RAGE. Essa resposta celular depende da identidade do ligante, do tipo de célula a ser estimulada, da concentração do ligante, da presença de outros ligantes, da concentração de RAGE na membrana celular e das moléculas adaptadoras que medeiam à sinalização (KIERDORF; FRITZ, 2013).

Na maioria dos casos, a interação do ligante ao receptor RAGE promove o recrutamento de *diaphanous-1*(mDia1) que ativa a via da MAPK, resultando na fosforilação da proteína inibitória kappa B (I κ B) e na liberação de NF κ B, ao qual se transloca para o núcleo, estimulando a expressão de moléculas pró-inflamatórias como TNF- α , interleucina-1 β , interleucina-1 β (IL-1 β) e IL-6, de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e de ciclooxigenase-2 (COX-2) (DONATO *et al.*, 2009; KIERDORF; FRITZ, 2013; LECLERC *et al.*, 2009).

A ativação do receptor RAGE por seus ligantes promove uma retroalimentação positiva na ativação dessa via por aumentar a expressão desse receptor na membrana citoplasmática. Este evento pode ser promovido de duas formas: pelo aumento da expressão gênica de RAGE e pela reciclagem do receptor. Nesta última forma, os ligantes promovem a internalização do receptor por endocitose e as vesículas contendo os receptores se fundem a membrana plasmática (KIERDORF; FRITZ, 2013) (figura 14).

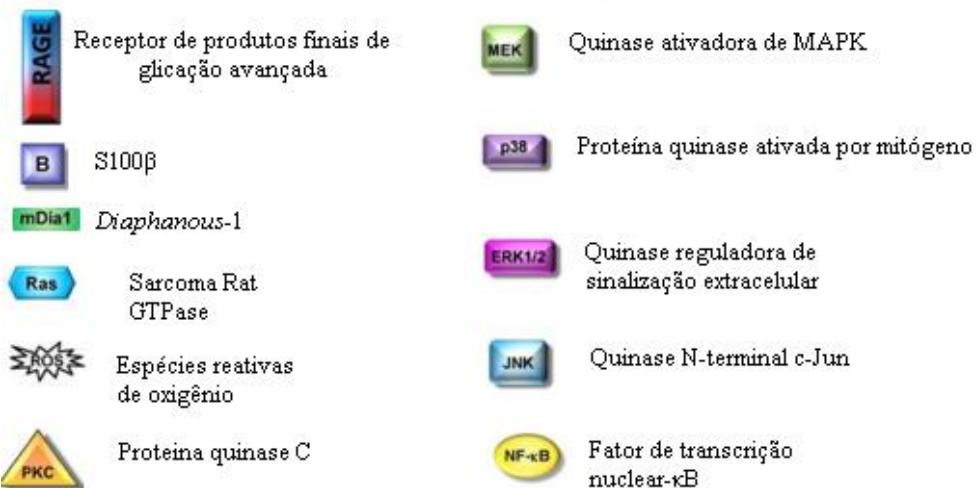
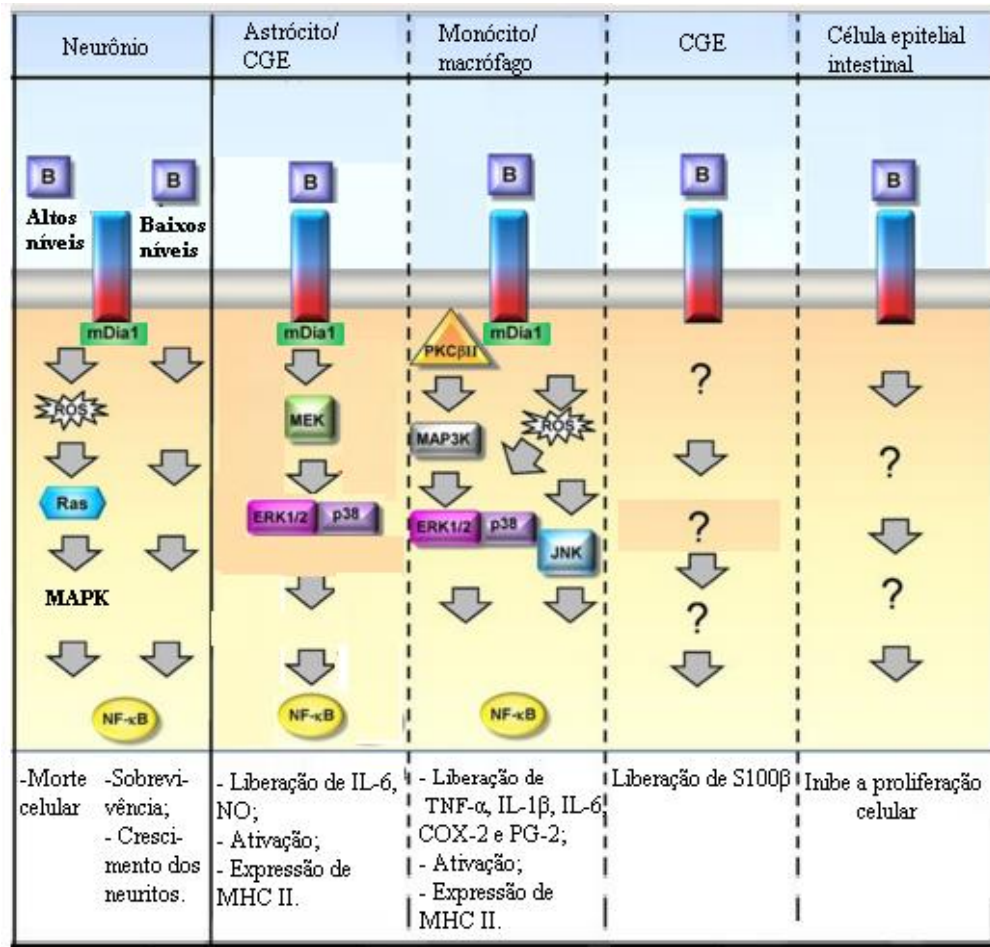
Figura 14 - Mecanismo de ativação e regulação de RAGE



Fonte: Kierdorf e Fritz (2013). mDia1= *Diaphanous-1*; RNAm= RNA mensageiro; sRAGE= Região do RAGE de ligação para o ligante extracelular. O esquema acima (figura acima) mostra que o ligante interage com o RAGE por meio do seu domínio sRAGE, recrutando mDia1, que por sua vez ativa a via MAPK que promove a fosforilação de IκB com consequente ativação de NFκB e translocação desse fator de transcrição para o núcleo que promove aumento da transcrição gênica de citocinas pró-inflamatórias e RAGE, contribuindo para a reciclagem do receptor RAGE.

Os efeitos celulares de S100B por meio de RAGE são variáveis e depende, conforme já mencionado anteriormente, da concentração de S100B no meio extracelular e do tipo de célula a ser estimulada. Em neurônios, altos níveis de S100B promove a formação de espécies reativas de oxigênio que culmina com a ativação de NFκB e resulta na morte de neurônios, enquanto baixos níveis desse ligante também promove a ativação de NFκB, que por sua vez estimula a transcrição de fatores antiapoptóticos como Bcl-2, resultando na sobrevivência neuronal e no desenvolvimento de neuritos. Em astrócitos ou células gliais entéricas a ativação da via S100B/RAGE/NFκB promove a liberação de óxido nítrico e de IL-6, a ativação de células gliais e a expressão de MHC classe II. Em macrófagos também ocorre ativação de NFκB que resulta na liberação de TNF-α, IL-1β, IL-6, COX-2 e prostaglandina D2 (PGD2), na ativação de macrófagos e na expressão de MHC classe II. A via de sinalização envolvida na liberação de S100B por via autócrina é desconhecida, assim como a via envolvida na inibição da proliferação de células epiteliais intestinais por S100B/RAGE (KIERDORF; FRITZ, 2013) (figura 15).

Figura 15 - Efeito da ativação do receptor RAGE por S100B em diferentes células



Fonte: Adaptado de Kierdorf e Fritz (2013). S100B ao se ligar ao receptor RAGE, localizado em neurônios, astrócitos, células gliais entéricas, monócito/macrófago e células epiteliais intestinais, ativa-o e recruta a molécula *diaphanous-1* (mDia1) que culmina, na maioria das células, na ativação de NF κ B, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias, óxido nítrico e na ativação de macrófagos/monócitos e células gliais entéricas. Os mecanismos pelos quais a ativação de RAGE por S100B inibe a proliferação em células epiteliais intestinais e estimula por via autócrina a liberação de S100B por CGE ainda é desconhecido.

Dentre os inibidores de S100B, os anticorpos neutralizantes e a pentamidina vem sendo utilizados em modelos experimentais de doença de Alzheimer, de colite induzida por sulfato de sódio dextrano (DSS) e de mucosite induzida por 5-fluorouracil para investigar o papel desse sinalizador na patogênese dessas doenças (CIRILLO *et al.*, 2015; COSTA *et al.*, 2019; ESPOSITO *et al.*, 2012). Nesses modelos, a pentamidina é utilizada devido a sua capacidade de se ligar ao S100B, impedindo a sua interação com o receptor RAGE (CIRILLO *et al.*, 2015).

O isotiocianato de pentamidina [1,5-di(4-amidinofenoxy)pentano] foi descoberto em 1938, como um fármaco antiprotozoário, e aprovado nos Estados Unidos para o tratamento de *Pneumocystis carinii* e de doenças causadas por protozoários, como a Leishmaniose e a tripanossomíase (DRAKE *et al.*, 1985; RYBNIKER *et al.*, 2010). O seu efeito antiprotozoário é, em parte, devido à inibição da topoisomerase II e à sua ligação a regiões do DNA rica em adenina-timina (COSTA, 2016; CHOUDHURY; LEIBOWITZ, 2003; JUNG *et al.*, 2011; SINGH; DEY, 2007).

Pentamidina tem um potente efeito antitumoral por inibir as enzimas fosfatase de regeneração hepática (PRL) oncogênica, envolvida na regulação da proliferação celular, e endonuclease, que é suprarregulada em vários tipos de câncer e está envolvida no reparo do DNA, e a topoisomerase II, promovendo a morte de células cancerígenas por impedir a separação da dupla fita de DNA durante a mitose (IMREH *et al.*, 2011; PATHAK *et al.*, 2002). No melanoma maligno, que apresenta suprarregulação de S100B, o efeito anticancer desse fármaco é mediado pela inibição da formação do complexo dependente de cálcio de S100B com p53 (CAVALIER *et al.*, 2016).

Para inibir S100B, pentamidina se liga ao resíduo aromático na hélice 4 e na alça C-terminal de S100B (MARKOWITZ *et al.*, 2004). Uma molécula de pentamidina se liga ao sítio de ligação do peptídeo p53 (denominado sítio 1) e a segunda molécula a um sítio independente (denominado sítio 2), que é adjacente ao bem caracterizado sítio de ligação do Zn^{2+} , formando um complexo pentamidina- Ca^{2+} -S100B ou Pentamidina- Zn^{2+} , Ca^{2+} -S100B (CAVALIER *et al.*, 2016; CHARPENTIER *et al.*, 2008; MARKOWITZ *et al.*, 2004; WILDER *et al.*, 2005). Dessa forma, impedindo a interação de S100B com o receptor RAGE.

Outro modulador da via S100B/RAGE é o N-Benzil-N-ciclohexil-4-clorobenzamida (FPSZM1), um antagonista do receptor RAGE de alta afinidade. Para bloquear a interação de S100B com o receptor RAGE, FPSZM1 se liga ao domínio V do receptor RAGE, inibindo o recrutamento de mDia1 (BONGARZONE *et al.*, 2017; MANIGRASSO *et al.*, 2016). FPSZM1 é um fármaco promissor para doenças inflamatórias intestinais, uma vez que inibiu

marcadamente o dano tecidual e suprimiu a resposta pró-inflamatória na colite induzida por DSS (BODY-MALAPEL *et al.*, 2018).

1.7 Alterações do sistema nervoso entérico em doenças inflamatórias intestinais

A inflamação crônica no intestino pode ocasionar importantes alterações no sistema nervoso entérico, conforme demonstrado por vários estudos que foram realizados em pacientes com doença inflamatória intestinal, sendo a colite ulcerativa e a doença de Crohn as mais investigadas (COSTA., 2016; BERNARDINI *et al.*, 2012; VON BOYEN *et al.*, 2011). Ambas, a colite ulcerativa e a doença de Crohn são caracterizadas por uma inflamação no intestino, que é acompanhada por uma ampla liberação de citocinas pró-inflamatórias e seguem com dismotilidade intestinal (BASSOTI *et al.*, 2014; SCHREIBER *et al.*, 1999).

Alterações em componentes dos SNE, como neurônios entéricos e CGEs já foram reportados em amostras de biópsias de pacientes com colite ulcerativa. Onde houve redução de aproximadamente 61% dos neurônios entéricos e de 38% das células gliais. (BERNARDINI *et al.*, 2012). Esses dados mostraram que há uma perda maior de neurônios do que de células gliais na colite ulcerativa.

Em um estudo piloto com amostras colônicas de biópsias de pacientes em uso de quimioterápicos como 5-Fluorouracil (5-FU e oxaliplatina) foi evidenciado alterações eletrofisiológicas (hiperexcitabilidade neuronal) e morfológicas (aumento da expressão de HuC/D no núcleo de neurônios, indicando dano neuronal) em neurônios do plexo mioentérico (CARBONE *et al.*, 2016).

Recentemente, foi evidenciado o papel regulatório da CGE na barreira epitelial funcional e na inflamação através da liberação de GSNO, encontrando-se este reduzido em doenças inflamatórias, como a doença de Crohn (SAVIDGE *et al.*, 2007).

Ainda nesse contexto da colite ulcerativa, Cirillo *et al.* (2009) demonstrou que a produção aumentada de óxido nítrico na mucosa de pacientes com colite ulcerativa é decorrente, em parte, de expressão aumentada de S100B por CGE.

Importantes polimorfismos no receptor RAGE foram identificados em chineses com colite ulcerativa e doença de Crohn (WANG *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2014). Alterações genéticas nesse receptor são consideradas relevantes, uma vez que no intestino esse receptor é expresso por macrófagos, células epiteliais intestinais, células gliais entéricas e neurônios (CIRILLO *et al.*, 2011; DONATO *et al.*, 2009; TURCO *et al.*, 2012).

Pacientes apresentando colite ulcerativa, doença de Crohn ou colite infecciosa (por *C. difficile*) exibiram aumento da expressão proteica e da imunomarcagem de GDNF e GFAP na mucosa colônica inflamada (VON BOYEN *et al.*, 2011).

Um estudo com 447 e 444 pacientes com diarreia associada ao *C. difficile* adquiridas respectivamente na comunidade e no hospital evidenciou distonias gastrintestinais nesses pacientes após um ano da infecção. Dentre as distonias estão doença inflamatória intestinal, doença do refluxo gastro-esofágico, constipação e dispepsia (GUTIERREZ *et al.*, 2015). Essas distonias podem ter importante relação com alterações do SNE induzidas por toxinas do *C. difficile*.

O foco dos primeiros estudos sobre alterações no SNE evocadas pelas toxinas do *C. difficile* foi os neurônios entéricos, com ênfase na TcdA (XIA *et al.*, 2000; KEATES *et al.*, 1998; CASTAGLIUOLO *et al.*, 1994).

TcdA estimula neurônios sensoriais primários e células imunes a liberar substância P, resultando em secreção de fluidos e inflamação (POTHOULAKIS *et al.*, 1994). Posteriormente, a ativação precoce de neurônios foi implicada na enterotoxicidade dessa toxina (CASTAGLIUOLO *et al.*, 1994). Ademais, a secreção de fluidos induzida por TcdA foi associada com ativação de neurônios aferentes sensoriais que induz a liberação do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (KEATES *et al.*, 1998).

Xia *et al* (2000) mostrou que TcdA excita os neurônios entéricos que induz diarreia secretória e recrutamento de neutrófilos por meio da inibição da transmissão noradrenérgica.

Posteriormente, o efeito de TcdB em neurônios entéricos também foi estudado (NEUNLIST *et al.*, 2003; TIXIER *et al.*, 2005). Um estudo mostrou que TcdB estimula a liberação de VIP por neurônios entéricos do plexo submucoso via IL-1 β (NEUNLIST *et al.*, 2003). Outro estudo demonstrou que TcdB induz produção de IL-8 em co-cultura da mucosa e submucosa de amostra colônica humana, em níveis acentuadamente maior comparado a cultura dessas camadas de forma isolada (TIXIER *et al.*, 2005).

Recentemente, Belkind-Gerson *et al.* (2017) evidenciou que ICD aumenta a população de células expressando HU e SOX2 de forma concomitante em amostras de biópsias de cólon de pacientes. Essas células são importantes para a reposição de neurônios após o dano tecidual.

Anteriormente, acreditava-se que as CGEs apresentavam apenas função de suporte para os neurônios entéricos. Devido a isso, os estudos dos efeitos das toxinas do *C. difficile* em CGEs iniciaram-se tardiamente comparado aos dos neurônios entéricos.

TcdB estimula alteração morfológica e apoptose de CGEs *in vitro* (FETTUCCIARI *et al.*, 2017; MACCHIONI *et al.*, 2017). A apoptose de CGEs induzida por TcdB tem participação da via de sinalização NADPH oxidase/ROS/JNK/caspase-3 de forma independente da via mitocondrial (MACCHIONI *et al.*, 2017).

Adicionalmente, TcdB induz senescência em CGEs. A senescência celular é caracterizada por alteração no ciclo celular, mudanças no metabolismo, morfologia e expressão gênica que, em conjunto, podem contribuir para inflamação persistente (FETTUCCIARI *et al.*, 2018).

Até o desenvolvimento do presente estudo, nenhum trabalho sobre o efeito direto da TcdA em CGEs foi mencionado na literatura.

2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

O *C. difficile* se destaca mundialmente por sua alta incidência nos ambientes hospitalares e ao alto impacto para a evolução do paciente. Nos EUA, em 2010, o número de infecções hospitalares causadas pelo *C. 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). Estima-se que 453,000 casos, 83,000 recorrências e 15,000 mortes ocorrerão anualmente, gerando gastos de aproximadamente 40 bilhões de dólares (BATLETT, 2017; LESSA; WINSTON; McDONALD, 2015). Em relação às doenças do trato gastrointestinal, ICD é considerada a décima causa de readmissão em menos de 30 dias e a quinta causa de morte por doenças gastrointestinais não malignas nos EUA (PEERY *et al.*, 2019).

Pacientes apresentando colite infecciosa por *C. difficile* exibem aumento da expressão proteica e da imunomarcagem de GDNF e GFAP, ambos expressos apenas pela glia entérica no intestino, na mucosa colônica inflamada (VON BOYEN *et al.*, 2011). Além disso, pacientes com diarreia associada ao *C. difficile* adquiridas na comunidade ou no hospital mostraram tendência no surgimento de distonilidades gastrointestinais (GUTIERREZ *et al.*, 2015). A patogênese da lesão intestinal por toxinas do *C. difficile*, incluindo essas distonilidades gastrointestinais, podem ter importante participação da glia entérica.

Tendo em vista o crescente aumento da infecção pelo *C. difficile*, vários grupos de pesquisa em todo o mundo estão empenhados em compreender os diversos aspectos do mecanismo da doença e desenvolver tratamentos mais eficazes, uma vez que a gravidade da doença não tem sido relacionada com a susceptibilidade da bactéria a antibioticoterapia vigente (metronidazol, vancomicina, fidaxomicina, tigeciclina e rifaximin). Em vez disso, a resposta imune do paciente aos fatores de virulência do *C. difficile* é crucial para o desfecho da doença (YU *et al.*, 2016).

Dessa forma, diante da importância das células gliais para a atividade neuronal, assim como para a função do epitélio intestinal, este estudo se propõe a estudar as alterações da proteína glial entérica S100B na infecção por *C. difficile* em humanos e em modelo experimental, bem como na ileíte induzida por TcdA. Além disso, outro foco deste trabalho foi investigar os efeitos de TcdA e TcdB em CGEs, bem como a participação da sinalização S100B/RAGE.

Este estudo foi de grande relevância, uma vez que, pela primeira vez mostrou-se que S100B é suprarregulado em humanos com ICD e em modelo experimental de ICD e ileíte induzida por TcdA. Ademais, propiciou o melhor entendimento de como a expressão de S100B

e IL-6, bem como a apoptose em CGEs são reguladas quando essas células são afetadas diretamente pelas TcdA e TcdB.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar as alterações na expressão de S100B por CGEs em tecidos intestinais de pacientes com ICD, bem como em modelos de camundongos, e o papel da sinalização de S100B/RAGE na expressão de S100B e IL-6, bem como na apoptose, induzidas por TcdA e TcdB em CGEs.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar a expressão de S100B em biopsias colônicas humanas e cólon de camundongos com ICD, bem como no íleo de camundongos expostos a TcdA.
- Identificar as alterações induzidas pelas TcdA e TcdB na viabilidade, na morfologia, na apoptose, na expressão de fatores gliais entéricos (S100B, GFAP e GDNF) e IL-6 em CGEs;
- Verificar a ativação de NFκB em células gliais entéricas expostas a TcdA e TcdB;
- Determinar o efeito do inibidor de S100B na expressão e secreção de S100B e IL-6 induzidas por TcdA e TcdB em CGEs;
- Avaliar a expressão de RAGE em CGEs expostas a TcdA e TcdB e estudar o efeito do antagonista do receptor RAGE na apoptose, na expressão e secreção de S100B e IL-6 induzidas por essas toxinas em CGEs;
- Verificar o efeito do inibidor de PI3K na apoptose, na expressão e secreção de S100B e IL-6 induzidas por TcdA e TcdB em CGEs;
- Avaliar a ativação de STAT3 em CGEs expostas a TcdA e TcdB;
- Estudar o efeito do inibidor de STAT3 na apoptose, na expressão e secreção de S100B e IL-6 induzidas por TcdA e TcdB em CGEs;
- Verificar a participação de S100B no efeito antiapoptótico do inibidor de STAT3 em CGEs expostas a TcdA e TcdB.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Fármacos, reagentes, materiais e soluções utilizados no estudo

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

4.2 Experimentos com biópsias humanas e em camundongos

4.2.1 Amostras clínicas

Após a revisão e aprovação do protocolo do quadro de revisão institucional (IRB), amostras de ressecção cirúrgica intestinal de pacientes com CDI, já fixadas e emblocadas em parafina, foram obtidas a partir do centro de pesquisa em tecido e biorepositório da *University of Virginia* (UVa, EUA).

4.2.2 Aspectos éticos em pesquisa animal

Os experimentos realizados em camundongos C57BL/6 foram aprovados pela Comissão Institucional de Ética e Cuidados em Pesquisa Animal da *University of Virginia* (Uva, EUA). Enquanto que os experimentos realizados em camundongos Swiss foram deferidos pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

4.2.3 Animais

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

4.2.4 Preparação da bactéria

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

Para a preparação do inóculo, inicialmente, 100µL do estoque de *C. difficile* VPI10463 (em fase de esporo em caldo de carne picada, CCP) foi adicionado em CCP (10 mL). Para atingir um crescimento de fase log, a amostra foi incubada por 18h a 37°C. Em seguida, 1 mL desse cultivo foi transferido para um microtubo de 1,5 mL e centrifugado (10000 rpm por 2 min). Para obter 10⁵ UFC (Unidades formadoras de colônia) de *C. difficile* VPI10463/100µL, realizou-se uma diluição de 1:100 (bactéria em suspensão:CCP). A leitura de densidade óptica de 1,0 foi considerada ser equivalente a 10⁸ unidades formadoras de colônias (UFC/ml).

Nos grupos infectados, 10⁵ unidades formadoras de colônia (UFC) de *C. difficile* VPI10463 foram inoculadas por gavagem para cada animal e para os animais não infectados foi injetado CCP.

4.2.5 Modelo de infecção por *C. difficile*

O modelo ICD foi realizado conforme descrito anteriormente (MOORE *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2008). Inicialmente, os camundongos C57BL/6 (n = 5 para cada grupo) foram pré-tratados por três dias (1º, 2º e 3º dia do protocolo experimental) com gentamicina (0,035 mg/mL), colistina (850 U/mL), metronidazol (0,215 mg/mL) e vancomicina (0,045 mg/mL) que foram adicionados a água de beber dos animais. Dois dias após a esse pré-tratamento (no 6º dia do protocolo experimental), os camundongos receberam clindamicina (32 mg/kg) por via subcutânea. Após 24h da administração de clindamicina, os camundongos receberam 10⁵ UFC da forma vegetativa de *C. difficile* VPI10463 em CCP por gavagem (7º dia do protocolo experimental). Ao grupo controle foi administrado apenas CCP. O peso e o desenvolvimento dos sintomas da doença de cada animal foram monitorizados diariamente. Animais que ficaram moribundos ou perderam > 20% do peso corporal foram eutanasiados.

Os animais foram eutanasiados no 10º dia do protocolo experimental, que corresponde ao pico de infecção, para obtenção de segmentos do ceco para realização de imunohistoquímica.

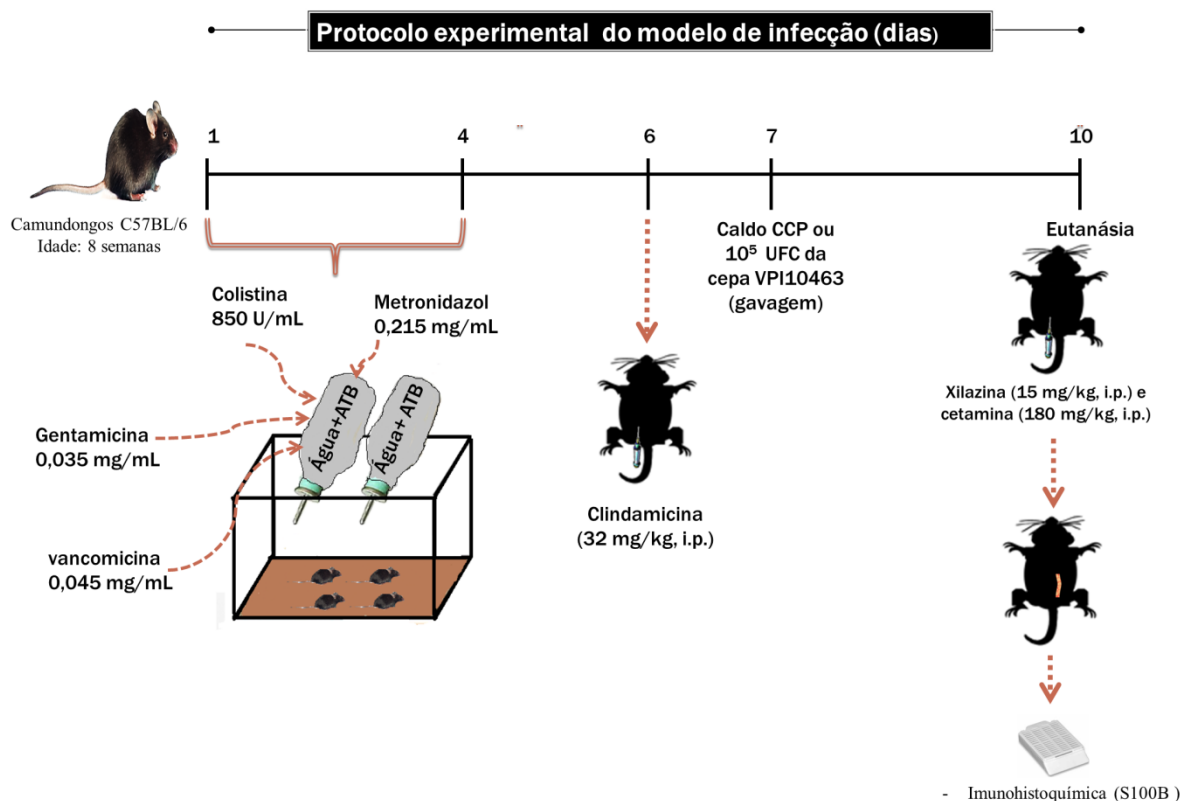
4.2.6 Grupos experimentais para o modelo de infecção

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

- Grupo controle: camundongos C57BL/6 submetidos ao mesmo protocolo experimental dos animais infectados por *C. difficile* até o 6º dia do protocolo experimental, porém receberam apenas CCP por gavagem no 7º dia do protocolo experimental.
- Grupo infectado por *C. difficile* (ICD): camundongos C57BL/6 submetidos ao modelo de ICD, recebendo 10^5 UFC de *C. difficile* VPI10463 no 7º dia do protocolo experimental.

Os animais foram eutanasiados no 10º dia do protocolo experimental com cetamina e xilazina (180 e 15 mg/kg, i.p.), conforme demonstrado na figura 16.

Figura 16 - Esquema de indução do modelo de ICD e protocolo experimental.



Fonte: Elaborado pela autora. CCP= caldo carne picada; i. p. = intraperitoneal.

4.2.7 Modelo de ileíte induzida por TcdA

O modelo de enterite induzida por TcdA foi realizado conforme descrito previamente (TINOCO-VERAS *et al.*, 2017; JUNQUEIRA *et al.*, 2011; RIEGLER *et al.*, 1998).

Os animais foram submetidos a jejum durante 4h, sendo permitido somente o acesso à água. Na etapa seguinte, os camundongos foram anestesiados com cetamina e xilazina (60 e 5 mg/kg, i.p.). Em seguida, foram submetidos à laparotomia mediana e duas ligaduras na região do íleo, distando aproximadamente 4 cm entre si, na porção distal desse segmento, foi realizada, formando uma alça ileal. No interior da alça ileal, injetou-se 0,2 mL de PBS ou de TcdA purificada da cepa VPI10463 do *C. difficile* (50 µg/alça). Em seguida, o abdômen do animal foi suturado. Após 4h da administração de TcdA, os animais foram eutanasiados, administrando cetamina e xilazina (180 e 5 mg/kg, i.p.). Por fim, segmentos da alça ileal foram removidos para análise dos parâmetros deste estudo.

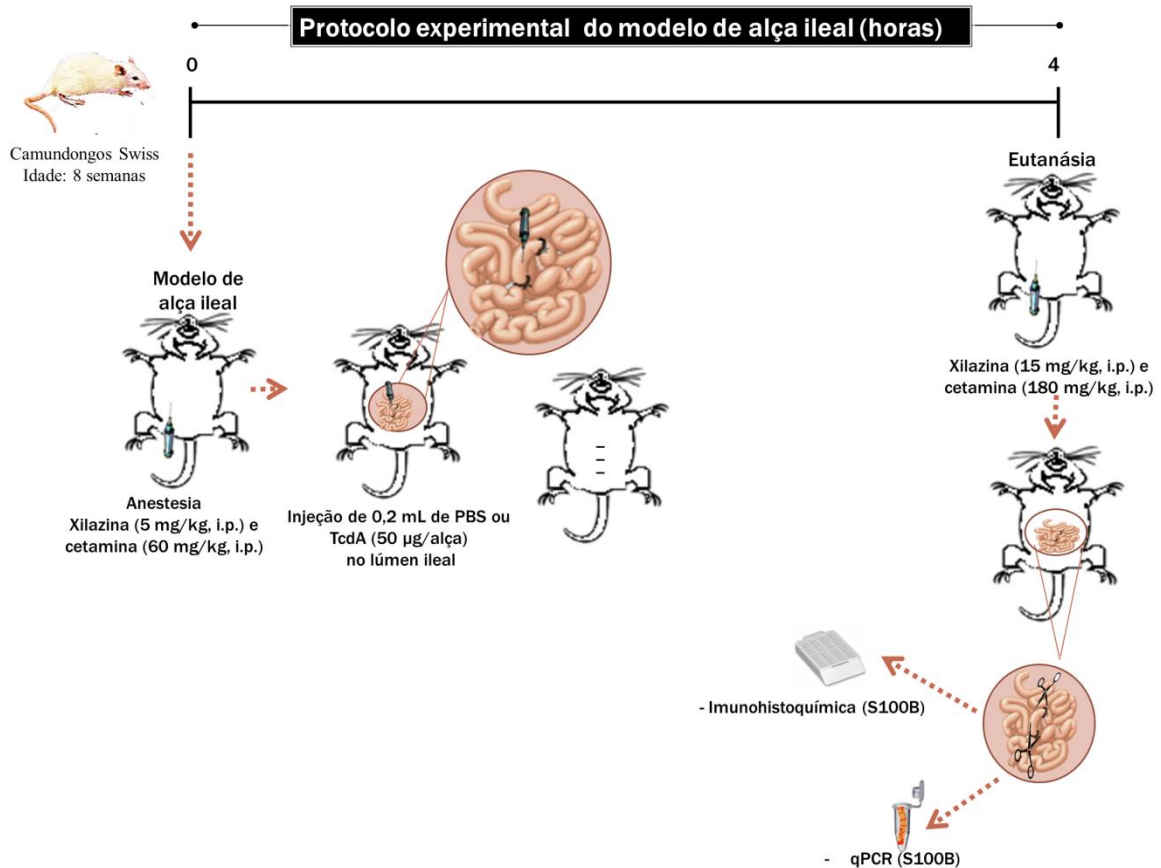
4.2.8 Grupos experimentais para o modelo de lesão ileal induzida pela TcdA

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

- **Grupo controle:** Camundongos que receberam no interior no lúmen da alça ileal 0,2 mL de PBS.
- **Grupo TcdA:** Camundongos que receberam no interior no lúmen da alça ileal TcdA (50 µg/alça) diluída em volume final de 0,2 mL de PBS.

Os animais foram eutanasiados com cetamina e xilazina (180 e 15 mg/kg, i.p.) 4 h após a administração de PBS ou de TcdA e segmentos do íleo foram retirados para a análise dos parâmetros conforme apresentado na figura 17.

Figura 17 - Esquema de alça ileal para indução de ileíte pela administração de TcdA e protocolo experimental



Fonte: Elaborado pela autora. i. p. = intraperitoneal, TcdA= Toxina A do *C. difficile*.

4.2.9 Parâmetros avaliados

4.2.9.1 Imunohistoquímica

Com o objetivo de verificar as alterações na expressão de S100B, uma proteína expressa por CGEs no intestino, foi realizado imunohistoquímica em amostras de biópsias colônicas humanas de indivíduos com ICD ativa, assim como em amostras do ceco e do íleo de camundongos submetidos ao modelo experimental de ICD e ileíte induzida por TcdA respectivamente.

Amostras do intestino foram fixadas em formol tamponado a 10% por 20 h e processados para inclusão em parafina. Após a inclusão em parafina, os segmentos intestinais foram cortados em micrótomo, obtendo-se espessuras de 4µm que foram inseridos em lâminas

histológicas silanizadas. Na etapa seguinte, as lâminas contendo os cortes dos tecidos intestinais foram submetidas à desparafinização: inseridas em estufa a 60°C overnight e três banhos em xilol por 5 min cada. Em seguida, os cortes intestinais foram hidratados com dois banhos de etanol absoluto, um banho em etanol a 90%, um banho em etanol a 80% e um banho em etanol a 70%, por 3 min cada. Ao final desta etapa, os cortes intestinais foram submersos a um banho de água destilada por 10 min e foi realizada a recuperação antigênica com tampão citrato (DAKO, pH 9,0) por 20 min em banho Maria (95°C). Em seguida, os tecidos foram lavados com tampão fosfato-salino (PBS) por 5 min. Na etapa seguinte, realizou-se o bloqueio da peroxidase com peróxido de hidrogênio a 3% (Sigma) por 30 min. Decorrido este tempo, as lâminas foram lavadas com PBS e foram incubadas com os anticorpos primários anti-S100B (DAKO Flex ou R&D system) por 3h em temperatura ambiente. Para confecção dos controles negativos, os anticorpos primários foram omitidos. Após este período, os cortes foram lavados três vezes com PBS e incubados com polímero (DAKO) por 30 min, exceto no caso do anticorpo anti-S100B (R&D system) que foi incubado com o anticorpo secundário anti-rabbit. Após a incubação com anticorpo secundário, incubou-se os cortes intestinais com o reagente A (biotina) e reagente B (estreptavidina) por 30 min. Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS durante 3 min cada, secadas e aplicado o DAB (DAKO, 3,3-diaminobenzidina, uma gota de DAB para um mL de diluente). DAB é um cromógeno que reage com a peroxidase do antígeno alvo resultando em coloração marrom. Dessa forma, observou-se as lâminas até aparecer uma coloração marrom, após este evento a reação foi parada imediatamente mergulhando-as em água destilada. Enfim, as lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Mayer e processadas para inserir a lamínula.

As imagens da imunohistoquímica 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 a área imunomarcada para S100B, utilizou-se o programa Adobe Photoshop 8.0 para obter a área total do tecido e a área imunomarcada. Em seguida, para mensurar a porcentagem (%) de área marcada, efetuou-se o seguinte cálculo:

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

4.2.9.2 Expressão Gênica de S100B, GFAP e GDNF por qPCR.

4.2.9.2.1 Preparação das amostras

Os fragmentos de íleo (modelo de ileíte induzida por TcdA) dos camundongos foram retirados e macerados em nitrogênio líquido. Posteriormente, os fragmentos macerados foram adicionados em microtubo com 175µL de tampão de lise (Promega, EUA). Em seguida, foram armazenados no freezer a -80°C até sua utilização para extração do RNA.

4.2.9.2.2 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 3 min 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 1 min. Adicionou-se 600 µL de solução de lavagem e em seguida os tubos foram centrifugados por 11200 RPM por 1 min. 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 H₂O livre de nuclease foram adicionados e os microtubos foram centrifugados por 1 min. 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 1µL de RNA de cada amostra, utilizando fluorímetro (Promega). 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).

4.2.9.2.3 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.

4.2.9.2.4 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

A expressão gênica de S100B, GFAP e GDNF foi avaliada por meio do sistema de PCR em tempo real (CFX96 real time system/c1000touch thermal cycler, BioRAD). O kit de TaqMan PCR master mix (Life Technologies) foi usado na amplificação de GFAP e S100β. Enquanto que para a amplificação de GDNF foi usado o kit SYBER Green PCR master mix (Life Technologies). O gene de referência utilizado foi o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Todas as sondas e primers utilizados e as condições do qPCR estão apresentadas no quadro 1.

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 1 - Sondas Taqman e primers para amostras de camundongos utilizadas no qPCR

GFAP (Proteína glial fibrilar ácida)	
ID assay	Mm01253033_m1
Taqman probe	AGAAAACCGCATCACCATTCCTGTA
Amplicon length:	75
S100 β (Fração beta da proteína S100)	
ID assay	Mm00485897_m1
Taqman probe	CTTCCTGGAGGAAATCAAGGAGGAGCAG
Amplicon length:	69
GAPDH (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase)	
ID assay	Mm99999915_g1
Taqman probe	GGTGTGAACGGATTTGGCCGTATTG
Amplicon length:	66
GDNF (Fator neurotrófico derivado da glia)	
Forward	GATATTGCAGCGGTTTCCTGT
Reverse	AACATGCCTGGCCTACTTTG
GAPDH	
Forward	AGAACATCATCCCTGCATCC
Reverse	CACATTGGGGGTAGGAACAC

Fonte: Elaborado pela autora.

4.3 Experimentos *in vitro* em linhagem de CGEs

4.3.1 Cultura de CGEs

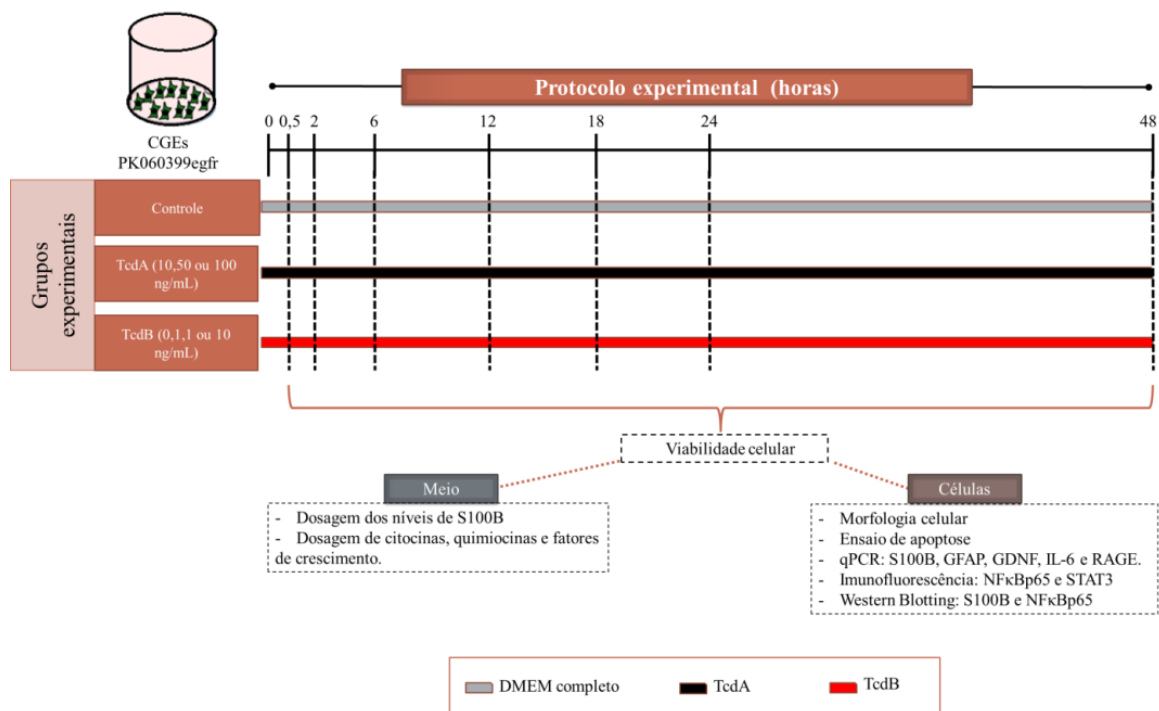
A linhagem de CGEs imortalizadas foram obtidas da ATCC (PK060399egfr, CRL 2690). Essas células são aderentes provenientes do jejuno de ratos Sprague-Dawley adultos. As CGEs foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de antibióticos (100 μ g/mL de penicilina e 100 μ g/mL de

estreptomicina) e 1 mM de piruvato de sódio, sendo mantidas em incubadora a 37°C e 5% CO₂. As células foram utilizadas para a avaliação dos parâmetros deste estudo entre as passagens 4 a 16. Para todos os experimentos, as células foram liberadas dos frascos de cultura por meio de 0.05% tripsina-EDTA por 5 min.

4.3.2 Administração de toxinas, fármacos e proteína em CGEs

As CGEs foram incubadas com TcdA (10, 50 ou 100 ng/mL) ou TcdB (0,1, 1 or 10 ng/mL) por 0,5, 2, 6, 12, 18, 24 and 48h para definir o melhor tempo experimental e concentração para avaliar os parâmetros deste estudo (figura 18).

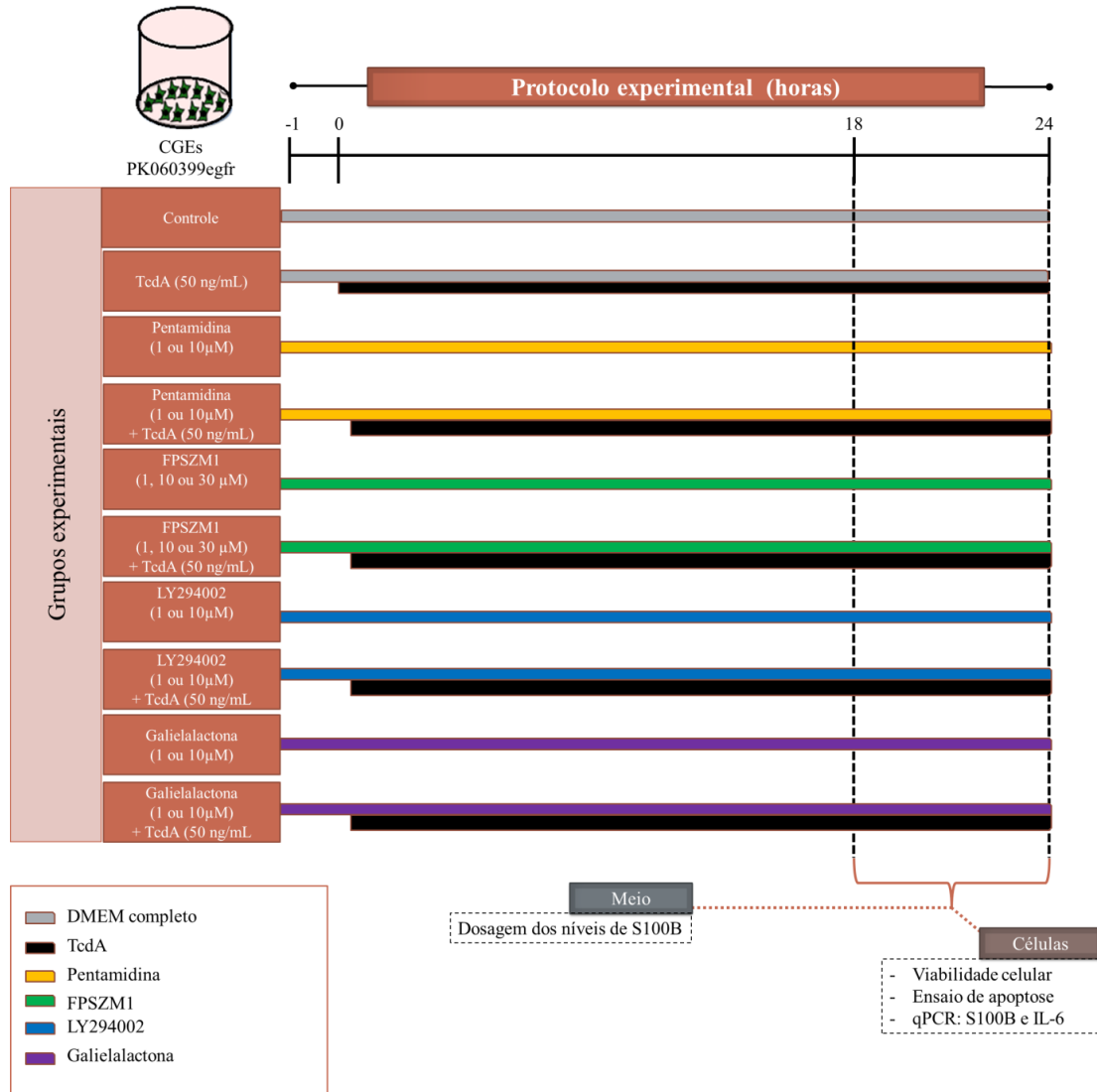
Figura 18 - Esquema de tratamento das CGEs com TcdA e TcdB e protocolo experimental



Fonte: Elaborado pela autora.

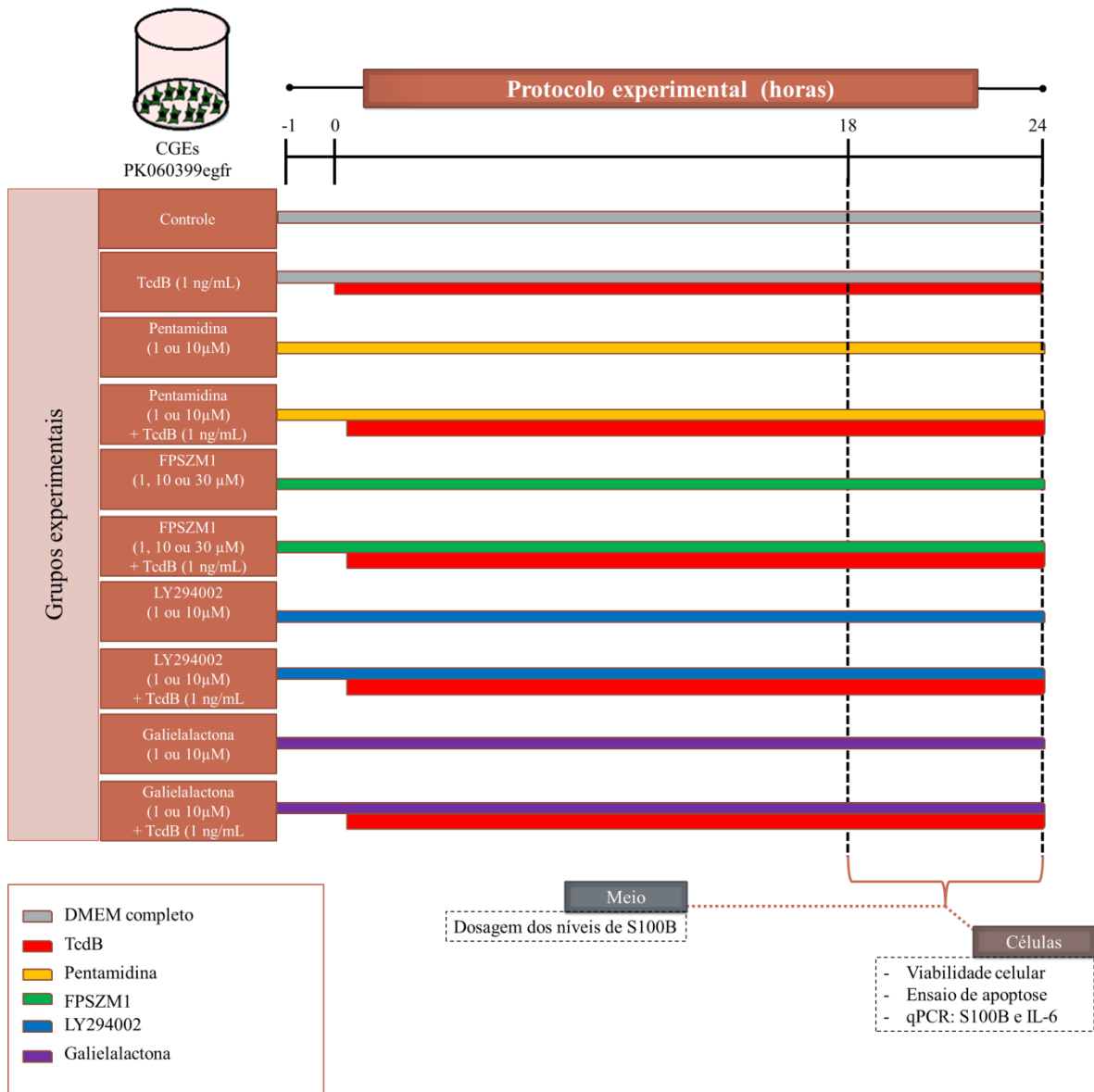
Para estudar o papel da via S100B/RAGE nas alterações induzidas por TcdA e TcdB em CGEs, as células foram incubadas com Pentamidina (1 e 10 μM), um inibidor de S100B, FPSZM1 (1, 10 e 30 μM), um antagonista do receptor RAGE de alta afinidade, LY294002 (1 e 10 μM LY294002), um inibidor de a PI3-quinase (PI3K) e galielalactona (1 e 10 μM), um inibidor de STAT3, uma hora antes da incubação com as TcdA (figura 19) ou TcdB (figura 20).

Figura 19 - Esquema de tratamento de CGEs com moduladores da via S100B/RAGE na presença de TcdA e protocolo experimental



Fonte: Elaborado pela autora. Pentamidina= inibidor de S100B; FPSZM1= antagonista do receptor RAGE; LY294002= inibidor de PI3K; Galielalactona= Inibidor seletivo de STAT3.

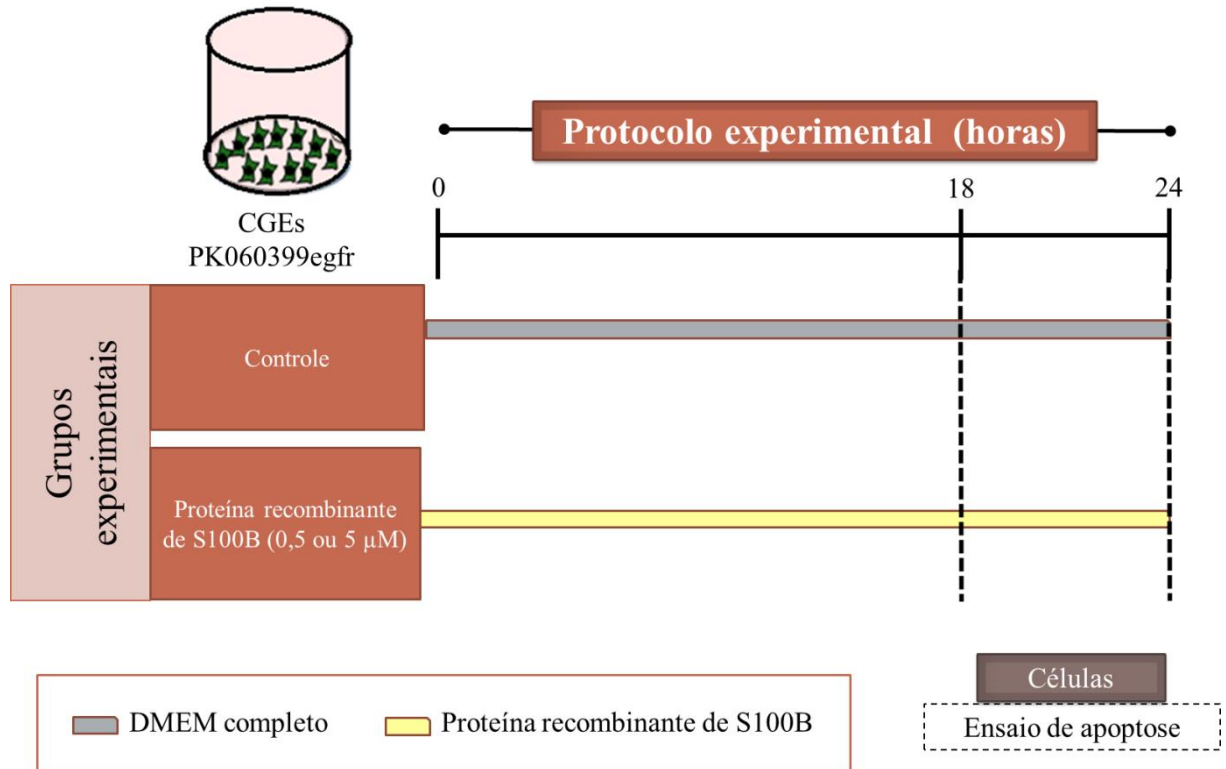
Figura 20 - Esquema de tratamento de CGEs com moduladores da via S100B/RAGE na presença de TcdB e protocolo experimental



Fonte: Elaborado pela autora. Pentamidina= inibidor de S100B; FPSZM1= antagonista do receptor RAGE; LY294002= inibidor de PI3K; Galielalactona= Inibidor seletivo de STAT3.

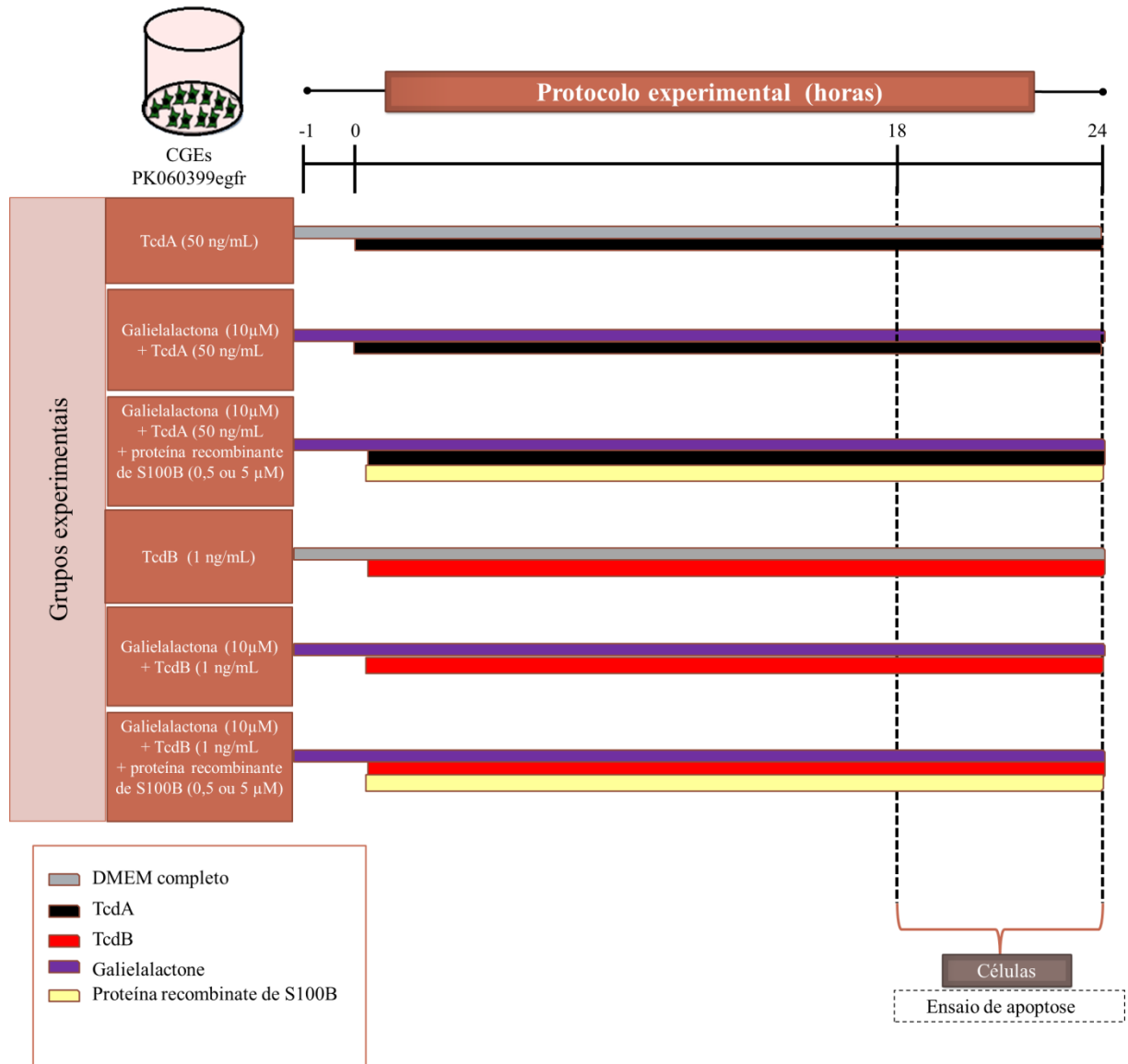
Para avaliar o efeito direto de S100B na apoptose de CGEs (figura 21), bem como sua participação nos efeitos de galielalactona em CGEs expostas à TcdA and TcdB, a proteína recombinante S100B (Sigma) foi injetada após a incubação dessas células com essas toxinas na presença ou ausência de galielalactona (figura 22).

Figura 21 - Esquema de tratamento de CGEs com galielalactona na presença de TcdA e TcdB e/ou proteína S100B recombinante e protocolo experimental



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 22 - Esquema de tratamento de CGEs com galielalactona na presença de TcdA e TcdB e/ou proteína S100B recombinante e protocolo experimental



Fonte: Elaborado pela autora. i. p. Galielalactona= Inibidor seletivo de STAT3.

4.3.3 Parametros avaliados

4.3.3.1 Ensaio de viabilidade celular

Para definir as concentrações de TcdA ou TcdB capazes de afetar a viabilidade de CGEs foi realizado o ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio

(MTT). As CGEs (5×10^3 células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços e após 24h foram incubadas com TcdA ou TcdB em diferentes períodos de incubação (0,5, 2, 6, 12, 18, 24 e 48h). Em seguida, as células foram incubadas com MTT (0,5 mg/mL reconstituído em DMEM suplementado) por 2h a 37°C em incubadora úmida sob condição de 5% de CO₂. Após remoção da solução de MTT, 150 µl de dimetilsulfóxido foram adicionados a cada poço para ressuspender os cristais de formazana. As placas foram agitadas durante 2 min em temperatura ambiente e a absorbância da reação foi mensurada a 570 nm utilizando um leitor de ELISA. Um grupo controle de morte, no qual CGEs foram incubadas com dimetilsulfóxido (DMSO), foi adicionado ao experimento.

Para definir as concentrações de pentamidina, FPSZM1, LY294002 e galielalactona capazes de não afetar a viabilidade de CGEs em 18h de incubação foi realizado o ensaio de MTT conforme já descrito.

4.3.3.2 Avaliação da morfologia celular

Para análise morfológica, CGEs (5×10^3 células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas com TcdA (10, 50 e 100 ng/mL) ou TcdB (0,1, 1 e 10 ng/mL) em diferentes períodos de incubação (30 min, equivalente a 0,5 h, 2, 6, 12, 18 e 24h). Após a incubação com as toxinas do *C. difficile*, a porcentagem de células arredondadas foi obtida contando as células arredondadas e não arredondadas a partir do centro do poço. As células foram discriminadas usando microscópio de contraste (LEICA).

4.3.3.3 Ensaio de apoptose

Para avaliar apoptose em CGEs incubadas com TcdA ou TcdB, realizou-se um ensaio de apoptose em tempo real em células vivas conforme descrito pelo fabricante (ensaio em tempo real Glo-anexina V apoptose, Promega). Primeiramente, CGEs (10^4 células/poço) foram plaqueadas em placas brancas e opacas de 96 poços (Falcon). Após 24h, as células foram incubadas com TcdA (10, 50 e 100 ng/mL) ou TcdB (0,1, 1 e 10 ng/mL) isoladamente ou precedida por FPSZM1 (30µM), cloridrato LY294002 (10µM) ou Galielalactona (10µM). Em seguida, adicionaram-se 200 µL de reagente de detecção 2x (2 µL do substrato de anexina NanoBit, 2 µL CaCl₂, 2 µL anexina V-SmBit e 2 µL anexina V-LgBit em 1000 µL de DMEM suplementado pré-aquecido a 37°C) a cada poço, sendo incubadas a 37°C numa incubadora humidificada sob 5% CO₂ condição. A luminescência foi mensurada por meio de um

luminometro (*NanoLuc technology*, PROMEGA). Para a obtenção da unidade de luminescência relativa (ULR), o sinal de luminência de todas as amostras foi subtraído pela luminescência intrínseca do reagente de detecção (poço apenas com DMEM suplementado sem células).

4.3.3.4 Dosagem dos níveis de S100B

A secreção de S100B por CGEs desafiadas com TcdA ou TcdB (na presença ou ausência de FPSZM1, LY294002 ou galielalactona) foi medido com o kit DuoSet S100B (R&D system) por ELISA de acordo com o protocolo do fabricante. CGEs (6×10^5 células/ poços) foram semeados em placas de 6 poços e tratados TcdA ou TcdB em diferentes tempos experimentais (2, 6, 12, 18 e 24h). O sobrenadante das CGEs foi coletado (armazenado a -80°C até o uso) e centrifugado (10.000 rpm, 10 min, 4°C). Após sensibilizar as placas de alta ligação para proteínas (Greiner Bio-One) com o anticorpo de captura overnight e bloquear com solução de bloqueio (BSA 1% em PBS) por 1h, as placas foram incubadas com 100 μL de amostra ou proteína S100B, padrão diluído em reagente diluente (50mM Tris, 10 mM CaCl_2 , 0,15M NaCl, 0,05% Brij35, pH 7,5), por 2h. Após lavagem das placas com tampão de lavagem (Tween 20 0,05% em PBS), as mesmas foram incubadas com 100 μL de anticorpo de detecção diluído em reagente diluente por 2h. Em seguida, foram lavadas novamente e incubadas por 20 min com 100 μL de estreptavidina-HRP. Na etapa seguinte, adicionaram-se 100 μL da mistura de H_2O_2 (reagente A) e tetrametilbenzidina (reagente B), sendo incubados por 20 min. Após a reação com essa solução, 50 μL de $2\text{NH}_2\text{SO}_4$ (solução de parada) foi acrescentado a cada poço e a absorbância da reação foi mensurada em 450 nm utilizando um leitor de placas Epoch (Biotek). A faixa de detecção da proteína S100B presente nas amostras foi de 46,9 a 3000 pg / mL.

4.3.3.5 Avaliação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias

Os níveis de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias no sobrenadante de CGEs desafiadas com TcdA ou TcdB foram mensurados utilizando-se um ensaio de citocinas Bio-Plex Rat, 9-Plex (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL- 10, GM-CSF, INF- γ e TNF- α) conforme as instruções do fabricante. A intensidade de fluorescência foi detectada por uma tecnologia Luminex Xmap (Bio-Rad). Para todas as citocinas, a sensibilidade foi <10 pg / mL.

Além disso, os níveis de IL-6 e IL-1 β foram confirmados pelo kit DuoSet IL-6 e IL-1 β (R&D system) por ELISA conforme já descrito na seção anterior. A absorbância foi mensurada em 450 nm utilizando um leitor de placas Epoch (Biotek).

4.3.3.6 Expressão Gênica de S100B, GFAP, GDNF, IL-6 e RAGE por qPCR

Para avaliar a expressão gênica de fatores gliais (S100B, GFAP e GDNF), IL-6 e RAGE em CGEs expostas à TcdA e TcdB, realizou-se qPCR.

CGEs (6×10^5 células/ poço) foram distribuídas em placas de 6 poços e tratadas com TcdA ou TcdB e moduladores farmacológicos por 18h. Após a incubação, o RNA total foi extraído usando o kit RNeasy Plus Mini (Qiagen, Hilden, Alemanha) por meio do QIAcube (Qiagen). Em seguida, o RNA foi quantificado por meio do fluorímetro Qubit 3.0 (Life technologies) usando o kit de ensaio Qubit RNA BR (Invitrogen).

Para a síntese do cDNA, 600 ng de RNA foi então transcrito reversamente usando o kit de síntese de cDNA iScript (BioRad) após remoção da contaminação do DNA genômico por meio do tratamento das amostras com DNase I (Invitrogen).

A amplificação de S100B, IL-6, GFAP, GDNF, RAGE e GAPDH por qPCR a partir de amostras de CGEs processadas foi realizada por meio do sistema CFX Connect (BioRad) com as seguintes condições 95 ° C por 30s seguido por 40 ciclos a 95 ° C por 5s e 60 ° C por 30 s. Todas as reações foram realizadas com supermix iTaq universal Syber (Biorad). Os conjuntos de primers utilizados foram listados no quadro 2. A expressão relativa de cada gene de interesse foi mensurada pelo método $\Delta\Delta C_t$.

Quadro 2 - Primers para amostras de ratos utilizadas no qPCR

S100B	
Forward	TCCAGGGAGAGAGGGTGACAA
Reverse	CTTCCTGCTCTTTGATTCCTCC
IL-6	
Forward	GCCAGAGTCATTCAGAGCAATA
Reverse	GTTGGATGGTCTTGGTCCTTAG
GFAP	
Forward	AGTGGTATCGGTCCAAGTTTGC
Reverse	TGGCGGCGATAGTCATTAGC
GDNF (Fator neurotrófico derivado da glia)	
Forward	GGTCTACGGAGACCGGATCCGAGGTGC
Reverse	TCTCTGGAGCCAGGGTCAGATACATC
RAGE	
Forward	GGAAGGACTGAAGCTTGGAAGG
Reverse	TCCGATAGCTGGAAGGAGGAGT
GAPDH	
Forward	AGACAGCCGCATCTTCTTGT
Reverse	CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT

Fonte: Elaborado pela autora.

4.3.3.7 Avaliação da expressão proteica de S100B intracelular e fração nuclear de NFκBp65

A expressão da proteína S100B e NFκBp65 em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB foi avaliada por meio de Western Blotting.

CGEs (6×10^5 células/ poço) foram distribuídas em placas de 6 poços e incubadas com TcdA ou TcdB. Após a incubação, o sobrenadante foi removido e as células foram lisadas

usando tampão de lise RIPA (25 mmol / L Tris-HCl, pH 7,6; 150 mmol / L NaCl; 5 mmol / L EDTA; 1% NP40; 1% Triton X-100; % de desoxicolato de sio; 0,1% de SDS, contendo inibidor de protease livre de EDTA e de fosfatase), as amostras foram centrifugadas (17 min, 4°C, 13000 rpm) e o sobrenadante foi coletado.

Para a obtenção do extrato nuclear, um kit de extração nuclear (Thermo scientific) foi usado de acordo com o protocolo do fabricante. As concentrações de proteína foram determinadas por meio do ensaio com ácido bicinonínico de acordo com o protocolo do fabricante (Thermo Scientific).

30 µg de proteína (previamente preparadas com agente redutor da amostra e tampão de carga da proteína) foram desnaturadas a 95°C durante 5 min, separadas em gel BIS-Tris 4-12% e transferido para membranas de nitrocelulose por 2 h. Após bloqueio com 5% de leite desnatado a 4 ° C por 1 h, as membranas foram incubadas *overnight* com os anticorpos primários (anti- α -tubulina, Sigma, T8203, 1: 2000; anti-S100B, NOVUSBIO, NBP2-53188, 1: 400; anti-NF κ Bp65, Santa Cruz Biotechnology, sc-372, 1: 500,). No dia seguinte, as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários (burro anti-coelho conjugado Cy3, 711-165-152, 1: 1000; Burro anti-mouse Cy5, 715-175-150, 1: 1000, Jackson ImmunoResearch) por 1 h e 30 min. As membranas foram lavadas em solução salina tamponada com Tris (TBS) contendo Tween 20 a 0,05% (TSB-T) e o sinal de fluorescência foi detectado utilizando o sistema Typhoon (GE healthcare). A quantificação densitométrica das bandas foi realizada utilizando o software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA).

4.3.3.8 Imunofluorescência para NF κ Bp65 e pSTAT3

Para avaliar a ativação dos fatores de transcrição NF κ Bp65 e pSTAT3 (STAT3 fosforilada) em CGEs desafiadas com TcdA e TcdB, realizou-se imunofluorescência para essas proteínas. CGEs (4×10^4 células/ poço) foram plaqueadas em lâmina de vidro de poliestireno para cultura de células contendo 8 poços e tratadas com TcdA ou TcdB por 18h. Após a incubação com as toxinas do *C. difficile*, as células foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% diluído em PBS por 30 min em temperatura ambiente e permeabilizadas com solução de permeabilização (Triton X-100 a 0,5% e albumina sérica bovina a 3%, BSA, em PBS) durante 10 min a 4°C. Em seguida, realizou-se o bloqueio com soro de burro normal a 5% em PBS durante 30 min em temperatura ambiente e a incubação com os anticorpos primários para anti-NF κ Bp65 (Santa Cruz Biotechnology, sc-372), anti-RAGE (*R&D system*, AF1179) ou anti-pSTAT3 (*R&D system*, AF4607) *overnight* a 4°C. Após três lavagens com

tampão de lavagem (PBS com 0,01% de Tween20), as células foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com fluoróforo (*Jackson ImmunoResearch*, 711-165-152 ou *NovusBio*, NB7606) por 1h. Em seguida, as amostras foram lavadas e as lâminas foram montadas com o reagente antifade ProLong Gold contendo DAPI.

As amostras foram visualizadas por microscopia de fluorescência (Zeiss). Para cada condição experimental foram contadas 100 células e a porcentagem de células (%) com imunomarcção nuclear positiva para NFkBp65 ou pSTAT3 foi mensurada.

4.4 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: Teste t de Student para comparar dois grupos; teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni; Two-way ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni; e teste de correlação de Spearman.

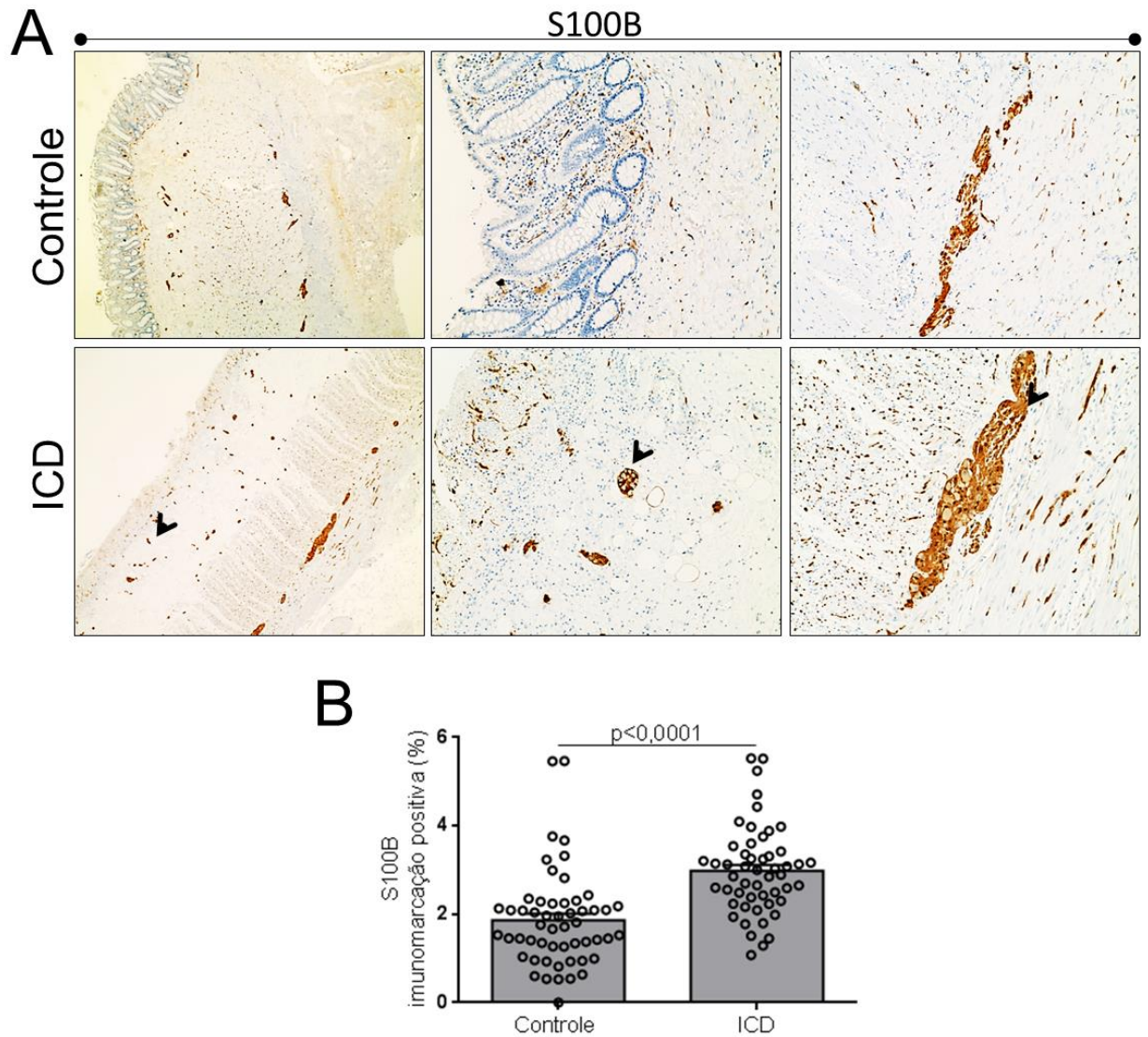
O nível de significância adotado foi de 0,05 ($\alpha = 5\%$) e níveis descritivos (p) inferiores a esse valor foram considerados significantes.

5 RESULTADOS

5.1 Alterações da expressão de S100B em biopsias colônicas de pacientes com ICD

Conforme apresentado na figura 23A, ICD aumenta os níveis de S100B no plexo mucoso, submucoso e mioentérico do cólon de humanos comparado às amostras colônicas de pacientes saudáveis (grupo controle). Ao mensurar a imunomarcção de S100B positiva nessas amostras, observou-se que ICD aumentou ($p < 0,0001$) o percentual de imunomarcção positiva para S100B comparado ao grupo controle (figura 23B).

Figura 23 - ICD aumenta a imunomarcção de S100B no cólon de pacientes



(A) Os painéis representam imagens de imunohistoquímica de S100B em biopsias colônicas de pacientes com ICD (Infecção por *C. difficile*) e amostras de cólon humano normal (controle). Observa-se aumento da imunomarcção positiva para S100B no plexo mucoso (painel à esquerda), submucoso (painel central) e plexo mioentérico (painel à direita). (B) O gráfico representa a média \pm EPM da porcentagem da área imunopositiva para S100B em cólon de humanos normal (controle) e com ICD em relação à área total.

5.2 Alterações de fatores gliais em modelo experimental de ICD e ileíte induzida pela TcdA

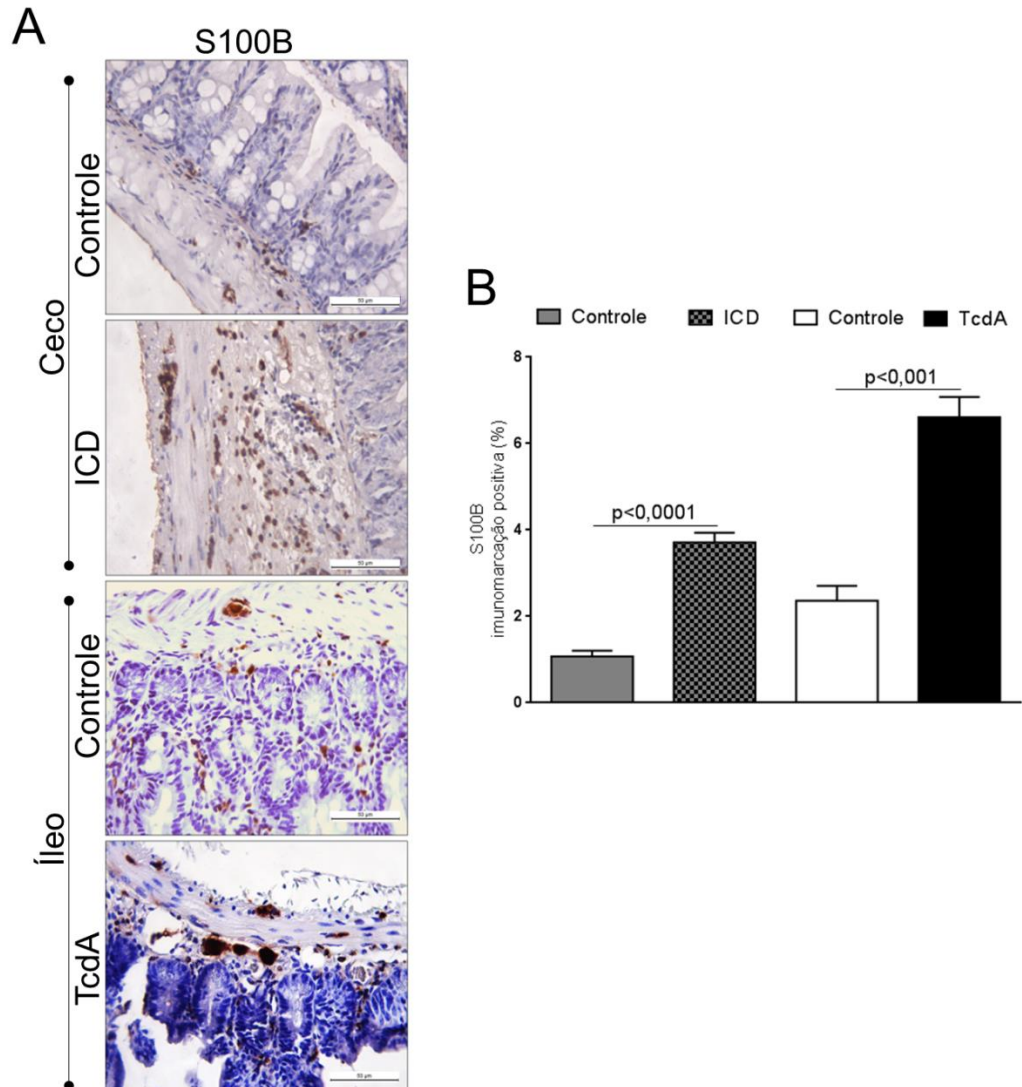
5.2.1 Alterações da expressão de S100B no intestino de camundongos submetidos ao modelo experimental de ICD e ileíte induzida pela TcdA

Dado que no presente estudo foi evidenciado que humanos com ICD apresentam aumento da imunomarcção para S100B no cólon, investigamos se alteração similar ocorreria no ceco e íleo de camundongos submetidos à ICD experimental e à ileíte induzida por TcdA, respectivamente.

Em condições normais, conforme representado pelo grupo controle, o ceco e o íleo de camundongos apresentam células imunopositivas para S100B no plexo mucoso, submucoso e mioentérico. Ao passo que essa imunomarcção é acentuadamente aumentada no ceco e íleo de camundongos submetidos à ICD e à ileíte induzida por TcdA em todos os plexos (figura 24A).

Em consonância com esses dados qualitativos, a quantificação da área imunomarcada para S100B mostrou que ICD e TcdA aumentam de forma estatisticamente significativa a imunomarcção positiva para S100B no ceco e íleo comparado aos respectivos grupos controles (figura 24B).

Figura 24 – ICD e TcdA aumentam a imunomarcção para S100B no ceco e íleo de camundongos respectivamente



(A) Os painéis representam imagens de imunohistoquímica para S100B no ceco e íleo de camundongos submetidos à ICD (Infecção por *C. difficile*) e ileíte induzida por TcdA, respectivamente. Amostras normais de ceco e íleo para cada modelo experimental são representadas pelo grupo controle (50μm). (B) O gráfico representa a média ± EPM da porcentagem da área imunopositiva para S100B no ceco e íleo de camundongos submetidos à ICD e à ileíte induzida por TcdA, respectivamente, em relação à área total. Teste t de Student.

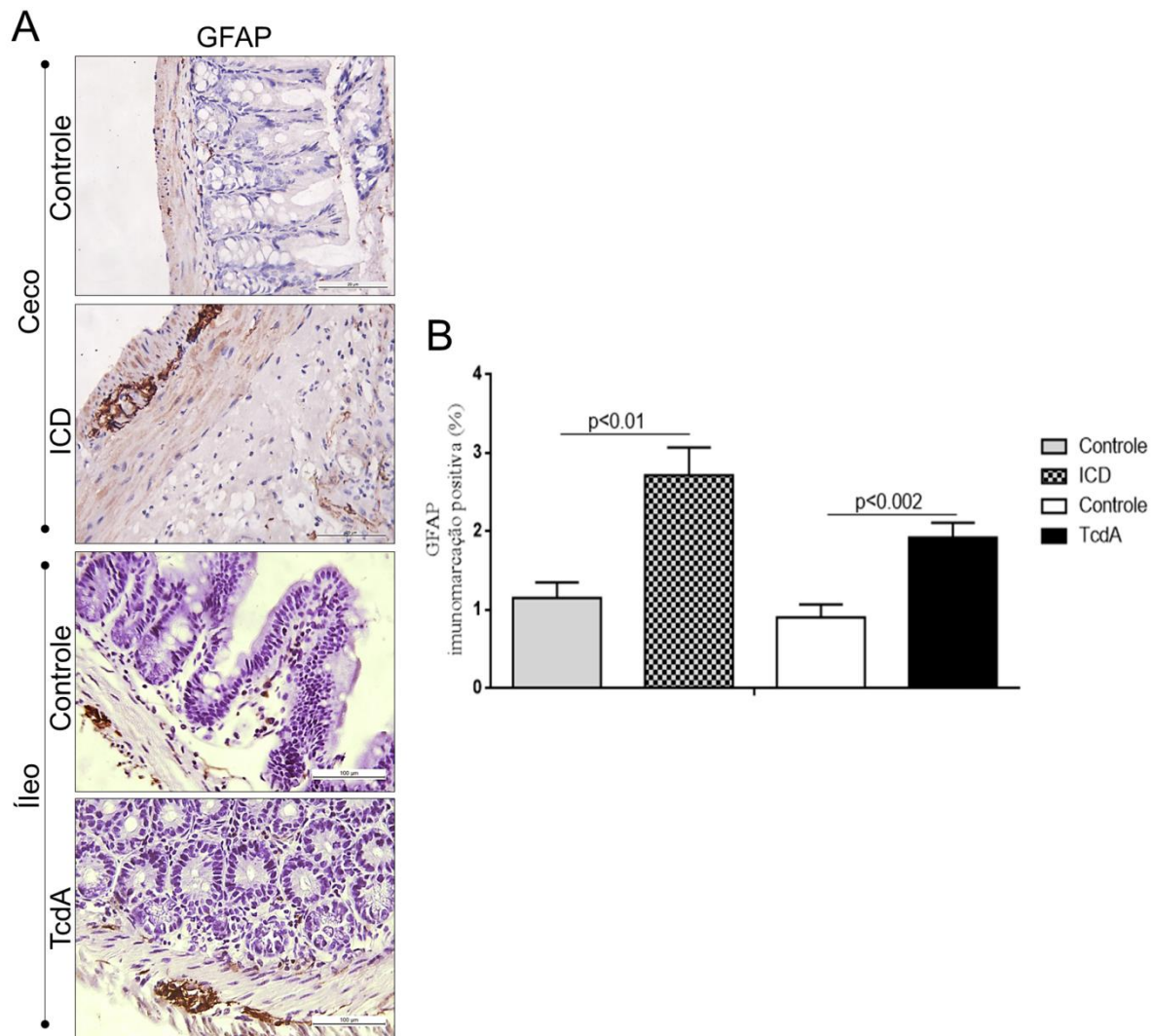
5.2.2 Alterações da expressão de GFAP no intestino de camundongos submetidos ao modelo experimental de ICD e ileíte induzida pela TcdA

Dado que em estudo prévio (VON BOYER *et al.*, 2012) foi evidenciado que humanos com ICD apresentaram aumentada expressão de GFAP no cólon, investigamos se alteração similar ocorreria no ceco e íleo de camundongos submetidos à ICD experimental e à ileíte induzida por TcdA respectivamente.

Em condições normais, conforme representado pelo grupo controle, o ceco e o íleo de camundongos apresentam células imunopositivas para GFAP no plexo mucoso, submucoso e mioentérico. Ao passo que essa imunomarcção é aumentada no ceco e íleo de camundongos submetidos à ICD e à ileíte induzida por TcdA, principalmente no plexo mucoso e mioentérico (figura 25A).

Em consonância com esses dados qualitativos, a quantificação da área imunomarcada para GFAP mostrou que ICD e TcdA aumentam de forma estatisticamente significativa a imunomarcção positiva para GFAP no ceco e íleo comparado aos respectivos grupos controle (figura 25B).

Figura 25 – ICD e TcdA aumentam a imunomarcção para GFAP no ceco e íleo de camundongos respectivamente

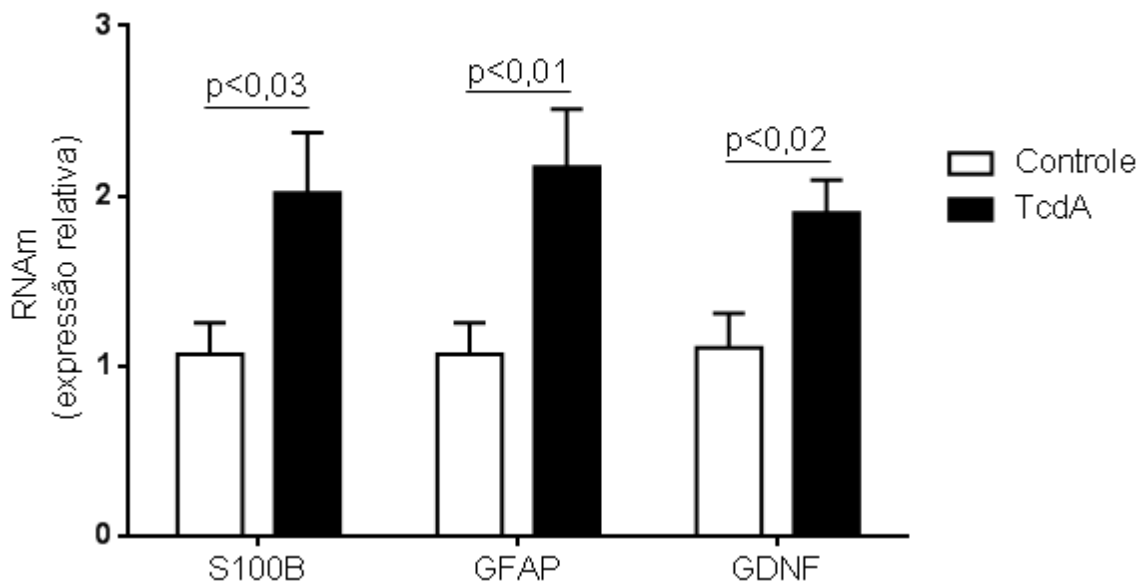


(A) Os painéis representam imagens de imunohistoquímica para GFAP no ceco e íleo de camundongos submetidos à ICD (Infecção por *C. difficile*) e ileíte induzida por TcdA, respectivamente. Amostras normais de ceco e íleo para cada modelo experimental são representadas pelo grupo controle (50 μ m). (B) O gráfico representa a média \pm EPM da porcentagem da área imunopositiva para GFAP no ceco e íleo de camundongos submetidos à ICD e à ileíte induzida por TcdA, respectivamente, em relação à área total. Teste t de Student.

5.2.3 Alterações da expressão gênica de fatores gliais em modelo de ileíte induzida pela TcdA

Conforme apresentado na figura 26, TcdA elevou de forma estatisticamente significativa a expressão gênica de S100B, GFAP e GDNF no íleo de camundongos submetidos à ileíte experimental induzida por TcdA comparado ao grupo controle.

Figura 26 – TcdA eleva a expressão gênica dos fatores gliais S100B, GFAP e GDNF no íleo de camundongos



A expressão relativa do RNAm de S100B, GFAP e GDNF no íleo de camundongos submetidos à ileíte experimental induzida por TcdA foi avaliada por qPCR. Barras representam a média \pm EPM (n=5). Teste t de Student.

5.3 Efeito da TcdA e TcdB em linhagem de CGEs

Para investigar o efeito direto de TcdA e TcdB em CGEs, incluindo a expressão de S100B e outros fatores gliais, foi utilizada uma linhagem de CGEs imortalizadas provenientes do jejuno de ratos.

5.3.1 Alterações da viabilidade e morfologia de CGEs induzidas por TcdA e TcdB

Sabe-se que TcdA e TcdB induzem redução da viabilidade e alterações da morfologia, como arredondamento celular, em diversas células. Com o objetivo de determinar a melhor concentração de TcdA e TcdB para avaliar os demais parâmetros deste estudo, avaliou-se a viabilidade e a morfologia de CGEs expostas a TcdA e a TcdB em diferentes tempos de incubação.

Todas as concentrações de TcdA (10, 50 e 100ng/mL) reduziram ($p < 0,0001$) a viabilidade de CGEs a partir de 18h de incubação comparado ao grupo controle. No entanto, somente as doses de 10 e 50 ng/mL de TcdA mostraram-se viáveis para investigar alterações em CGEs até 24h por demonstrarem diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo DMSO (grupo controle de morte) (figura 27A).

Diferente dos resultados obtidos com TcdA, todas as concentrações de TcdB ocasionaram redução ($p < 0,0001$) da viabilidade de CGEs a partir de 12h de incubação comparado ao grupo controle. Todas as concentrações de TcdB apresentaram aumentada viabilidade celular comparado ao grupo DMSO até 24h de exposição, mostrando serem viáveis para mais análises até 24h de exposição (figura 27B).

Ao avaliar a morfologia de CGEs, observou-se que TcdA (50 e 100 ng/mL) induziu ($p < 0,0001$) 100% de arredondamento celular a partir de 6h de incubação comparado ao grupo controle. Enquanto que a concentração de 10 ng/mL de TcdA induziu apenas em torno de 25% de arredondamento celular (figura 27C).

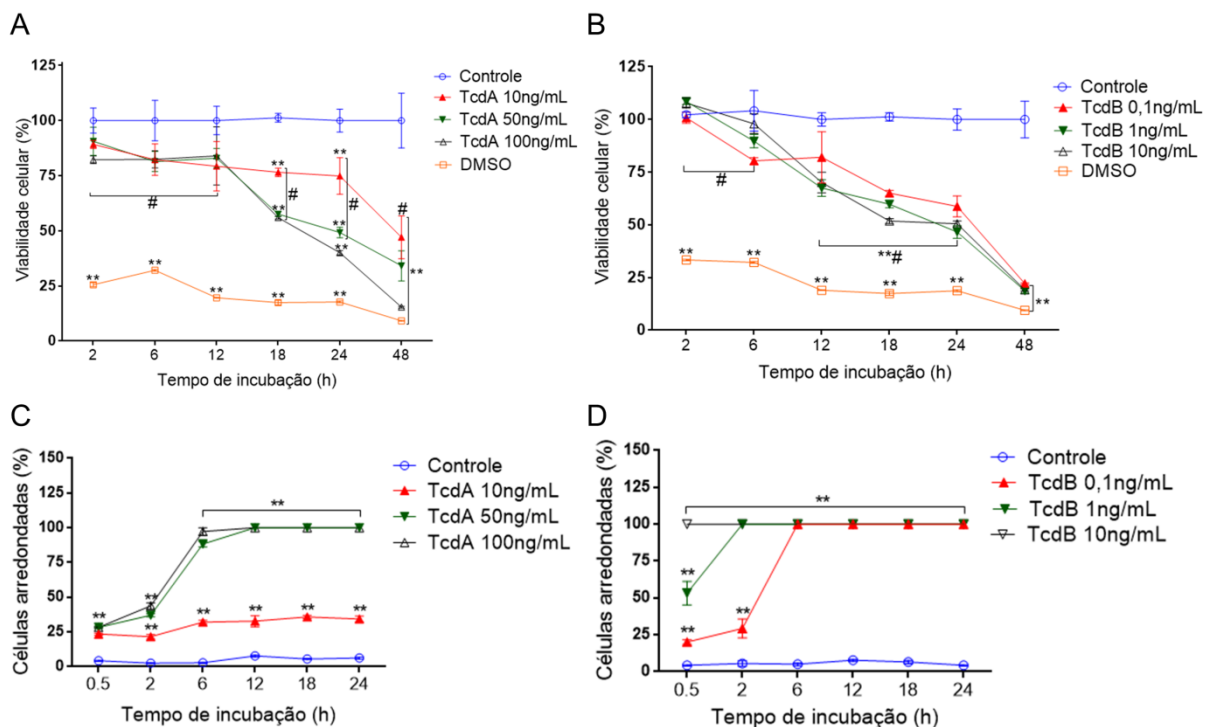
Enquanto que todas as concentrações de TcdB (0,1, 1 e 10 ng/mL) ocasionaram ($p < 0,0001$) 100% de arredondamento de CGEs em 6h de incubação comparado ao grupo controle, sendo que a dose de 1 ng/mL e 10ng/mL apresentou similar efeito em apenas 2h e 30 min de incubação respectivamente (figura 27D).

De acordo com a figura 28 e 29, as CGEs apresentam forma estrelada em condições normais, conforme representado pelo grupo controle. Ao expor as CGEs à TcdA (10, 50 e 100

ng/mL), observa-se que CGEs tornam-se arredondadas a partir de 2h de incubação (figura 28). Ao passo que as células glias expostas à TcdB (0,1, 1 e 10 ng/mL) mostraram-se arredondadas em 30 min de incubação (figura 29).

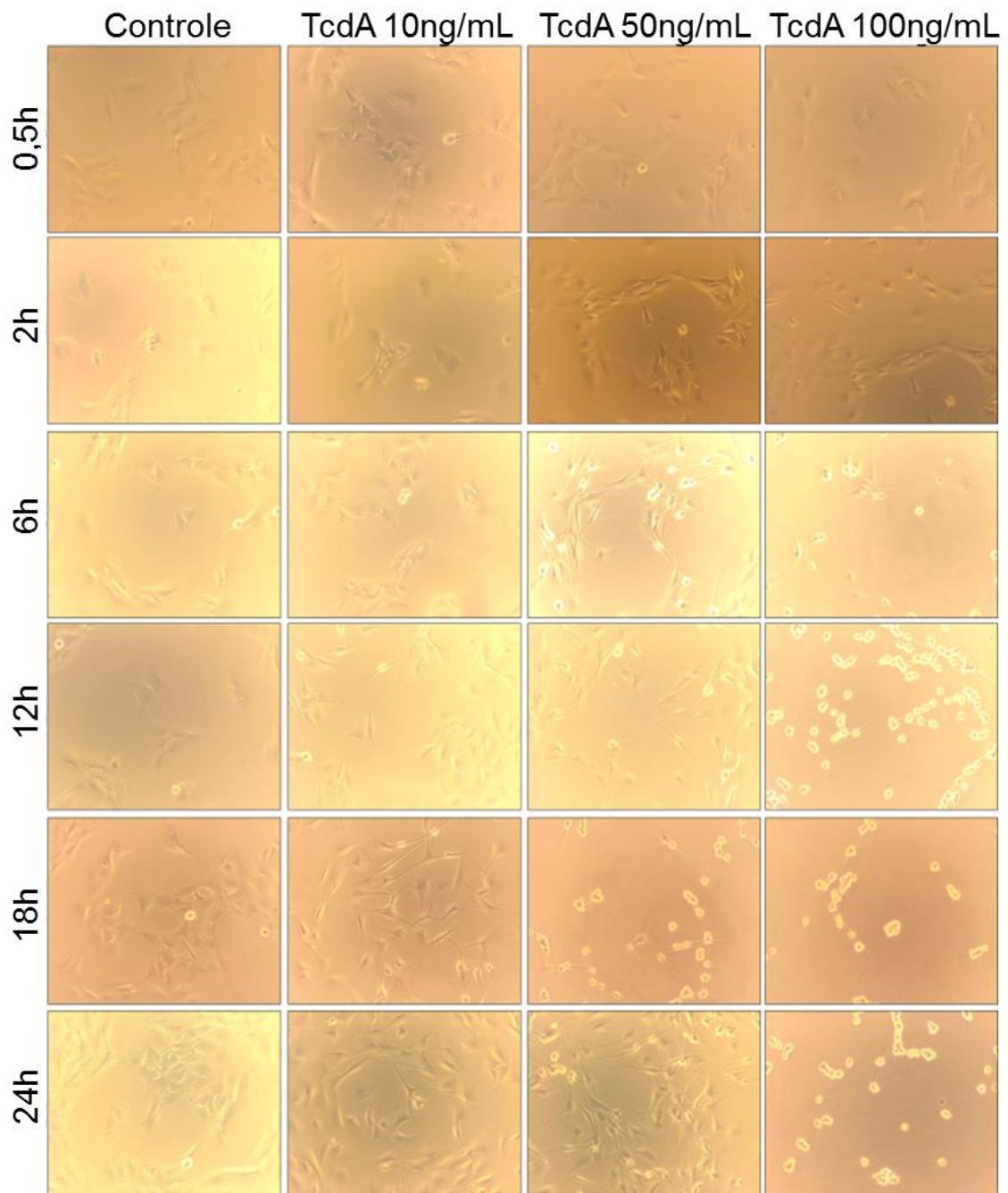
Baseado nos resultados apresentados, a concentração de 50 ng/mL de TcdA e 1 ng/mL de TcdB foram definidas para a análise dos demais parâmetros do presente estudo.

Figura 27 – TcdA e TcdB reduzem a viabilidade e alteram a morfologia de CGEs



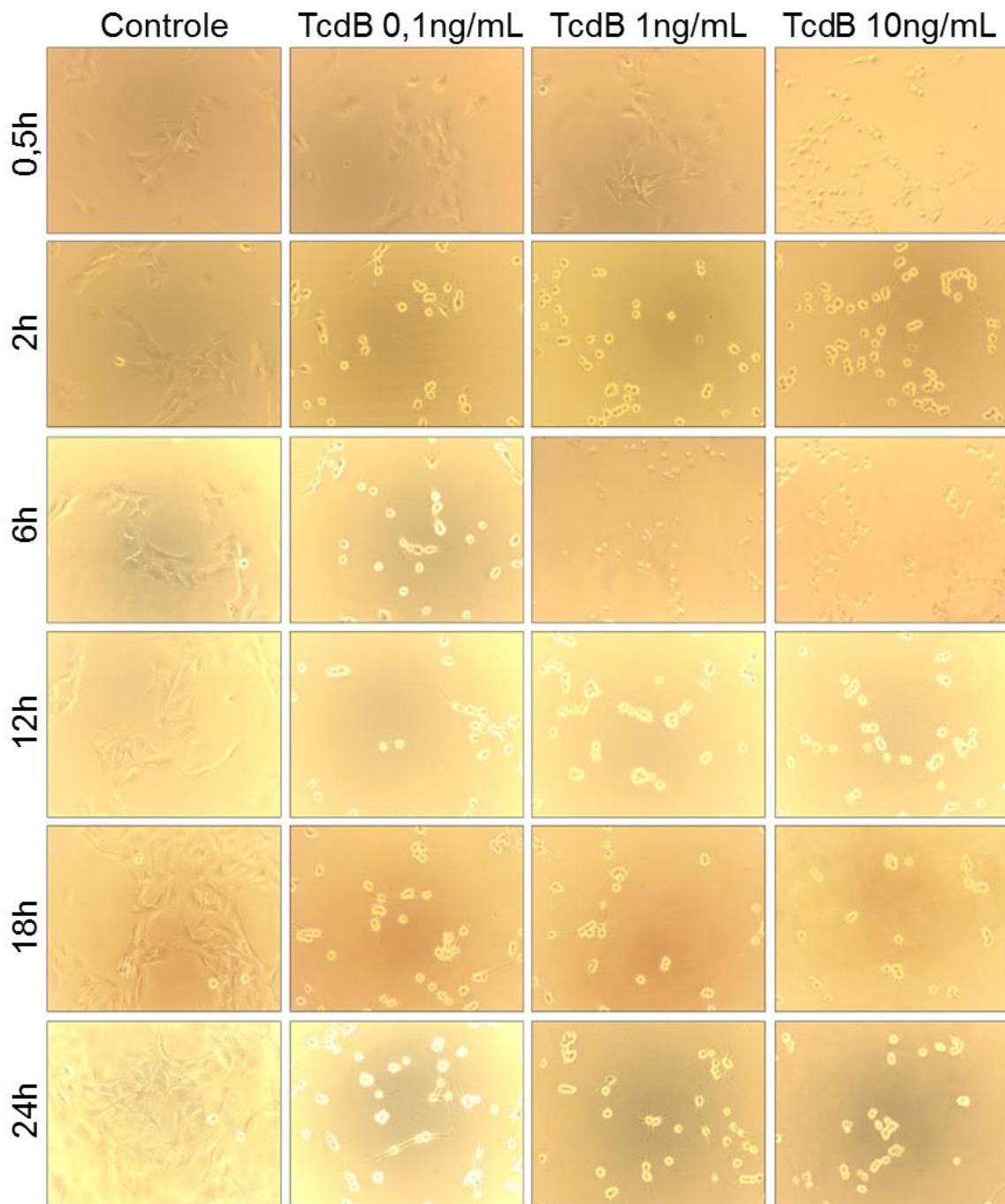
(A) Efeito de TcdA (10, 50 e 100 ng/mL) e (B) TcdB (0,1, 1 e 10 ng/mL) na viabilidade de CGEs. Viabilidade celular foi determinada por meio do ensaio de MTT. Os dados são apresentados como média \pm EPM (n=6). **p<0,0001 versus grupo controle e #p<0,0001 versus grupo DMSO. (C-D) Gráficos representam a média \pm EPM (n=6) da porcentagem (%) de células arredondadas. 100 células foram contadas para cada condição experimental. Para análise estatística foi utilizado o teste Two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde **p<0,0001 versus grupo controle.

Figura 28- Efeito da TcdA na morfologia de CGEs



Painéis representativos da morfologia de CGEs após incubação com TcdA (10, 50 e 100 ng/mL) ou apenas meio de cultivo suplementado (Controle) de 30 min a 24h. As imagens foram capturadas usando microscópio de luz invertido.

Figura 29- Efeito da TcdB na morfologia de CGEs



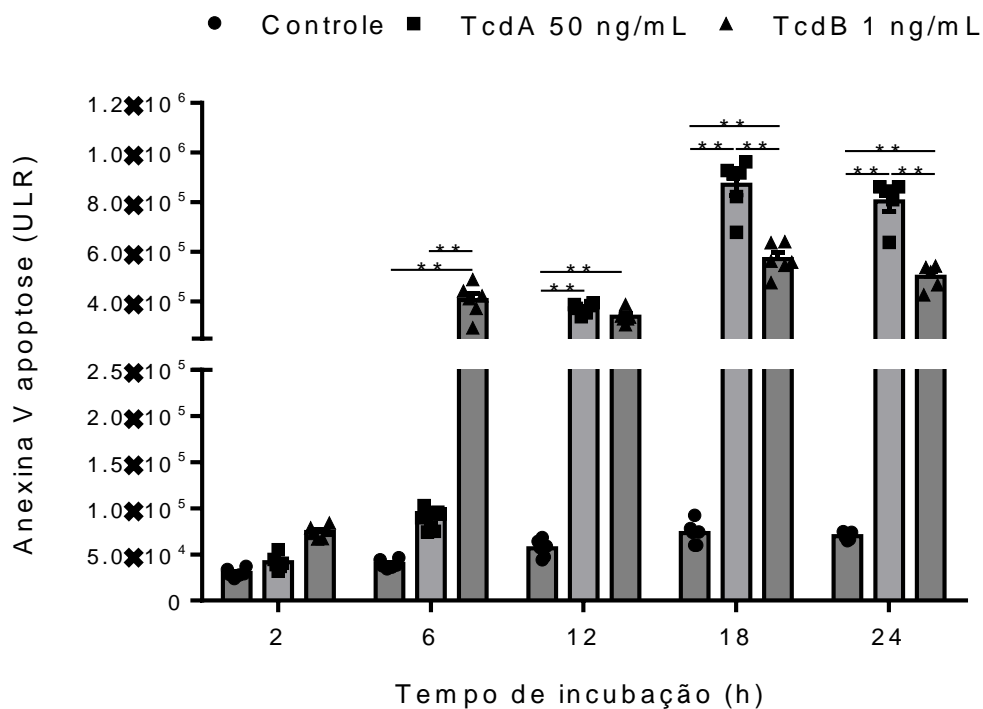
Painéis representativos da morfologia de CGEs após incubação com TcdB (0,1, 1 e 10 ng/mL) ou apenas meio de cultivo suplementado (Controle) de 30 min a 24h. As imagens foram capturadas usando microscópio de luz invertido.

5.3.2 Efeito das TcdA e TcdB na apoptose de CGEs

As toxinas do *C. difficile* induzem apoptose em vários tipos de células (D'AURIA *et al.* 2015; SANTOS *et al.* 2013; BRITO *et al.*, 2002b). Estudos realizados recentemente mostraram que a TcdB induz apoptose em CGEs (FETTUCCIARI *et al.*, 2017; MACCHIONI *et al.*, 2017), no entanto os efeitos de TcdA na apoptose de CGEs não foram demonstrados até o presente momento. Dessa forma, avaliou-se a apoptose induzida pela TcdA e TcdB por meio de um ensaio em tempo real Glo-anexina V apoptose.

TcdB induziu ($p < 0,0001$) apoptose em CGEs a partir de 6h de incubação, enquanto TcdA induziu ($p < 0,0001$) efeito similar a partir de 12h. No entanto, a indução de apoptose em CGEs pela TcdA (50 ng/mL) foi maior ($p < 0,0001$) do que o de TcdB (1 ng/mL) em 18h de incubação (figura 30).

Figura 30 – TcdA e TcdB induzem apoptose em CGEs



Efeito de TcdA (50 ng/mL) e TcdB (1 ng/mL) na apoptose de CGEs. Apoptose foi avaliada por meio do ensaio em tempo real Glo-anexina V apoptose. Os dados são apresentados como média \pm EPM (n=5). A unidade de luminescência relativa (ULR) é proporcional à expressão de anexina V. Para análise estatística foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde $**p < 0,0001$.

5.3.3 Efeito de TcdA e TcdB na secreção de S100B e expressão de fatores gliais em CGEs

S100B é um importante fator constitutivo glial que no intestino é produzido principalmente por CGEs e exibe efeito dual em neurônios, podendo estimular a sobrevivência ou morte de forma dose dependente (COSTA *et al.*, 2019), além de funcionar como uma citocina pró-inflamatória durante a resposta inflamatória. Dado que no presente estudo foi encontrado aumento da imunomarcagem para S100B no cólon de humanos e no ceco de camundongos com ICD, bem como no íleo de camundongos expostos somente à TcdA, investigou-se se TcdA e TcdB estimulariam a expressão e secreção de S100B em CGEs.

TcdA (50 e 100 ng/mL) e TcdB (10 ng/mL) aumentaram ($p < 0,0001$) a liberação de S100B por CGEs em 12h de incubação, sendo que todas as concentrações de TcdA (10, 50 e 100 ng/mL) e TcdB (0,1, 1 e 10 ng/mL) induziram efeito ainda maior a partir de 18h de exposição (figura 31A).

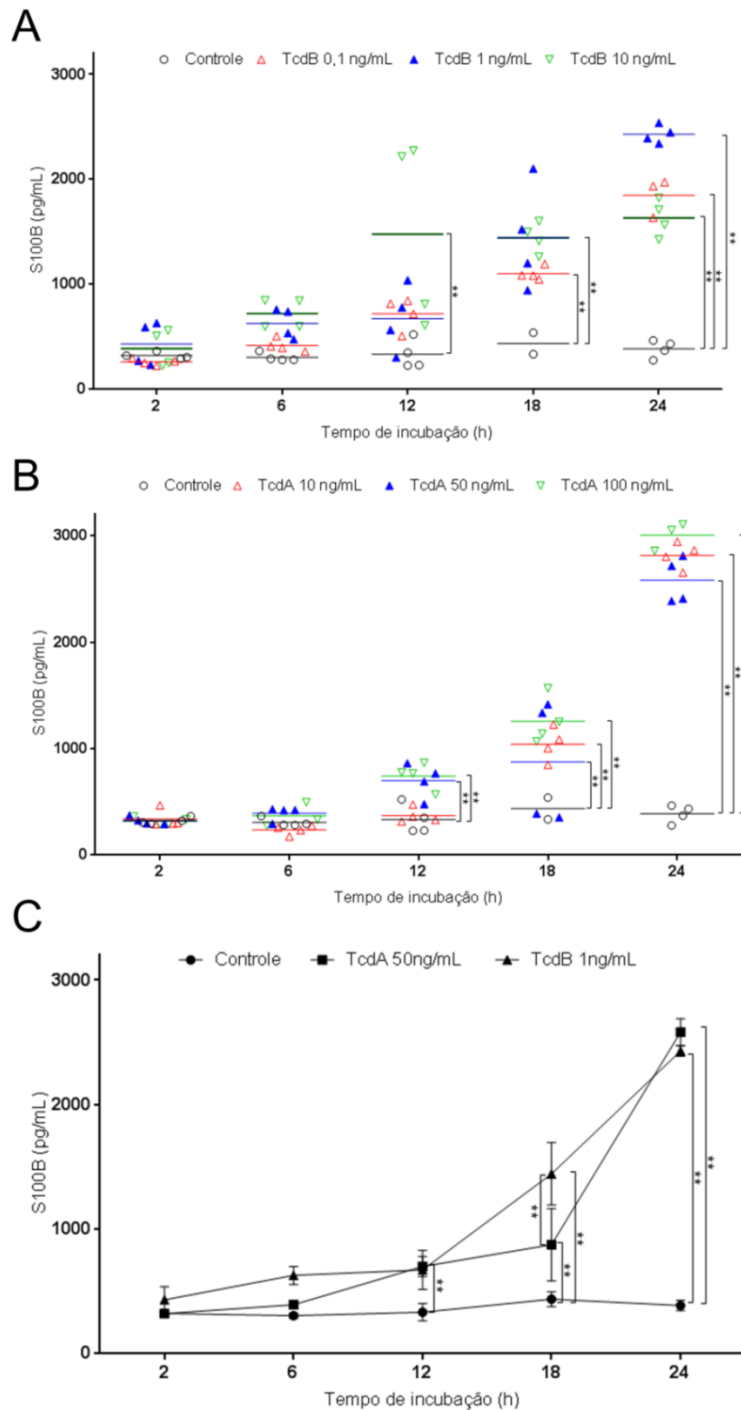
Para mais investigações, avaliamos a expressão de S100B por qPCR. TcdA (50 e 100 ng/mL) e TcdB (0,1, 1 e 10 ng/mL) suprarregularam a expressão de S100B em CGEs a partir de 12h de incubação comparada ao grupo controle ($p < 0,0001$, figura 32A-B).

Apesar de ter sido encontrado aumento da liberação e da expressão do RNAm de S100B em CGEs expostas à TcdA (50 ng/mL) e TcdB (1 ng/mL), apenas TcdB aumentou os níveis de S100B intracelular em 12h de incubação comparado ao grupo controle ($p < 0,001$, figura 28). No entanto, os níveis de S100B intracelular em CGEs desafiadas com TcdB se mantiveram similar aos do grupo controle em 18h e 24h de exposição (figura 33).

Esses dados em conjunto sugerem que o aumento de S100B, que é induzido por TcdA e TcdB em CGEs, no meio extracelular ocorre em grande parte devido à síntese de novo S100B em vez da secreção do que se encontra armazenado no espaço intracelular.

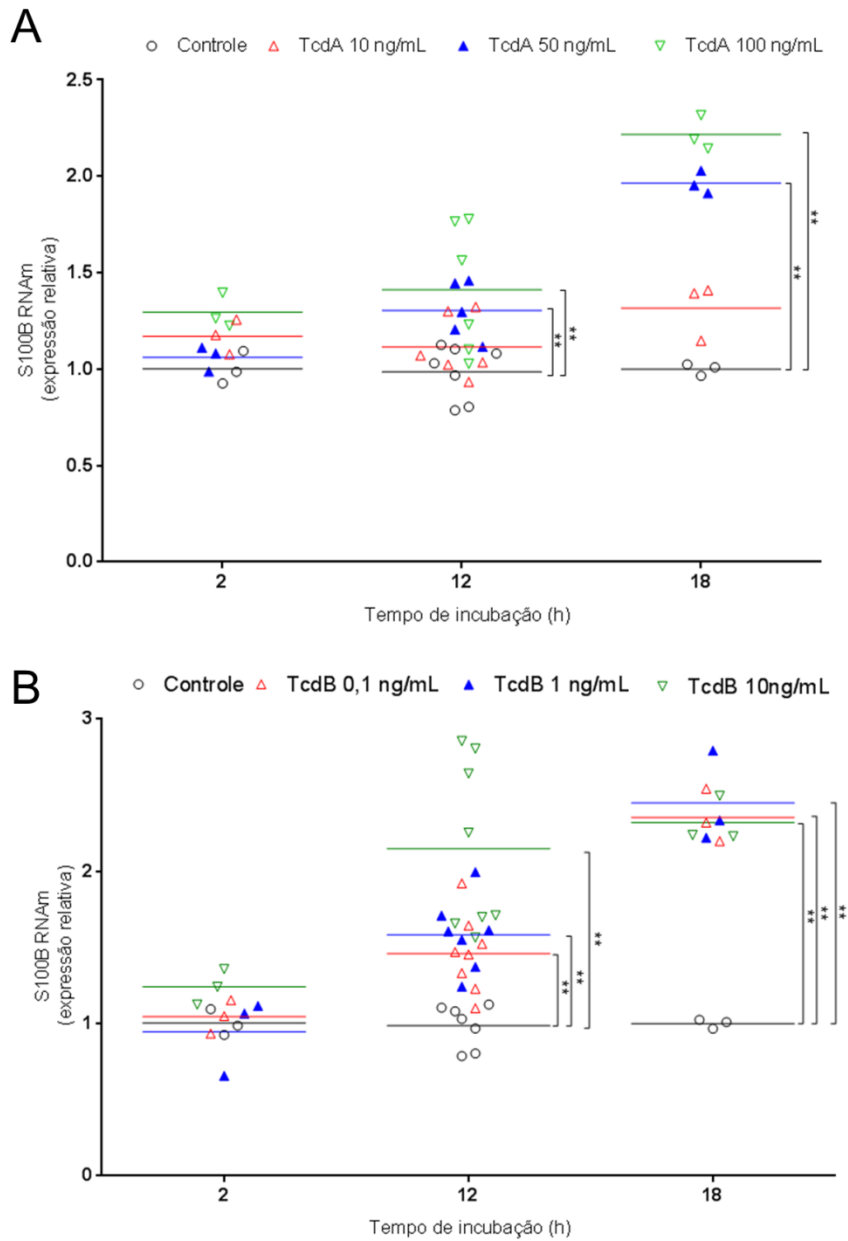
Em estado de gliose reativa, CGEs podem superexpressar outros fatores gliais como GDNF e GFAP. TcdA (100 ng/mL) e TcdB (0,1, 1 e 10 ng/mL) aumentaram ($p < 0,0001$) a expressão gênica de GDNF em 18h de incubação comparado ao grupo controle (figura 34A). Além disso, um aumento da expressão gênica de GFAP induzida por TcdA (50 e 100 ng/mL) e TcdB (0,1 ng/mL) foi evidenciado em 18h de incubação, precedido por sua redução acentuada em 12h de incubação comparado ao grupo controle ($p < 0,0001$, figura 34B).

Figura 31 – TcdA e TcdB induzem secreção de S100B em CGEs



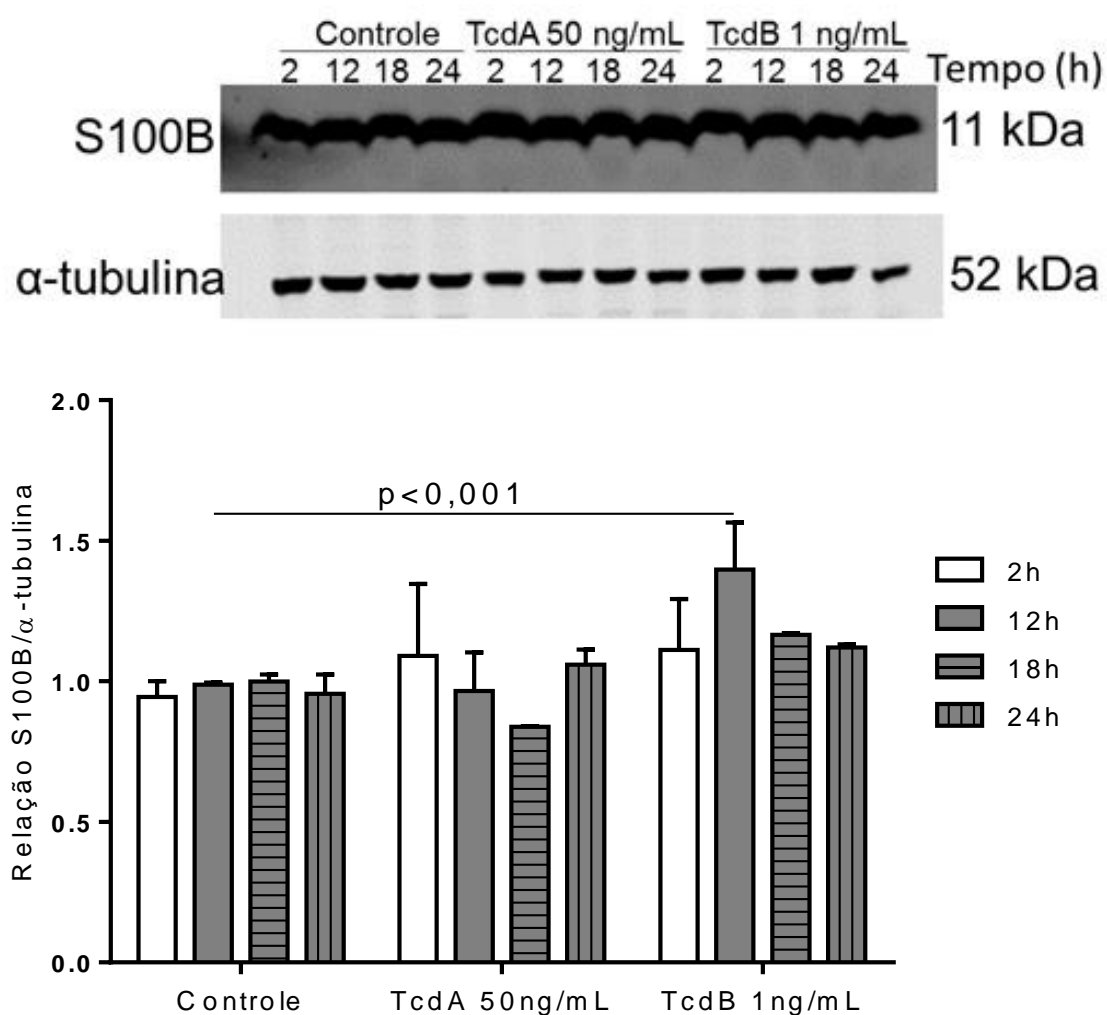
(A) Efeito das TcdA (10, 50 e 100 ng/mL) e (B) TcdB (0,1, 1 e 10 ng/mL) na secreção de S100B por CGEs. Os níveis de S100B foram mensurados a partir sobrenadante de CGEs após exposição à TcdA e TcdB, sendo mensurado por meio do ensaio de ELISA. (C) comparação entre a secreção de S100B por CGEs induzida por TcdA (50 ng/mL) e TcdB (1ng/mL). Os dados são apresentados como média \pm EPM dos níveis de S100B expressos em pg/mL. Para análise estatística foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde $**p < 0,0001$.

Figura 32 – TcdA e TcdB suprarregulam S100B em CGEs



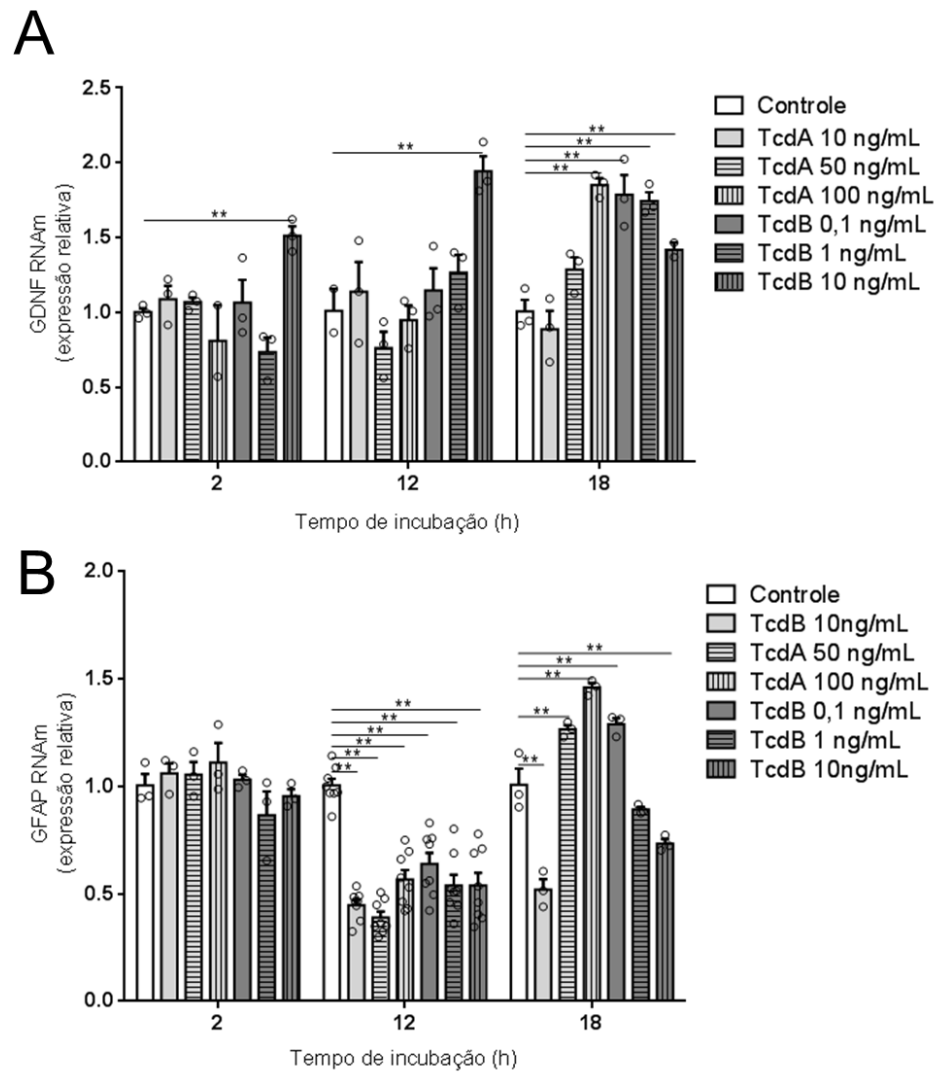
(A) Efeito das TcdA (10, 50 e 100 ng/mL) e TcdB (0,1, 1 e 10 ng/mL) na expressão gênica de S100B em CGEs. A expressão gênica de S100B por essas células foi avaliada por qPCR. Os dados são apresentados como média \pm EPM da expressão gênica relativa de S100B. Para análise estatística foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde $**p < 0,0001$.

Figura 33 – Efeito das TcdA e TcdB nos níveis de S100B intracelular em CGEs



A expressão proteica de S100B em CGEs expostas à TcdA (50 ng/mL) e TcdB (1 ng/mL) foi avaliada por Western Blotting. Os dados são apresentados como média \pm EPM da expressão proteica de S100B que resultou da densidade de S100B e de α -tubulina. Para análise estatística foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde o valor do nível de significância (p) encontra-se representado no gráfico.

Figura 34- Efeito das TcdA e TcdB na expressão de GDNF e GFAP em CGEs



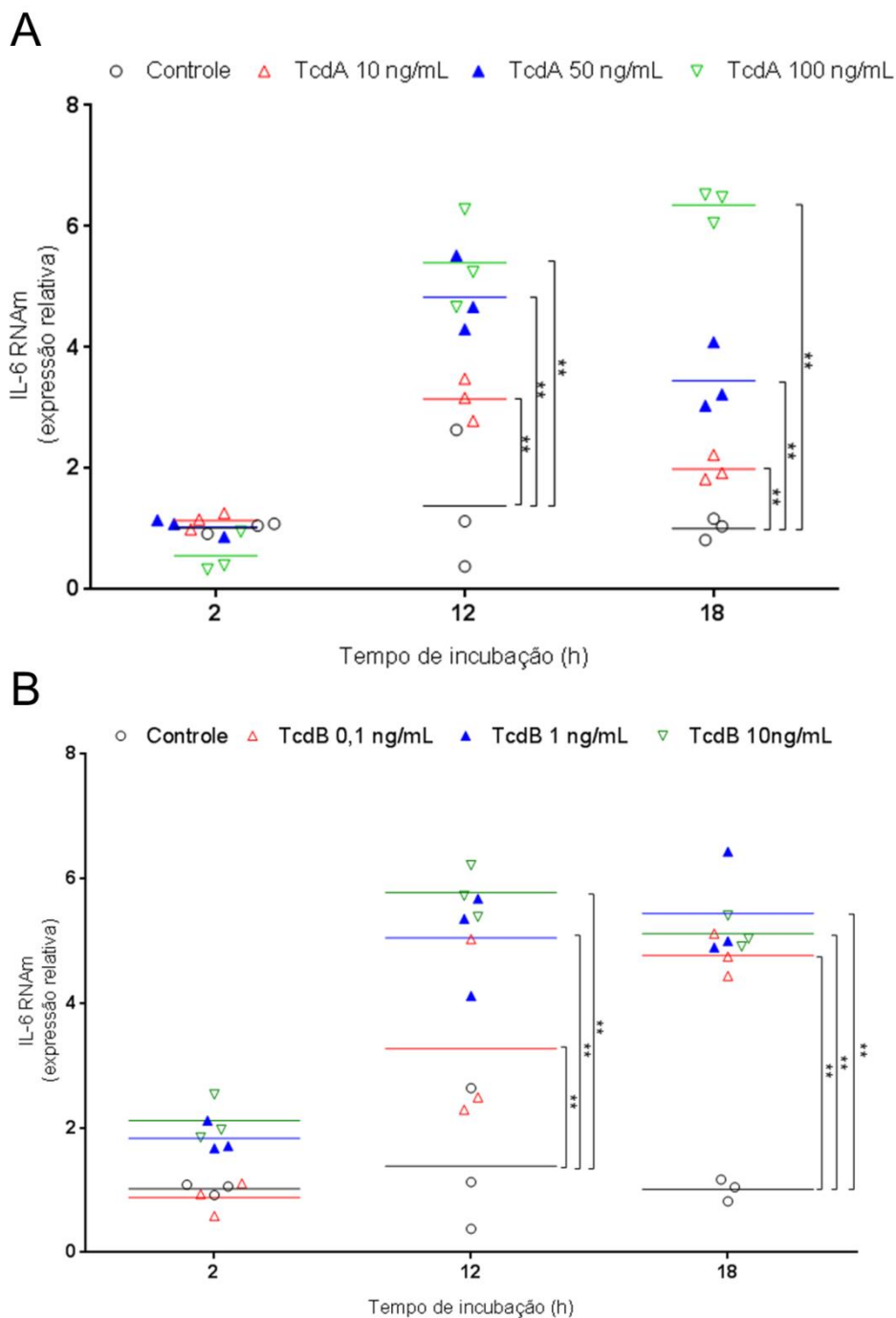
(A) Efeito das TcdA (10, 50 e 100 ng/mL) e TcdB (0,1, 1 e 10 ng/mL) na expressão gênica de GDNF e GFAP em CGEs. A expressão gênica de GDNF e GFAP por essas células foi avaliada por qPCR. Os dados são apresentados como média \pm EPM da expressão gênica relativa de GDNF e GFAP. Para análise estatística foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde $**p < 0,0001$.

5.3.4 Efeito das TcdA e TcdB na expressão de IL-6 e outras citocinas pró-inflamatórias em CGEs

Dado que a maioria dos mediadores inflamatórios tem demonstrado potencializar os efeitos das toxinas do *C. difficile* em vários tipos de células, tais como células epiteliais, neutrófilos, mastócitos, macrófagos e linfócitos T (COWARDIN *et al.*, 2015; NG *et al.*, 2010; MEYER *et al.*, 2007; NA *et al.*, 2005), investigou-se se TcdA e TcdB poderiam alterar a resposta inflamatória das CGEs mensurando as citocinas secretadas. A partir do ensaio de Bioplex, com nível de detecção mínimo de 10 pg/mL, não foi possível detectar IL-6, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-10, GM-CSF, INF- γ e TNF- α no sobrenadante de CGEs expostas à TcdA e TcdB de 2h a 24h de exposição. O mesmo achado foi evidenciado em ensaio de ELISA para IL-1 β e IL-6 realizados individualmente.

No entanto, TcdA e TcdB aumentaram de forma expressiva a expressão gênica de IL-6 a partir de 12h de incubação comparado ao grupo controle ($p < 0,0001$, figura 35A-B).

Figura 35 – TcdA e TcdB suprarregulam IL-6 em CGEs

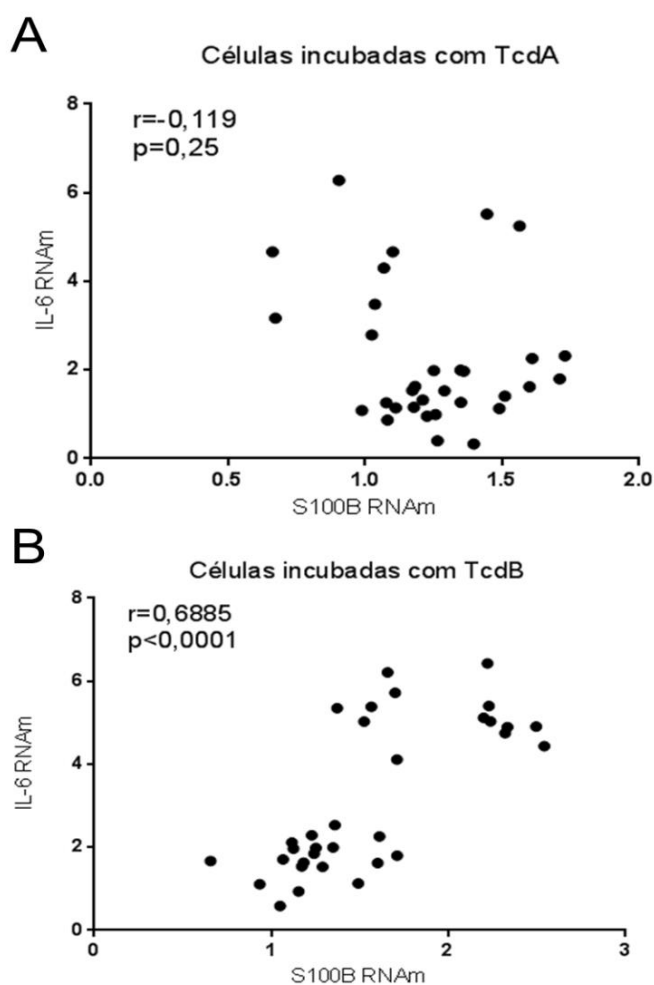


(A) Efeito TcdA (10, 50 e 100 ng/mL) e TcdB (0,1, 1 e 10 ng/mL) na expressão gênica de IL-6 em CGEs. A expressão gênica de IL-6 por essas células foi avaliada por qPCR. Os dados são apresentados como média \pm EPM da expressão gênica relativa de IL-6. Para análise estatística foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde $**p < 0,0001$.

5.3.5 Correlação entre a expressão de IL-6 e S100B induzida por TcdA e TcdB em CGEs

Considerando que TcdA e TcdB estimularam a expressão gênica de IL-6 e S100B, verificou-se se havia alguma correlação entre a expressão desses dois mediadores. Com base nos dados apresentados na figura 31, uma correlação positiva entre a expressão gênica de S100B e IL-6 induzidas por TcdB ($p < 0,0001$, figura 36B), mas não por TcdA (figura 36A), em CGEs foi evidenciada.

Figura 36 – Correlação entre a expressão gênica de S100B e IL-6 induzida por TcdA e TcdB em CGEs



Análise da correlação da expressão gênica de S100B com a de IL-6 induzidos por (A) TcdA e (B) TcdB em CGEs, que inclui os tempos de incubação de 2, 12 e 18h. Para análise estatística foi utilizado o teste de correlação de Spearman, sendo o seu coeficiente de correlação (r) apresentado nos gráficos juntamente com o nível de significância (p).

5.3.6 Efeito das TcdA e TcdB na ativação de NFκB em CGEs

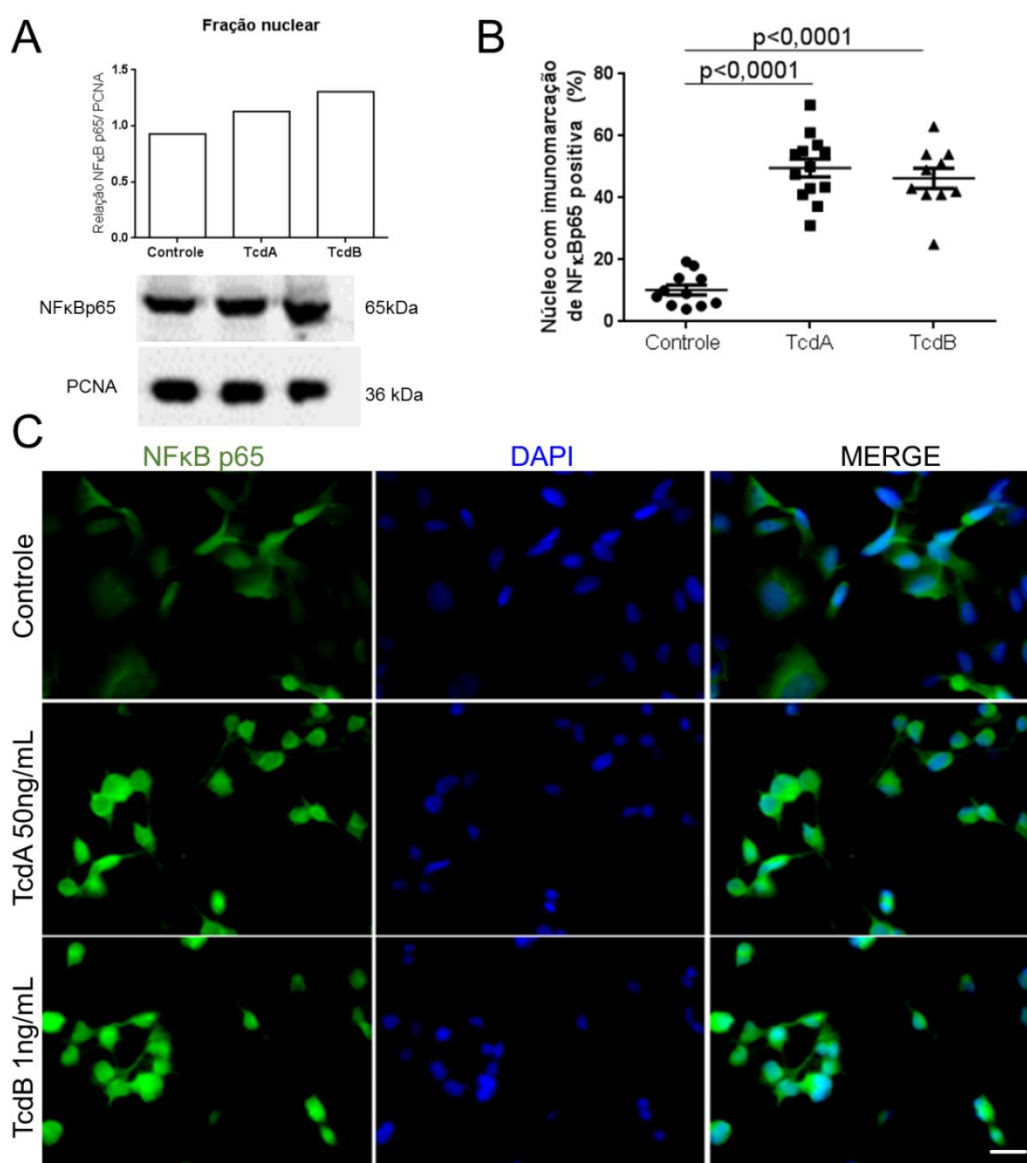
Conforme estudo prévio, a ativação do fator de transcrição NFκB resulta na transcrição de mediadores pró-inflamatórios, como IL-6 (LIU *et al.*, 2017). Devido a isso, investigou-se se TcdA e TcdB poderiam ativar NFκB em CGEs.

Conforme apresentado na figura 37A, observa-se um aumento da fração nuclear de NFκBp65 em CGEs expostas à TcdA e TcdB comparado ao grupo controle.

Ao realizar a contagem de CGEs com núcleo positivo para NFκBp65, observou-se que TcdA e TcdB aumentaram expressivamente ($p < 0,0001$) o número de células com núcleo positivo para esse fator de transcrição comparado ao grupo controle (figura 37B). Notavelmente, esses achados podem ser visualizados na figura 37C, onde na ausência das toxinas apenas algumas CGEs apresentaram translocação de NFκB p65 para o núcleo. Enquanto que na presença de TcdA e TcdB se observou um aumento expressivo de células com translocação nuclear desse fator de transcrição.

Esses achados indicam que TcdA e TcdB ativam NFκB.

Figura 37- TcdA e TcdB aumentam a translocação nuclear de NFκBp65 em CGEs



(A) Análise da expressão de NFκBp65 por Western Blotting a partir da fração proteica nuclear de CGEs incubadas com TcdA (50 ng/mL) e TcdB (1ng/mL) por 18h. A análise quantitativa da densidade das bandas de NFκBp65 foi normalizada com PCNA (uma proteína controle). (B) Porcentagem de CGEs com imunomarcagem positiva para NFκBp65 no núcleo após 18h de incubação com TcdA e TcdB. Os dados são apresentados como média ± EPM da porcentagem de núcleos com imunomarcagem de NFκB positiva. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde o valor do nível de significância (p) encontra-se representado no gráfico. (C) Painéis representativos de imunomarcagem de CGEs, que foram incubadas com TcdA (50ng/mL), TcdB (1ng/mL) ou apenas meio de cultivo (grupo controle) por 18h, com NFκBp65 (verde/painéis à esquerda) realizada por meio de imunofluorescência. Os núcleos encontram-se marcados com DAPI (azul/painéis ao centro). A sobreposição das imagens (MERGE) encontra-se nos painéis a direita (50 μm).

5.3.7 Participação da sinalização S100B/RAGE na expressão gênica de S100B e IL-6, bem como na secreção de S100B, e apoptose induzidos por TcdA e TcdB em CGEs

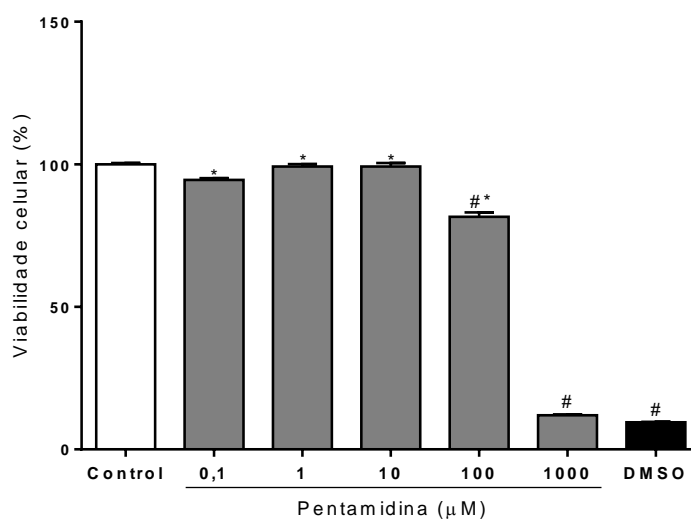
5.3.7.1 Efeito do inibidor de S100B na expressão de S100B e IL-6 induzidos por TcdA e TcdB em CGEs

Para investigar o papel da S100B na expressão gênica de S100B e IL-6 induzidas por TcdA e TcdB, CGEs foram pré-tratadas com pentamidina, um inibidor da S100B.

As doses de pentamidina foram baseadas no ensaio de viabilidade celular apresentado na figura 38. Conforme esse ensaio, as doses de 1 e 10 μ M não alteraram a viabilidade de CGEs em 18h de incubação.

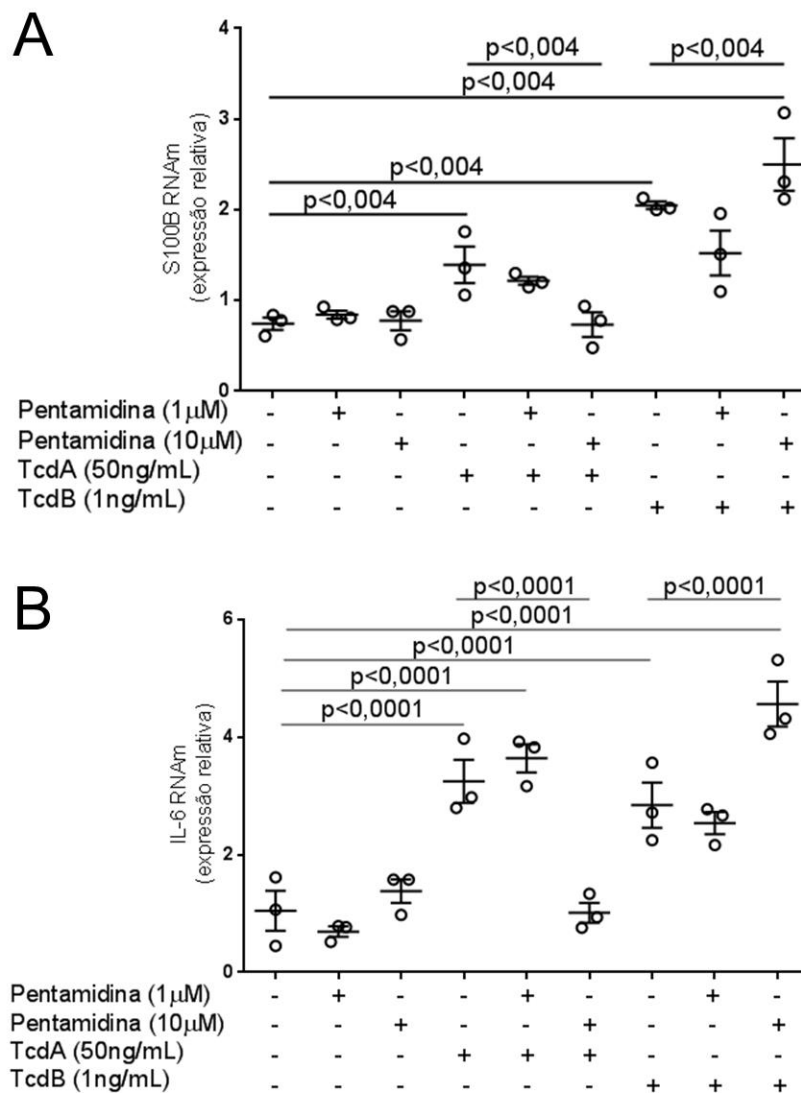
Pentamidina (10 μ M) reverteu a suprarregulação de S100B ($p < 0,004$) e IL-6 ($p < 0,0001$) induzidas por TcdA (figura 39A-B). Em contraste, pentamidina na mesma concentração aumentou a expressão gênica de S100B ($p < 0,004$) e IL-6 ($p < 0,0001$) em CGEs incubadas com TcdB quando comparado com as células incubadas apenas com TcdB (figura 39A-B).

Figura 38 – Efeito da Pentamidina, um inibidor de S100B, na viabilidade de CGEs



Ensaio de viabilidade celular realizado em CGEs incubadas com pentamidina (0,1, 1, 10, 100 e 1000µM), apenas com meio (grupo controle) ou com DMSO (grupo controle de morte) por 18h. A viabilidade celular foi determinada por meio do ensaio de MTT. Os dados são apresentados como média ± EPM (n=6). #p<0,0001 versus grupo controle e *p<0,0001 versus grupo DMSO.

Figura 39- Inibidor de S100B reverte a suprarregulação de S100B e IL-6 induzidas por TcdA, mas não por TcdB, em CGEs



(A) Expressão gênica de S100B e (B) IL-6 avaliadas por qPCR de CGEs incubadas com TcdA (50 ng/mL) e TcdB (1 ng/mL) por 18h, na presença ou ausência de pentamidina (1 e 10 μM), um inibidor de S100B. Os dados são apresentados como média ± EPM da expressão gênica relativa de S100B ou IL-6. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde o valor do nível de significância (p) encontra-se representado no gráfico.

5.3.7.2 Efeito do antagonista do receptor RAGE na expressão de S100B e IL-6, secreção de S100B e apoptose induzidos por TcdA e TcdB em CGEs

Conhecidamente, S100B extracelular se liga ao receptor RAGE, resultando em ativação de NF κ B, que por sua vez regula a transcrição de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6. Dessa forma, investigou-se se a inibição do receptor RAGE, utilizando um antagonista seletivo o FPSZM1, poderia inibir a expressão gênica de S100B, IL-6, secreção de S100B e apoptose induzidos por TcdA e TcdB em CGEs.

Primeiramente, avaliou-se se a linhagem de CGEs utilizada neste estudo expressava o receptor RAGE, bem como se a sua expressão era alterada por TcdA ou TcdB. Conforme apresentado na figura 40A, as CGEs utilizadas nesse estudo expressaram o receptor RAGE. No entanto, TcdA e TcdB não alteraram sua expressão gênica em CGEs em 18h de incubação (figura 40B).

As doses de FPSZM1 utilizadas para investigar o papel de RAGE nas alterações induzidas por TcdA e TcdB em CGEs foram baseadas no ensaio de viabilidade apresentado na figura 41. Conforme esse ensaio, as doses de 1 e 10 μ M não alteraram a viabilidade de CGEs em 18h de incubação.

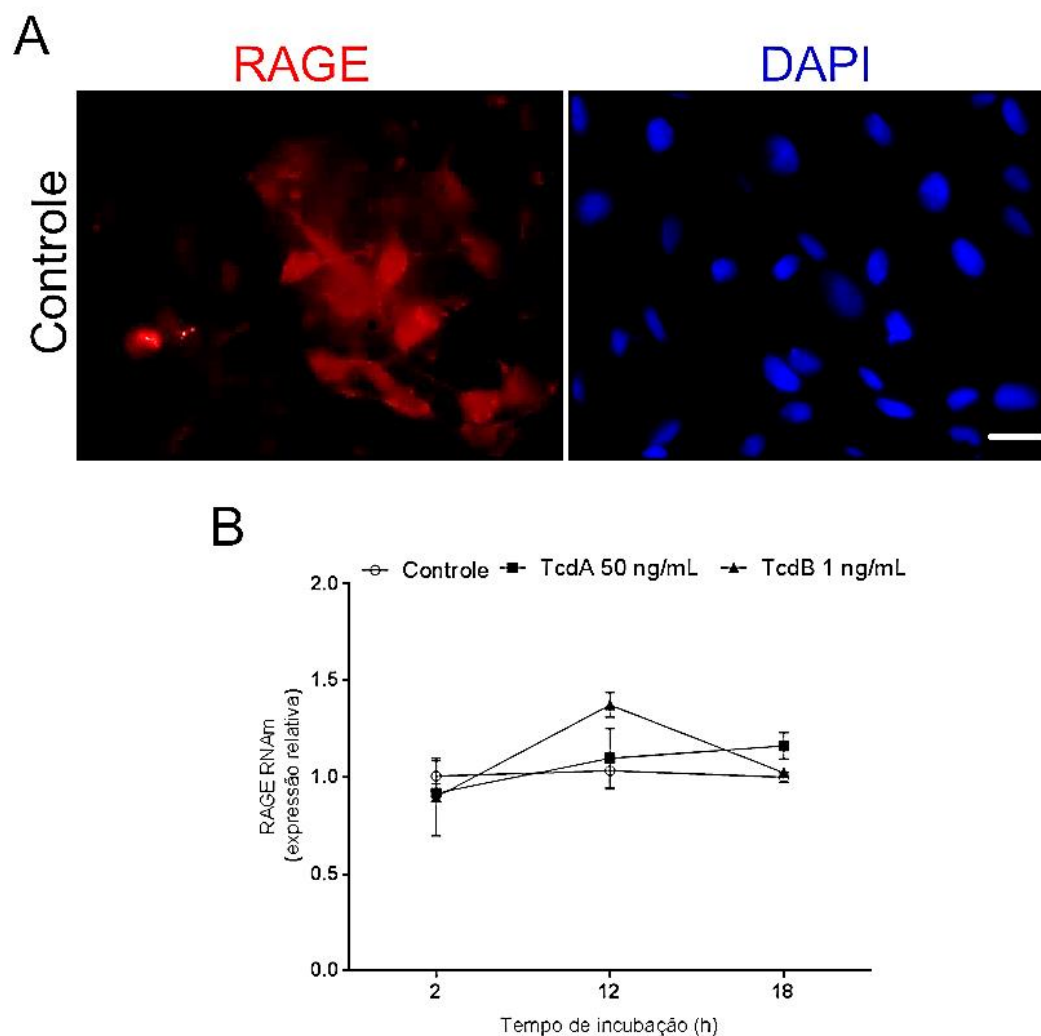
As concentrações de 1 e 10 μ M de FPSZM1 não diminuíram a expressão de S100B e IL-6 induzidas por TcdA e TcdB (figura 42A-B). No entanto, observou-se uma tendência na redução da expressão desses mediadores induzidos por essas toxinas na medida em que se aumentou a dose de FPSZM1. Devido a isso, verificou-se se FPSZM1 na concentração de 30 μ M, apesar de ter reduzido discretamente a viabilidade de CGEs, diminuiria esses efeitos induzidos por TcdA e TcdB.

Ao inibir o receptor RAGE com FPSZM1 observou-se uma redução total da expressão gênica de S100B induzida por TcdA e parcial por TcdB ($p < 0,0001$, figura 43A) comparado as células incubadas apenas com as respectivas toxinas. O FPSZM1 reverteu a expressão gênica de IL-6 induzida por TcdA e TcdB ($p < 0,0001$, figura 43B).

O antagonista de RAGE diminuiu parcialmente a secreção de S100B promovida por TcdA e TcdB ($p < 0,0001$, figura 38C). Além disso, o FPSZM1 diminuiu a apoptose de CGEs induzida por TcdA ($p < 0,0001$, figura 39A), mas não por TcdB (figura 44B).

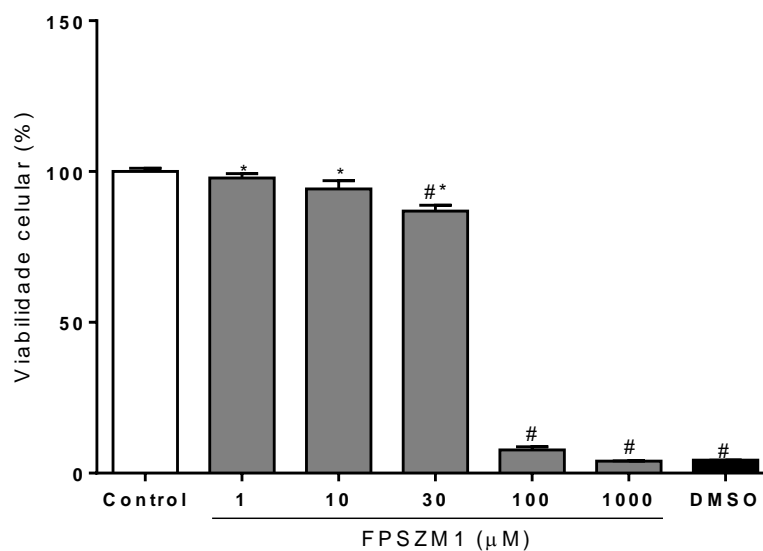
Em conjunto, estes achados indicam que a ativação do receptor RAGE está envolvida na regulação para cima de IL-6 e S100B por TcdA e TcdB. No entanto, a apoptose induzida por TcdA em CGEs é dependente de RAGE, enquanto que por TcdB é independente de RAGE.

Figura 40 – CGEs expressam o receptor RAGE, mas TcdA e TcdB não alteram a sua expressão gênica



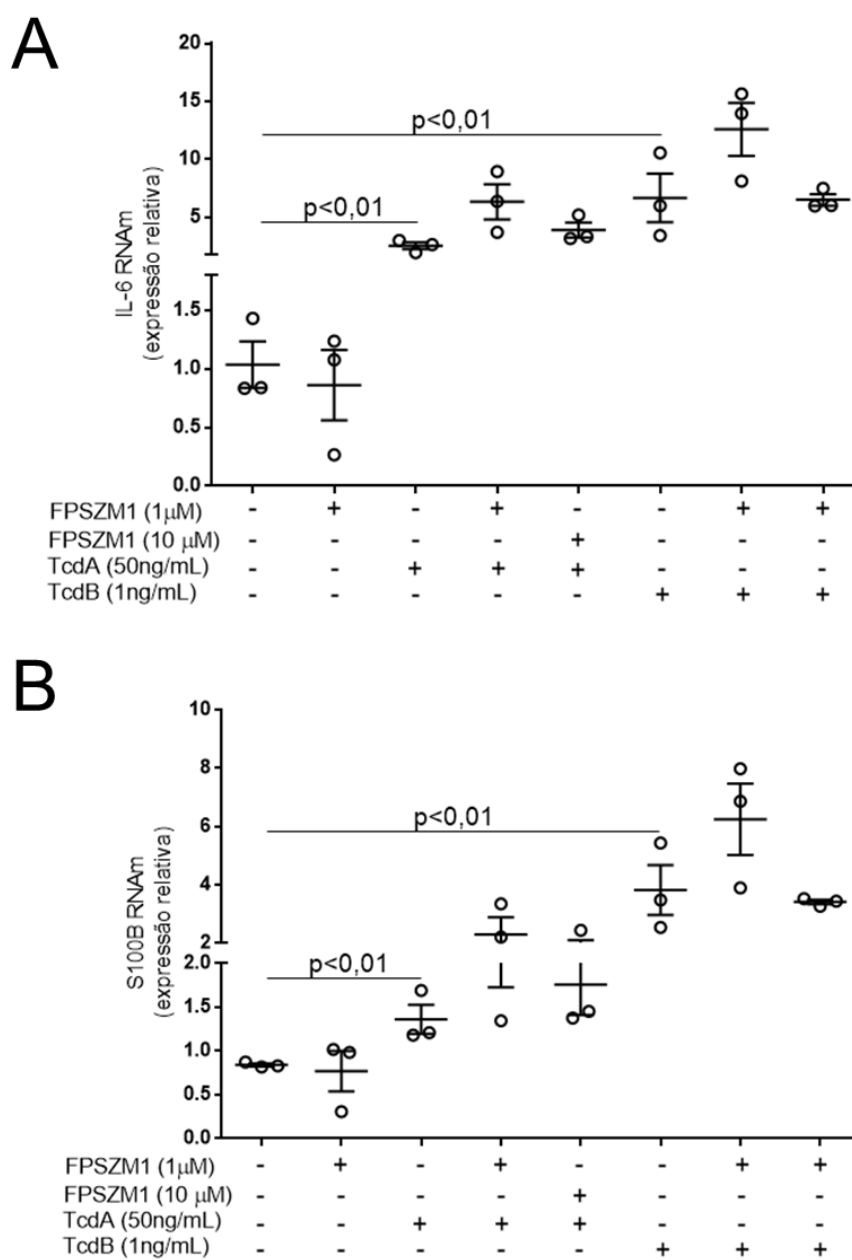
(A) Painéis representativos da imunomarcação de CGEs, que foram incubadas apenas com meio de cultivo (grupo controle) por 18h, com RAGE (vermelho/painel à esquerda) realizada por meio de imunofluorescência. Os núcleos encontram-se marcados com DAPI (azul/painel à direita) (50 μ m). (B) Efeito de TcdA (50 ng/mL) e TcdB (1 ng/mL) na expressão gênica de RAGE em CGEs. A expressão gênica de RAGE por essas células foi avaliada por qPCR. Os dados são apresentados como média \pm EPM da expressão gênica relativa de RAGE. Para análise estatística foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni.

Figura 41- Efeito do FPSZM1, um antagonista do receptor RAGE, na viabilidade de CGEs



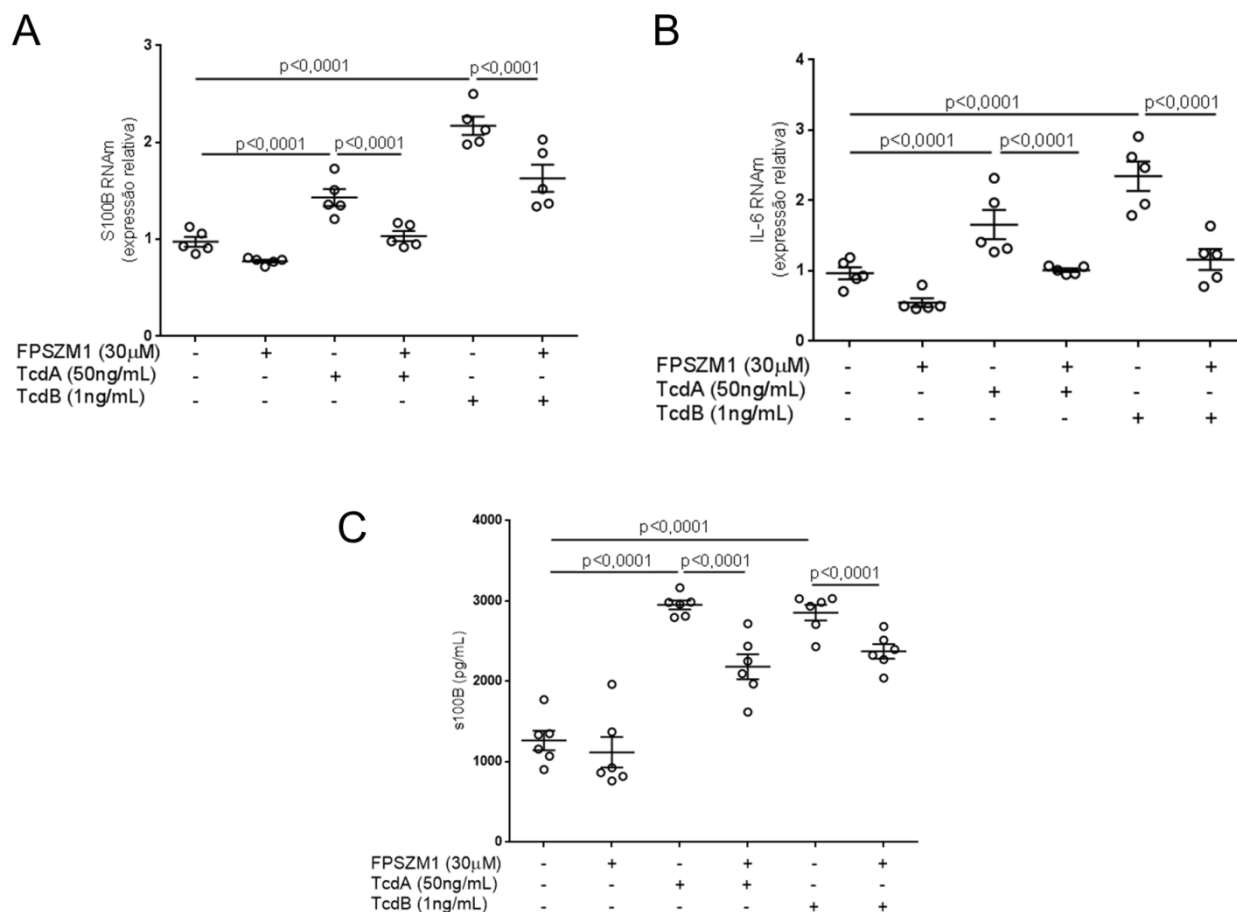
Ensaio de viabilidade celular realizado em CGEs incubadas com FPSZM1 (1, 10, 30, 100 e 1000µM), apenas com meio (grupo controle) ou com DMSO (grupo controle de morte) por 18h. A viabilidade celular foi determinada por meio do ensaio de MTT. Os dados são apresentados como média \pm EPM (n=6). #p<0,0001 versus grupo controle e *p<0,0001 versus grupo DMSO.

Figura 42 – Antagonista do receptor RAGE (FPSZM1 1 e 10 μ M) não reverte a suprarregulação de S100B e IL-6 induzidas por TcdA e TcdB em CGEs



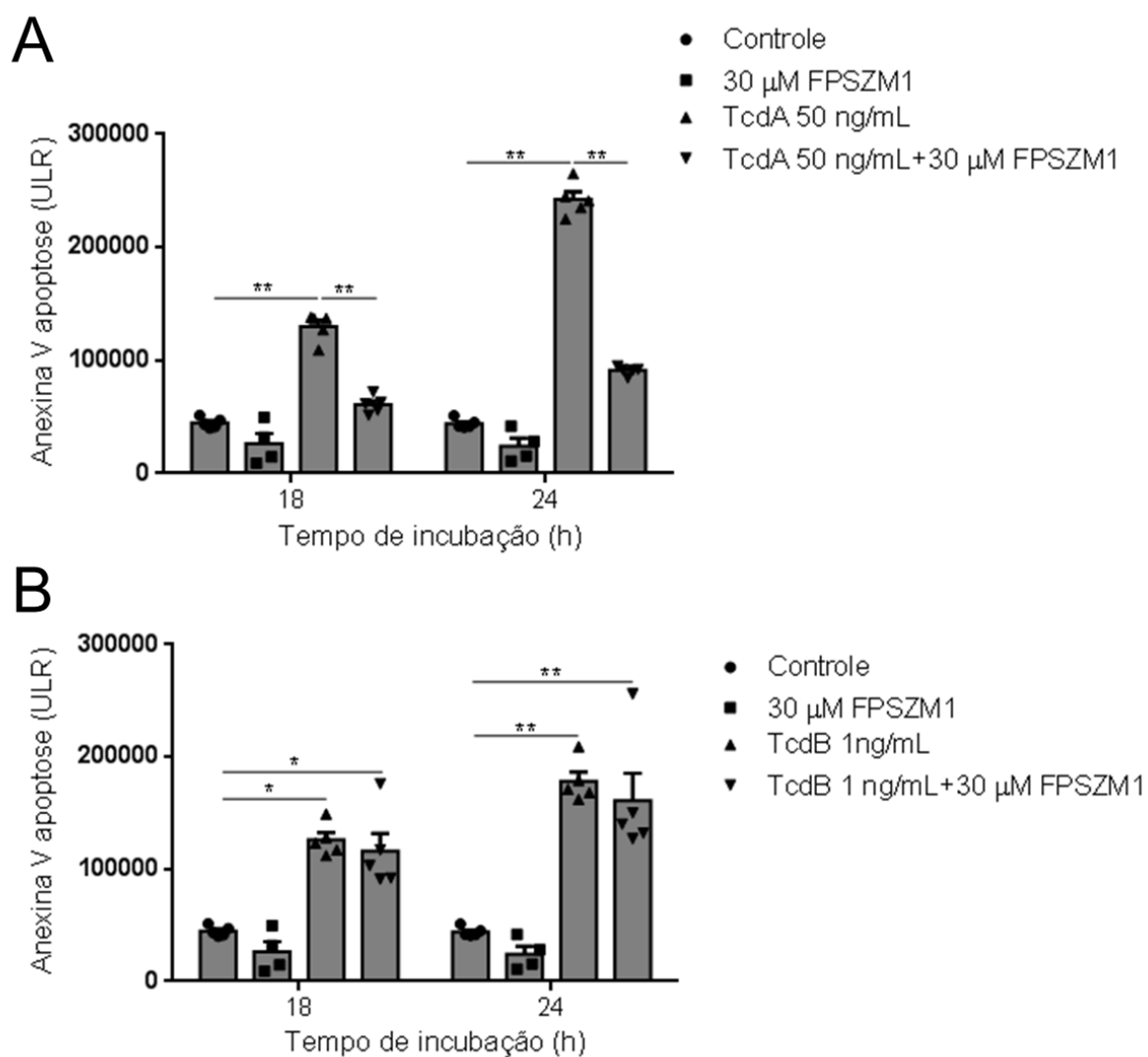
(A) Expressão gênica de S100B e (B) IL-6 avaliadas por qPCR de CGEs incubadas com TcdA (50 ng/mL) e TcdB (1 ng/mL) por 18h, na presença ou ausência de FPSZM1 (1 e 10 μ M), um antagonista do receptor RAGE. Os dados são apresentados como média \pm EPM da expressão gênica relativa de S100B ou IL-6. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde o valor do nível de significância (p) encontra-se representado no gráfico.

Figura 43- Antagonista do receptor RAGE (FPSZM1 30 μ M) reduz a suprarregulação de S100B e IL-6, bem como a secreção de S100B, induzidas por TcdA e TcdB em CGEs



(A) Expressão gênica de S100B e (B) IL-6 avaliadas por qPCR de CGEs incubadas com TcdA (50 ng/mL) e TcdB (1 ng/mL) por 18h, na presença ou ausência de FPSZM1 (30 μ M), um antagonista do receptor RAGE. Os dados são apresentados como média \pm EPM da expressão gênica relativa de S100B ou IL-6. (C) Efeito de FPSZM1 (30 μ M) na secreção de S100B por CGEs incubadas com TcdA (50 ng/mL) e TcdB (1 ng/mL). Os níveis de S100B foram mensurados a partir sobrenadante de CGEs após 18h de exposição à TcdA e TcdB, sendo mensurado por meio do ensaio de ELISA. Os dados são apresentados como média \pm EPM dos níveis de S100B expressos em pg/mL. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde o valor do nível de significância (p) encontra-se representado no gráfico.

Figura 44- Antagonista do receptor RAGE (FPSZM1 30 μ M) diminui a apoptose induzida por TcdA e TcdB em CGEs



A apoptose foi avaliada por meio do ensaio em tempo real Glo-anexina V apoptose em CGEs incubadas com (A) TcdA (50 ng/mL) e (B) TcdB (1 ng/mL) por 18h, na presença ou ausência de FPSZM1 (30 μ M), um antagonista do receptor RAGE. O grupo controle consiste em CGEs incubadas apenas com meio de cultivo. Os dados são apresentados como média \pm EPM (n=5). A unidade de luminescência relativa (ULR) é proporcional à expressão de anexina V. Para análise estatística foi utilizado o teste two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde $**p < 0,0001$.

5.3.7.3 Efeito do inibidor de PI3K na expressão de S100B e IL-6 e apoptose induzidos por TcdA e TcdB em CGEs

Em seguida, buscou-se identificar qual via intracelular estava envolvida na expressão gênica de IL-6 e S100B induzida por TcdA e TcdB em CGEs. Para isso, inibiu-se PI3K usando LY294002, que é conhecido por bloquear indiretamente a ativação de NFκB.

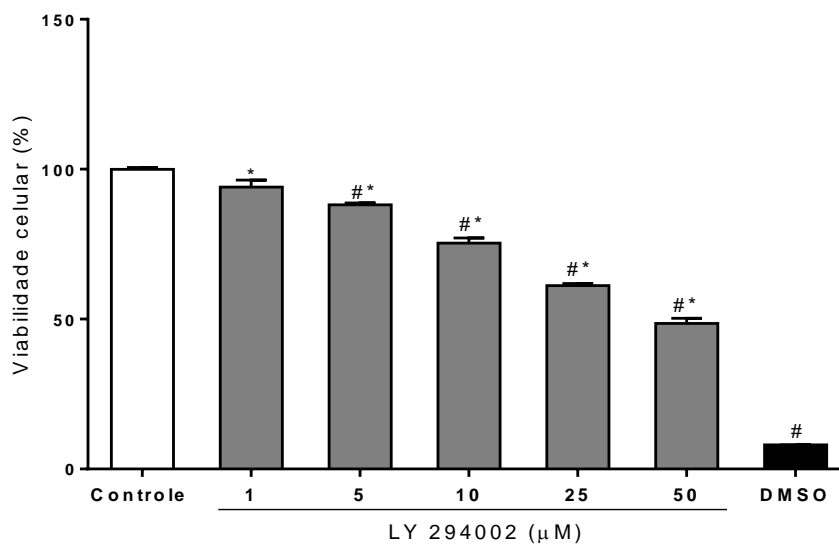
As doses de LY294002 utilizadas para avaliar o papel de PI3K, como importante sinalizador na ativação de NFκB, nas alterações induzidas por TcdA e TcdB em CGEs foram baseadas no ensaio de viabilidade apresentado na figura 45. Conforme esse ensaio, as concentrações de 1 e 10μM foram definidas para as demais análises. A concentração de LY294002 1μM não alterou a viabilidade de CGEs em 18h de incubação. Apesar da concentração de LY294002 10μM ter alterado a viabilidade, foi utilizada no presente estudo por não ter a reduzido de forma expressiva. Além disso, essa queda na viabilidade pode estar relacionado ao fato de que PI3K participa na regulação da proliferação celular.

O LY294002 aumentou expressivamente a expressão gênica e liberação de S100B em CGEs incubadas com TcdA e TcdB comparada as células expostas apenas à essas toxinas ($p < 0,0002$, figura 46A e 46C). Em contraste, LY294002 reduziu notavelmente a suprarregulação de IL-6 induzida por TcdA e TcdB em CGEs ($p < 0,0002$, figura 46B).

Conforme apresentado na figura 47, o inibidor de PI3K aumentou a apoptose induzida por TcdA e TcdB em CGEs ($p < 0,0001$).

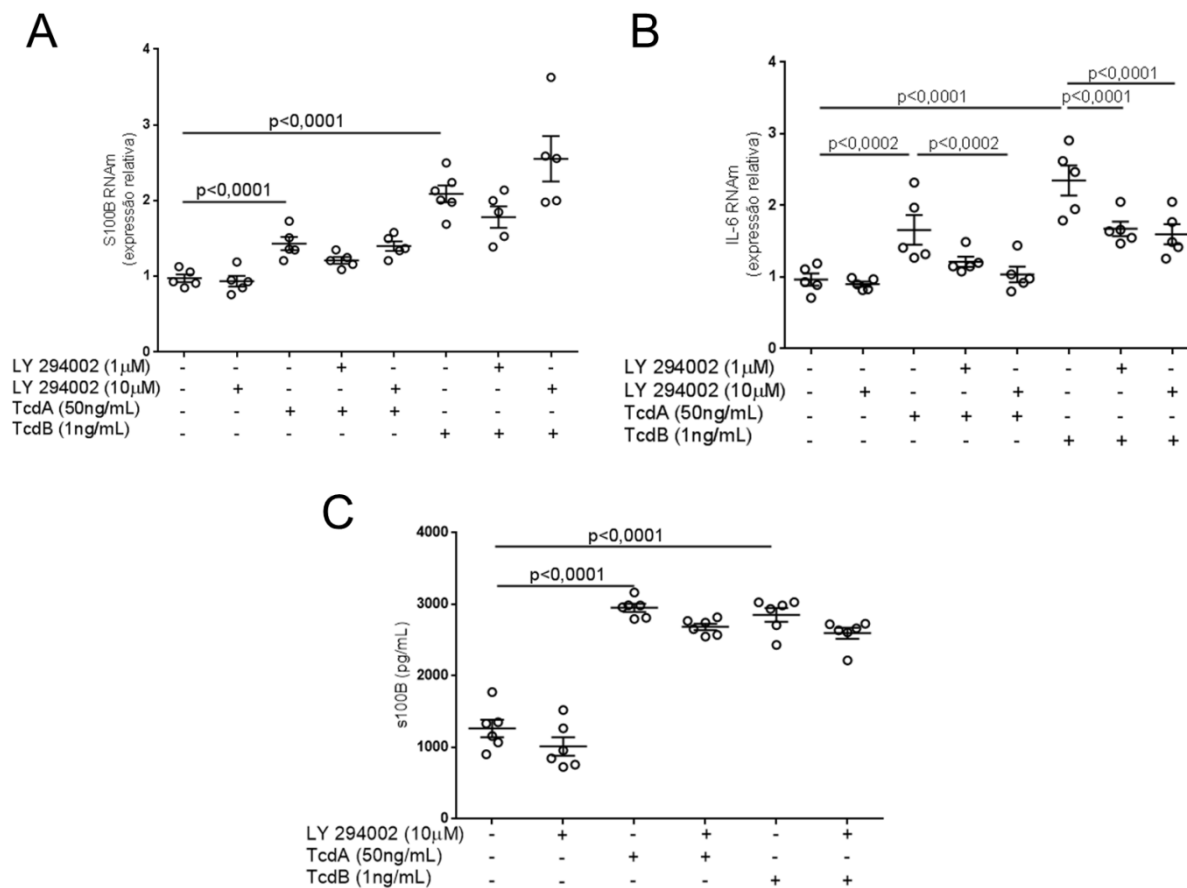
Estes achados apontam que S100B/RAGE/PI3K/NFκB regula a expressão gênica de IL-6 induzida por TcdA e TcdB em CGEs. Enquanto que a expressão de S100B induzida por TcdA e TcdB não é mediada por PI3K/NFκB. Em adição, PI3K demonstrou ser um importante regulador da apoptose induzida por TcdA e TcdB em CGEs.

Figura 45 - Efeito do LY294002, um inibidor de PI3K, na viabilidade de CGEs



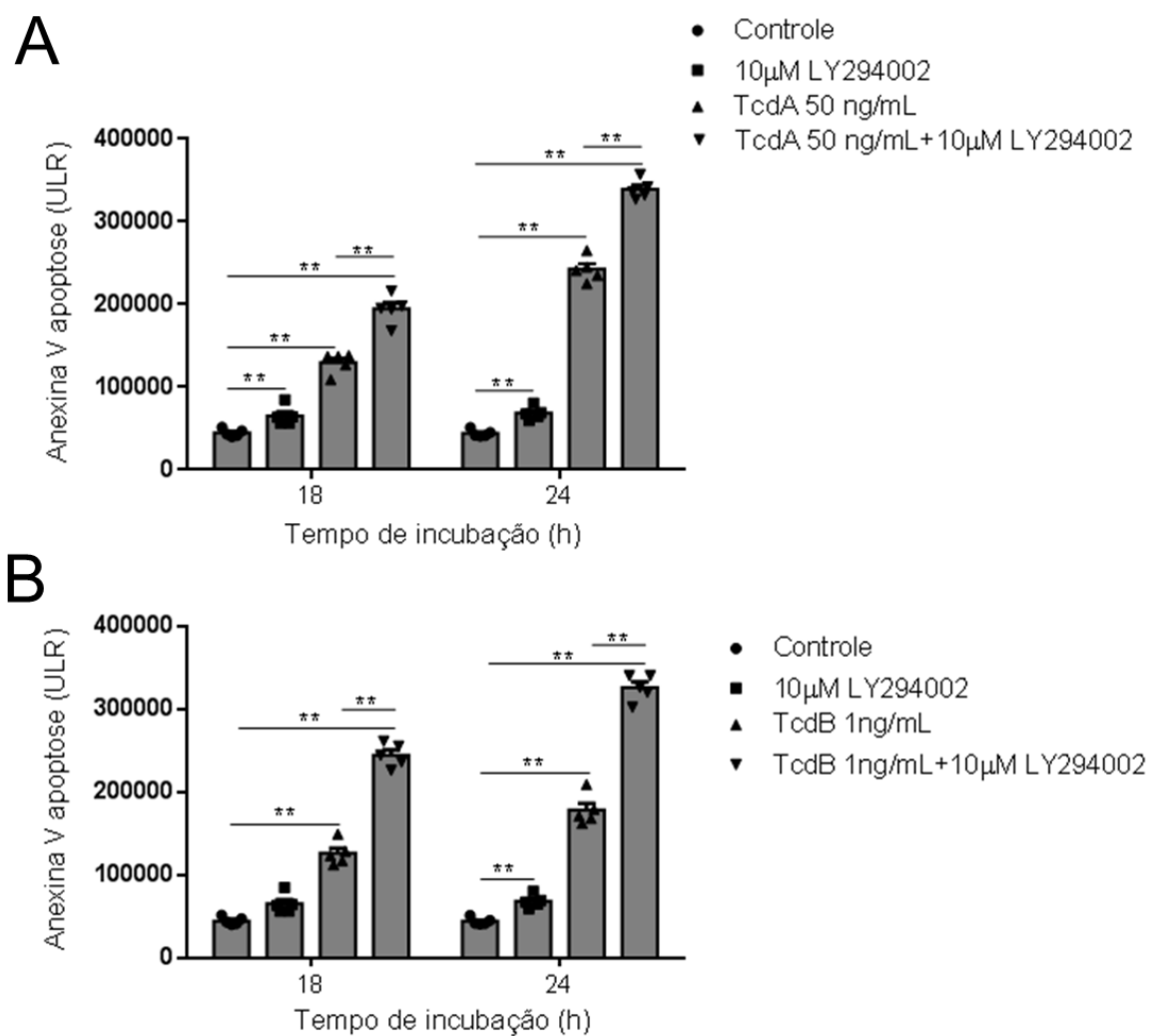
Ensaio de viabilidade celular realizado em CGEs incubadas com LY294002 (1, 5, 10, 25 e 50μM), apenas com meio (grupo controle) ou com DMSO (grupo controle de morte) por 18h. A viabilidade celular foi determinada por meio do ensaio de MTT. Os dados são apresentados como média ± EPM (n=6). #p<0,0001 versus grupo controle e *p<0,0001 versus grupo DMSO.

Figura 46 - Inibidor de PI3K diminui a suprarregulação de IL-6, mas não a de S100B, induzida por TcdA e TcdB em CGEs



(A) Expressão gênica de S100B e (B) IL-6 avaliadas por qPCR de CGEs incubadas com TcdA (50 ng/mL) e TcdB (1 ng/mL) por 18h, na presença ou ausência de LY294002 (1 e 10 µM), um inibidor de PI3K. Os dados são apresentados como média ± EPM da expressão gênica relativa de S100B ou IL-6. (C) Efeito de LY294002 (1 e 10 µM) na secreção de S100B por CGEs incubadas com TcdA (50 ng/mL) e TcdB (1 ng/mL). Os níveis de S100B foram mensurados a partir do sobrenadante de CGEs após 18h de exposição à TcdA e TcdB, sendo mensurado por meio do ensaio de ELISA. Os dados são apresentados como média ± EPM dos níveis de S100B expressos em pg/mL. Para análise estatística, utilizou-se o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde o valor do nível de significância (p) encontra-se representado no gráfico.

Figura 47 - Inibidor de PI3K aumenta a apoptose induzida por TcdA e TcdB em CGEs



A apoptose foi avaliada por meio do ensaio em tempo real Glo-anexina V apoptose em CGEs incubadas com (A) TcdA (50 ng/mL) e (B) TcdB (1 ng/mL) por 18h, na presença ou ausência de LY294002 (1 e 10 µM), um inibidor de PI3K. O grupo controle consiste em CGEs incubadas apenas com meio de cultivo. Os dados são apresentados como média ± EPM (n=5). A unidade de luminescência relativa (ULR) é proporcional à expressão de anexina V. Para análise estatística, utilizou-se o teste two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde $**p < 0,0001$.

5.3.7.4 Efeito do inibidor de STAT3 na expressão de S100B e IL-6 e apoptose induzidas por TcdA e TcdB em CGEs

A via de sinalização intracelular envolvida na expressão de S100B e IL-6, bem como apoptose, induzida por TcdA e TcdB em CGEs demonstraram serem diferentes. Dado que a ligação de S100B ao receptor RAGE pode resultar na ativação do fator de transcrição STAT3 (WEI *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2011; REDDY *et al.*, 2006), levantou-se a hipótese de que TcdA e TcdB, além de ativar NFκB, também poderia estar ativando STAT3. Este, por sua vez, poderia estar envolvido na expressão de S100B e apoptose induzidos por TcdA e TcdB.

De acordo com os dados apresentados na figura 48A, TcdA e TcdB aumentaram ($p < 0,0001$) o número de células com imunomarcagem nuclear positiva para pSTAT3, indicando maior translocação nuclear de STAT3, em CGEs após 18h de incubação comparado ao grupo controle. Esses achados podem ser observados na figura 48B, onde na ausência das toxinas apenas algumas CGEs apresentaram translocação de pSTAT3 para o núcleo. Enquanto que na presença de TcdA e TcdB se observou um aumento expressivo de células com translocação nuclear desse fator de transcrição.

As doses de galielalactona utilizadas para avaliar o papel de STAT3 nas alterações induzidas por TcdA e TcdB em CGEs foram baseadas no ensaio de viabilidade apresentado na figura 49. Conforme esse ensaio, as concentrações de 1 e 10μM foram definidas para as demais análises. A concentração de galielalactona 1μM não alterou a viabilidade de CGEs em 18h de incubação. Apesar da concentração de galielalactona 10μM ter alterado a viabilidade, foi utilizada no presente estudo por não ter a reduzido de forma expressiva.

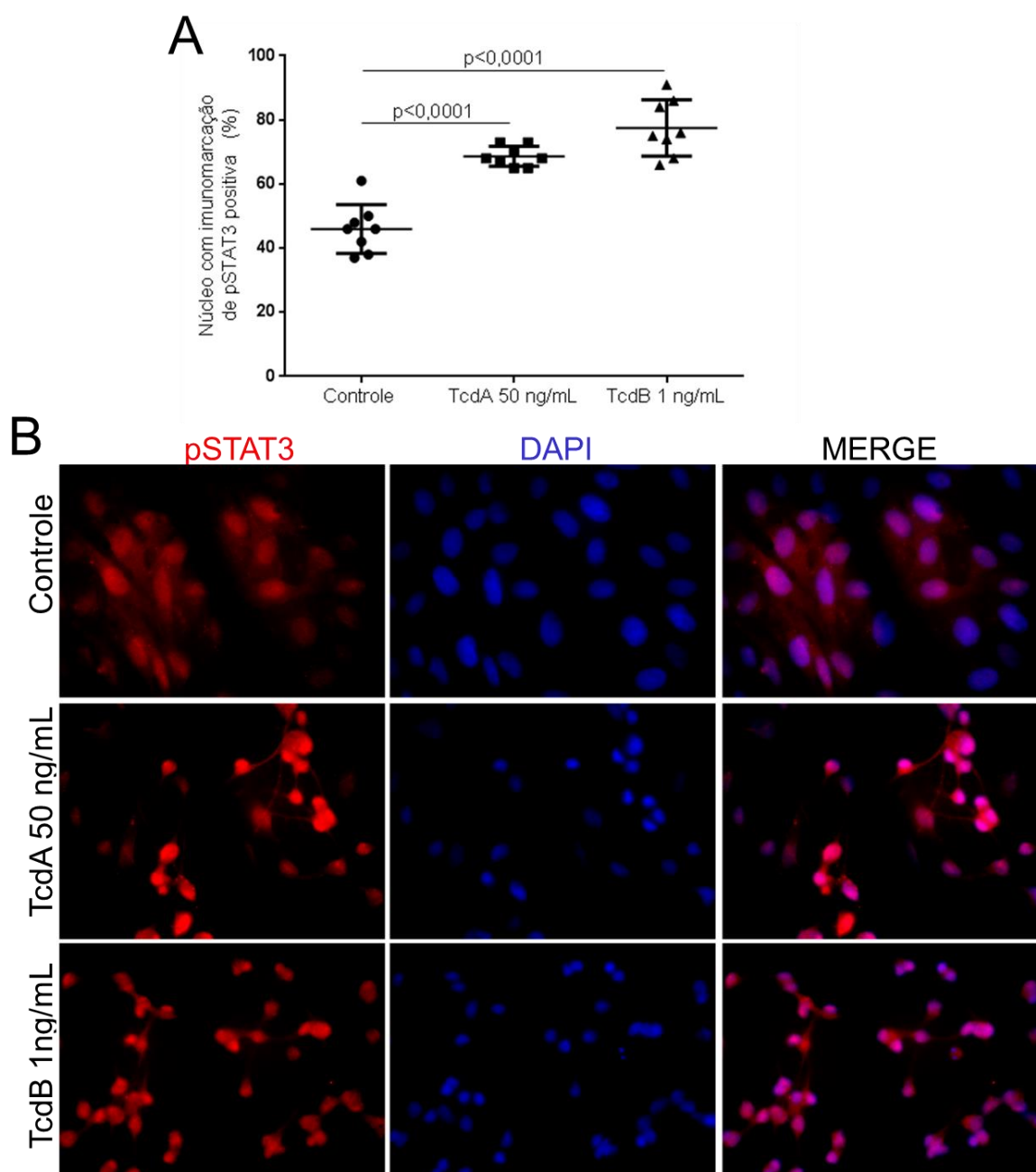
Ao inibir farmacologicamente STAT3 por meio de galielalactona, observou-se que o inibidor desse fator de transcrição reverteu a suprarregulação de S100B induzida por TcdA e TcdB após 18h de incubação ($p < 0,0001$, figura 50A). Evidenciou-se ainda que a galielalactona diminuiu a expressão gênica de IL-6 induzida por TcdB, mas não por TcdA ($p < 0,0001$, figura 50B). Além de reduzir a expressão gênica de S100B, galielalactona diminuiu a secreção de S100B induzida por TcdA e TcdB em CGEs ($p < 0,0001$, figura 50C).

Em adição, galielalactona diminuiu a apoptose induzida por TcdA e TcdB em CGEs após 18h de incubação, persistindo ainda após 24h ($p < 0,0001$, figura 51A-B).

Esses achados apontam que STAT3 regula a expressão gênica de S100B e apoptose induzidas por TcdA e TcdB em CGEs. A ativação desse fator de transcrição está envolvido também na regulação da expressão de IL-6 em CGEs expostas à TcdB. Os achados, até então, apontam que a apoptose mediada pela ativação de STAT3 em CGEs expostas à TcdA ocorreu

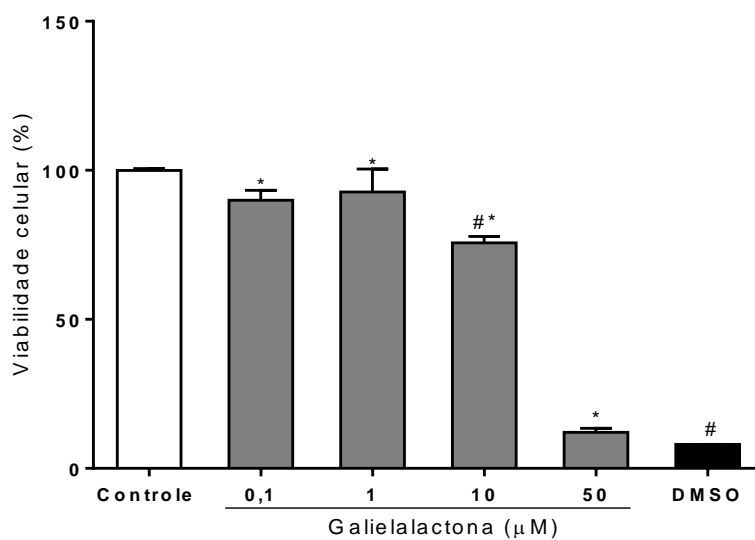
de forma dependente de RAGE. Enquanto que nas CGEs expostas à TcdB foi independente da ativação desse receptor.

Figura 48 - TcdA e TcdB aumentam a translocação nuclear de STAT3 em CGEs



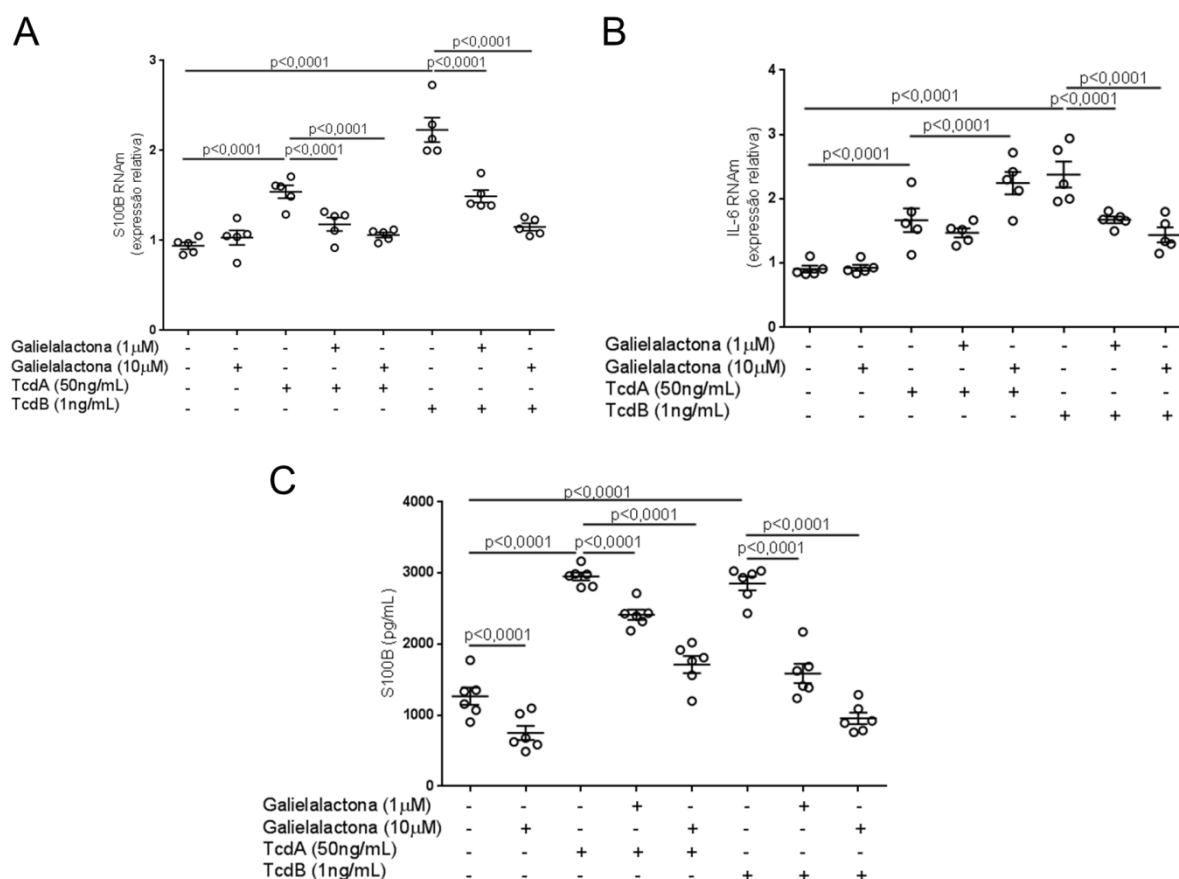
(A) Porcentagem de CGEs com imunomarca o positiva para pSTAT3 no núcleo após 18h de incubac o com TcdA e TcdB. Os dados são apresentados como média \pm EPM da porcentagem de núcleos com imunomarca o para pSTAT3. Para análise estatística, utilizou-se o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde o valor do nível de significância (p) encontra-se representado no gráfico. (B) Painéis representativos da imunomarca o de CGEs, que foram incubadas com TcdA (50ng/mL), TcdB (1ng/mL) ou apenas meio de cultivo (grupo controle) por 18h, com pSTAT3 (vermelho/painéis   esquerda) realizada por meio de imunofluorescência. Os núcleos encontram-se marcados com DAPI (azul/painéis ao centro). A sobreposi o das imagens (MERGE) encontra-se nos painéis a direita (50 μ m)

Figura 49 - Efeito da galielalactona, um inibidor de STAT3, na viabilidade de CGEs



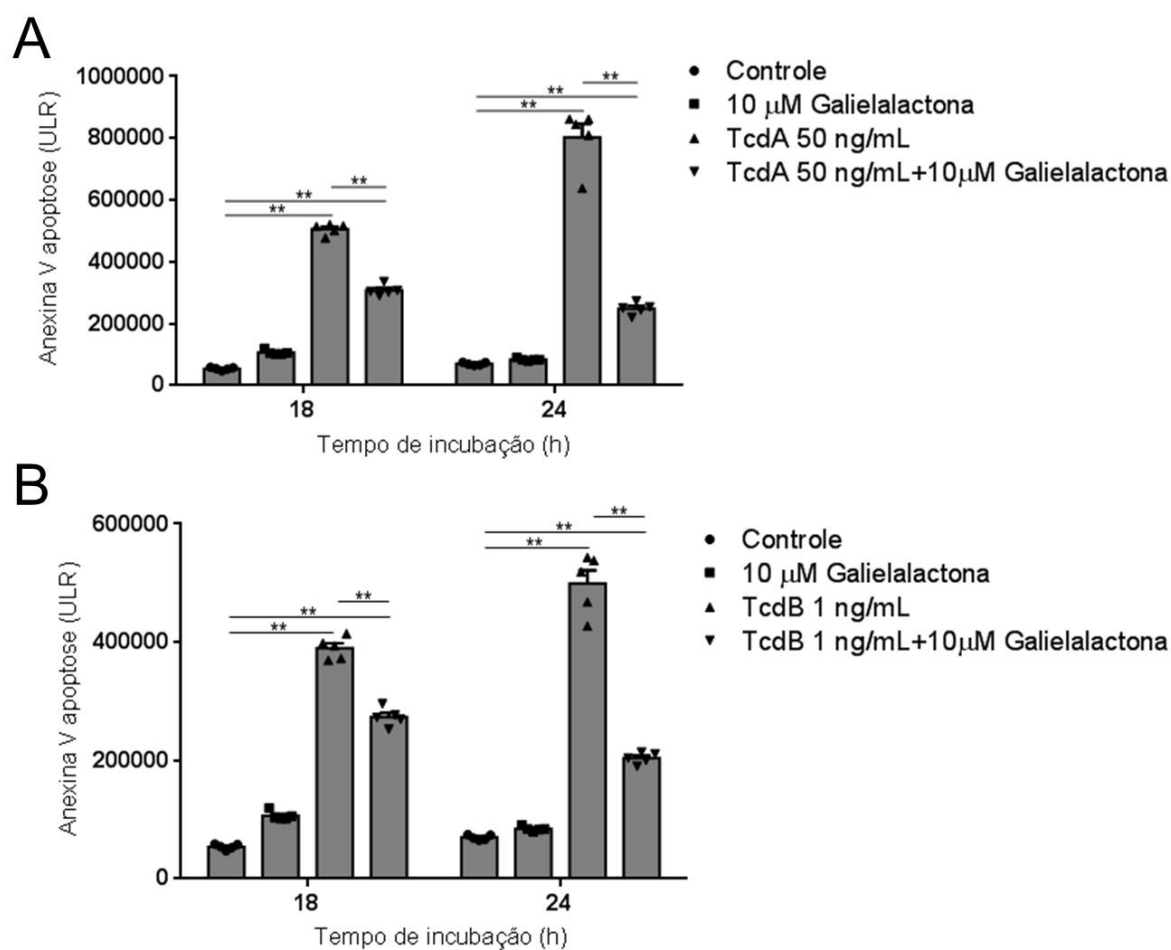
Ensaio de viabilidade celular realizado em CGEs incubadas com galielalactona (0,1, 1, 10 e 50 μM), apenas com meio (grupo controle) ou com DMSO (grupo controle de morte) por 18h. A viabilidade celular foi determinada por meio do ensaio de MTT. Os dados são apresentados como média \pm EPM (n=6). #p<0,0001 versus grupo controle e *p<0,0001 versus grupo DMSO.

Figura 50 - Inibidor de STAT3 reverte a suprarregulação de S100B, bem como a sua liberação, induzida por TcdA e TcdB e diminui a de IL-6 induzida por TcdB em CGEs



(A) Expressão gênica de S100B e (B) IL-6 avaliadas por qPCR de CGEs incubadas com TcdA (50 ng/mL) e TcdB (1 ng/mL) por 18h, na presença ou ausência de galielalactona (1 e 10 μM), um inibidor de STAT3. Os dados são apresentados como média ± EPM da expressão gênica relativa de S100B ou IL-6. (C) Efeito de galielalactona (1 e 10 μM) na secreção de S100B por CGEs incubadas com TcdA (50 ng/mL) e TcdB (1 ng/mL). Os níveis de S100B foram mensurados a partir do sobrenadante de CGEs após 18h de exposição à TcdA e TcdB, sendo mensurado por meio do ensaio de ELISA. Os dados são apresentados como média ± EPM dos níveis de S100B expressos em pg/mL. Para análise estatística, utilizou-se o teste one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde o valor do nível de significância (p) encontra-se representado no gráfico.

Figura 51 - Inibidor de STAT3 diminui a apoptose induzida por TcdA e TcdB em CGEs



A apoptose foi avaliada por meio do ensaio em tempo real Glo-anexina V apoptose em CGEs incubadas com (A) TcdA (50 ng/mL) e (B) TcdB (1 ng/mL) por 18h, na presença ou ausência de galielalactona (1 e 10 μ M), um inibidor de STAT3. O grupo controle são CGEs incubadas apenas com meio de cultivo. Os dados são apresentados como média \pm EPM (n=5). A unidade de luminescência relativa (ULR) é proporcional à expressão de anexina V. Para análise estatística, utilizou-se o teste two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde $**p < 0,0001$.

5.3.7.5 Participação de S100B no efeito antiapoptótico do inibidor de STAT3 em CGEs expostas a TcdA e TcdB

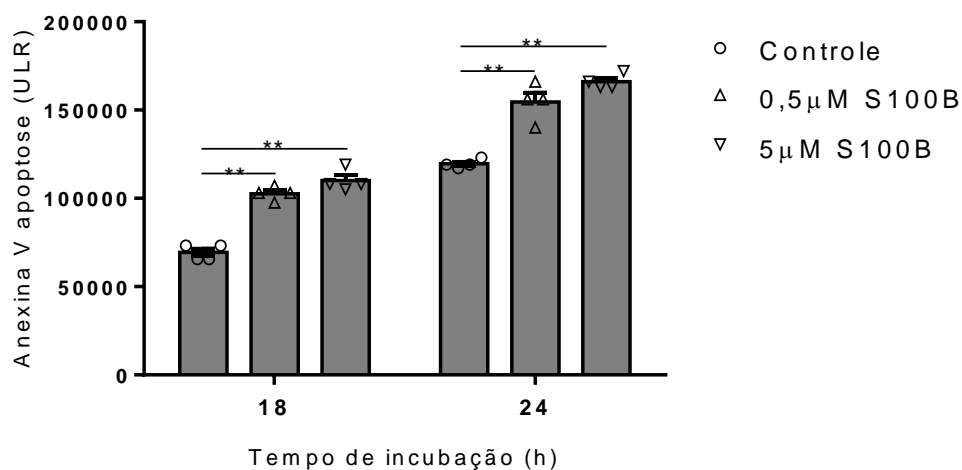
Dado que o efeito antiapoptótico de galielalactona em CGEs expostas a TcdA e TcdB ocorreu de forma concomitantemente com redução da expressão de S100B, questionou-se se a adição de uma proteína recombinante de S100B no sobrenadante de CGEs poderia reverter esses efeitos de galielalactona em CGEs na presença das toxinas do *C. difficile*.

Primeiramente, investigou-se se a proteína recombinante de S100B estimularia apoptose em CGEs na ausência das toxinas do *C.difficile*. Conforme apresentado na figura 52, a proteína S100B (0,5 e 5 μ M) estimulou a apoptose de CGEs comparado ao grupo controle ($p < 0,0001$).

Ao adicionar a proteína S100B em CGEs incubadas com TcdA e TcdB e pré-tratadas com galielalactona, notou-se que o inibidor de STAT3 perdeu a sua capacidade de inibir a apoptose induzida por TcdA e TcdB ($p < 0,0001$, figura 53).

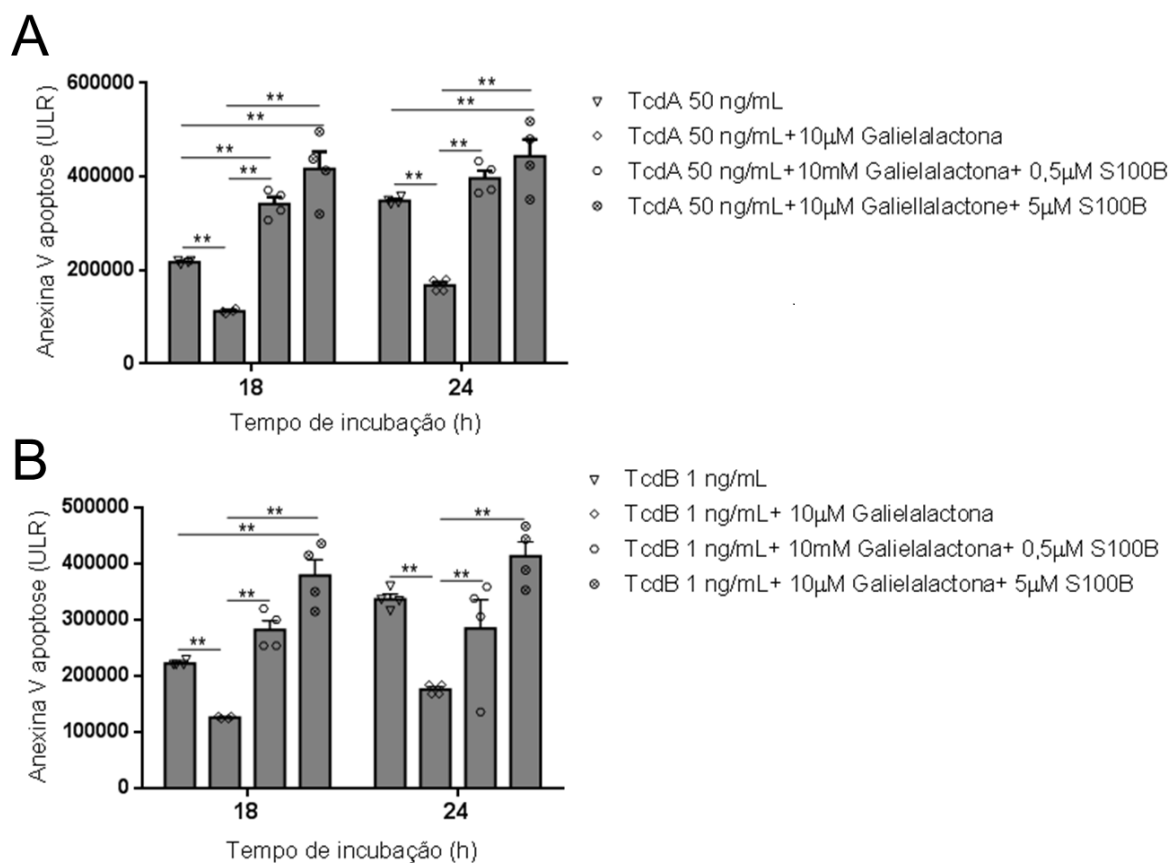
Esses resultados confirmam que S100B é o mediador responsável pela apoptose induzida por TcdA e TcdB em CGEs.

Figura 52 - S100B estimula a apoptose em CGEs



A apoptose foi avaliada por meio do ensaio em tempo real Glo-anexina V apoptose em CGEs incubadas com a proteína recombinante S100B (0,5 e 5 μ M) por 18h. O grupo controle são CGEs incubadas apenas com meio de cultivo. Os dados são apresentados como média \pm EPM (n=5). A unidade de luminescência relativa (ULR) é proporcional à expressão de anexina V. Para análise estatística, utilizou-se o teste two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde $**p < 0,0001$.

Figura 53 - Reposição de S100B inibe o efeito antiapoptico do inibidor de STAT3 em CGEs expostas à TcdA e TcdB



A apoptose foi avaliada por meio do ensaio em tempo real Glo-anexina V apoptose em CGEs incubadas com (A) TcdA (50 ng/mL) e (B) TcdB (1 ng/mL) por 18h, na presença ou ausência de galielalactona (10 µM), um inibidor de STAT3, e/ou proteína recombinante S100B (0,5 e 5µM). Os dados são apresentados como média ± EPM (n=4). A unidade de luminescência relativa (ULR) é proporcional à expressão de anexina V. Para análise estatística, utilizou-se o teste two-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, onde $**p < 0,0001$.

6 DISCUSSÃO

Em nosso estudo, demonstramos elevada expressão de S100B em todas as camadas da parede intestinal de amostras do cólon e do ceco de humanos e de camundongos infectados com *C. difficile* respectivamente, bem como no íleo de camundongos desafiados com TcdA, sugerindo que esse mediador pode estar envolvido na ICD.

O mediador S100B tem sido amplamente investigado devido a sua suprarregulação em uma variedade de doenças, como a colite ulcerativa (CELIKBILEK *et al.*, 2014; CIRILLO *et al.*, 2009), doença celíaca (ESPOSITO *et al.*, 2007), inflamação intestinal induzida por quimioterápico (COSTA *et al.*, 2019; NOGUEIRA *et al.*, 2017), esquizofrenia (HONG *et al.*, 2016; ROTHERMUNDT *et al.*, 2001), doença de Parkinson (SATHE *et al.*, 2012) e lúpus eritematoso sistêmico (PORTELA *et al.*, 2002). Pela primeira vez, demonstramos o aumento de sua expressão na ICD.

S100B, uma proteína de ligação ao cálcio do tipo EF-hand que é codificada no cromossomo 21q22.3, pertence a família de proteínas S100 que até o presente momento é composta por 25 proteínas (AUSTERMANN; SPIEKERMANN; JOHANNES, 2018). S100B intracelular interage com uma variedade de proteínas citoplasmáticas, regulando a fosforilação, ativação e inibição de enzimas, a dinâmica do citoesqueleto, a degradação protéica, a homeostase do cálcio, o metabolismo energético, a proliferação, a regulação transcricional e o reparo do DNA (BERTHELOOT; LATZ, 2017; DONATO *et al.*, 2013).

As CGEs quando expostas às citocinas pró-inflamatórias, liberam S100B e produzem NO (CIRILO *et al.*, 2011). Quando S100B é liberado em grandes concentrações para o meio extracelular, ele funciona com padrão molecular associado ao dano (DAMP) devido a sua capacidade de estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias (SAVIDGE *et al.*, 2007). Dessa forma, o aumento de S100B na ICD demonstrado aqui em humanos e em modelo animal, sugere sua participação no intenso processo inflamatório característico da doença induzida pelo *C. difficile*, no qual citocinas inflamatórias estão comprovadamente envolvidas.

Durante as doenças inflamatórias intestinais, como doença de Crohn e colite ulcerativa, o aumento de S100B é acompanhado pelo aumento dos fatores gliais GFAP e GDNF na fase inflamatória. No cólon inflamado de pacientes com ICD também foi descrito anteriormente aumento dos níveis de GFAP e GDNF (VON BOYER *et al.*, 2012). De forma similar, evidenciou-se aumento de GFAP no ceco e no íleo de camundongos submetidos à ICD e ileíte induzida por TcdA, respectivamente. Além disso, TcdA induziu o aumento da expressão gênica de S100B, GFAP e GDNF no íleo de camundongos. Esses achados mostram que na ICD

em humanos e em modelo experimental em camundongos, bem como na exposição direta do íleo à TcdA, ocorre gliose reativa no intestino. A gliose reativa é caracterizada pelo aumento da expressão de fatores gliais como GFAP e S100B (MCCLAIN; GULBRANSEN, 2017; THACKER *et al.*, 2011; VON BOYEN *et al.*, 2004; BRADLEY *et al.*, 1997; GABELLA, 1984).

Durante a injúria intestinal, a gliose reativa é considerada uma resposta de CGEs que pode proteger a rede de neurônios durante a injúria intestinal (BURDA; SOFRONIEW, 2014). No entanto, esse processo pode ocasionar danos aos neurônios e às próprias CGEs devido a uma resposta desregulada dessas células aos fatores de virulência de bactérias patogênicas ou mediadores pró-inflamatórios liberados por células do sistema imune, neurônios ou CGEs. Refletindo essa dualidade de ação, o GDNF produzido pelas CGEs em resposta as toxinas do *C. difficile* pode funcionar como fator protetor, já que tem ação antiapoptótica em células epiteliais intestinais e em CGEs (SAVIDGE *et al.*, 2007; STEINKAMP *et al.*, 2012).

De acordo com os dados apresentados acima, trabalhos do nosso grupo demonstraram que na mucosite intestinal induzida por 5-FU e irinotecano, ambos caracterizados por extenso dano tecidual e intensa resposta inflamatória intestinal, ocorre intensa gliose reativa que é revertida pelo inibidor de S100B, a pentamidina, e depletador de mastócitos, o composto 48/80, respectivamente (COSTA *et al.*, 2019; NOGUEIRA *et al.*, 2017). Ademais, esses estudos demonstraram que o controle da gliose reativa reduziu a morte de neurônios entéricos, resposta inflamatória intestinal e dano tecidual, que foram induzidos por S100B na mucosite induzida por 5-FU e pela liberação de mediadores liberados pelos mastócitos na mucosite por irinotecano (COSTA *et al.*, 2019; NOGUEIRA *et al.*, 2017).

In vivo, os mediadores liberados pelas células do sistema imune (macrófagos, linfócitos T e mastócitos), células epiteliais e neurônios podem influenciar na resposta de CGEs, dificultando a compreensão de como essas células são afetadas diretamente pelas toxinas do *C. difficile*. Devido a isso, utilizou-se uma linhagem de CGEs imortalizadas oriundas do jejuno de ratos para investigar como as mesmas são afetadas pela TcdA e TcdB, principais fatores de virulência do *C. difficile*, que causam danos intestinais durante a ICD. Vale enfatizar que CGEs de ratos exibem propriedades funcionais semelhantes às CGEs provenientes de humanos (SORET *et al.*, 2013).

As toxinas do *C. difficile* inativam as Rho GTPases causando desarranjo do citoesqueleto de actina, resultando em arredondamento celular, diminuição da proliferação, perda da viabilidade celular e apoptose conforme demonstrado em uma variedade de células (TINOCO-VERAS *et al.*, 2017; BRITO *et al.*, 2002a; BRITO *et al.*, 2005, , LIMA *et al.*, 2014;

BRITO *et al.*, 2002b; CALDERON *et al.*, 1998). Esses achados também foram evidenciados no presente estudo em CGEs incubadas com TcdA e TcdB. Identificou-se que TcdB altera a morfologia de CGEs (0,1 ng/ml) já em 30 min de exposição e diminui a viabilidade dessas células a partir de 12h. Estes dados estão de acordo com estudos anteriores que evidenciaram que TcdB (1ng/ml) induz arredondamento e perda da viabilidade celular na mesma linhagem de CGEs utilizadas no presente estudo (FETTUCCIARI *et al.*, 2017; MACCHIONI *et al.*, 2017). Os efeitos de TcdA sobre CGEs, que foram observados de forma inédita nesse estudo, ocorreram tardiamente comparados aos de TcdB. Apesar disso, TcdA atinge similar efeito aos de TcdB, a partir de 18h de incubação, dependendo da concentração (TcdA 50 ng/mL).

No presente estudo, demonstrou-se que tanto a TcdA quanto a TcdB estimulam a expressão de fatores gliais (GFAP, GDNF e S100B) em CGEs. Esses resultados confirmam o que já havia sido demonstrado aqui em modelos animais. Todas as concentrações de TcdA e TcdB induziram aumento de expressão e de secreção de S100B em CGEs. No entanto, houve uma redução da expressão de GFAP, de forma concomitante com um aumento de S100B em CGEs incubadas com TcdA ou TcdB em 12h de exposição. Enquanto que em 18h de incubação, as CGEs desafiadas com TcdA (50 ng/mL) e TcdB (1ng/mL) encontraram-se em estado de ativação com GFAP e S100B aumentados. A expressão de GFAP, GDNF e S100B induzida por TcdA e TcdB em CGEs não ocorreu de forma sincronizada, sugerindo que a regulação e expressão desses fatores não ocorrem por meio de uma mesma via de sinalização.

O GFAP, uma proteína ácida fibrilar glial expressa por subtipos de CGEs, e GDNF, cuja principal fonte são CGEs positivas para GFAP, podem ser regulados positivamente para cima por IL-1 β , TNF- α e LPS (FRANCESCHI *et al.*, 2017; VON BOYER *et al.*, 2006; VON BOYER *et al.*, 2004). Em nosso estudo, não detectamos TNF- α e IL-1 β no sobrenadante de CGEs expostas à TcdA ou à TcdB por ELISA, sugerindo que ambas as toxinas podem causar ativação de células gliais de forma independente dessas citocinas pró- inflamatórias.

Evidenciamos ainda que a regulação positiva de S100B induzida por TcdA e TcdB foi mais pronunciada do que alterações de GFAP e GDNF, indicando que essa proteína da família S100 desempenha um papel predominante nas alterações de CGEs induzidas por toxinas do *C. difficile*.

Uma vez liberado em níveis elevados no espaço extracelular, S100B se liga e sinaliza via RAGE, estimulando por meio da ativação de NF κ B uma resposta pró-inflamatória em várias células, como neurônios, macrófagos, linfócitos, neutrófilos e células epiteliais (BIANCHI *et al.*, 2011; VILLARREAL *et al.* 2011; REDDY *et al.*, 2006). No entanto, conforme comentamos anteriormente, não foi possível detectar IL-6, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4,

IL-10, GM-CSF, INF- γ e TNF- α no sobrenadante de CGEs expostas à TcdA e TcdB. Esse achado está de acordo com estudo anterior que demonstrou que incubação de CGEs com TcdB não resultava em aumento de citocinas (FETTUCCIARI *et al.*, 2017). No entanto, no presente estudo detectou-se elevada expressão de IL-6 por CGEs em resposta a TcdA e TcdB, sugerindo que TcdA e TcdB não induzem a hipersecreção de citocinas por CGEs em níveis detectáveis no sobrenadante, mas expressam RNAm e devem secretar essas citocinas em pequenas concentrações.

De acordo com o raciocínio anterior, demonstrou-se aqui que TcdA e TcdB ativaram NF κ B e aumentaram de forma significativa a expressão gênica de IL-6. A expressão gênica dessa citocina apresentou correlação positiva com a expressão de S100B em CGEs incubadas com TcdB. Estudo anterior de nosso grupo demonstrou que a inibição de S100B reduz tanto a expressão de IL-6 como a própria expressão de S100B em modelo experimental de mucosite intestinal induzido pelo agente antineoplásico 5-FU (COSTA *et al.*, 2019).

Contudo, o mecanismo de regulação desses mediadores em CGEs expostas a TcdA e TcdB era desconhecido, até o presente trabalho. Sendo assim, focamos em avaliar o papel de S100B na expressão do próprio S100B e IL-6, bem como na apoptose, induzida por TcdA e TcdB em CGEs.

Inicialmente, inibiu-se S100B por meio de pentamidina. Este inibe S100B por se ligar ao resíduo aromático na hélice 4 e na alça C-terminal de S100B (MARKOWITZ *et al.*, 2004). Uma molécula de pentamidina se liga ao sítio de ligação do peptídeo p53 (denominado sítio 1) e a segunda molécula a um sítio independente (denominado sítio 2), que é adjacente ao bem caracterizado sítio de ligação do Zn²⁺, formando um complexo pentamidina-Ca²⁺-S100B ou Pentamidina-Zn²⁺,Ca²⁺-S100B (CAVALIER *et al.*, 2016; CHARPENTIER *et al.*, 2008; MARKOWITZ *et al.*, 2004; WILDER *et al.*, 2005). Dessa forma, impedindo a interação de S100B com o receptor RAGE.

Os resultados desse trabalho demonstraram que a pentamidina reduziu a expressão de S100B e IL-6 induzida por TcdA, mas não por TcdB. De acordo com esses achados, demonstrou-se anteriormente que a pentamidina inibe a expressão de S100B na mucosite intestinal experimental induzida por 5-FU, doença de Alzheimer e colite induzida por DSS (COSTA *et al.*, 2019; CIRILLO *et al.*, 2015; ESPOSITO *et al.*, 2012). O fato da pentamidina aumentar os efeitos promovidos por TcdB em CGEs sugere que a própria TcdB estimula a expressão de S100B e IL-6 de forma independente de S100B.

S100B extracelular interage com seus receptores RAGE e TLR4 ativando uma cascata complexa de via de sinalização intracelular (VILLARREAL *et al.*, 2014; TURCO *et*

al., 2014). Considerando que o receptor RAGE é um dos principais receptores ativados por essa proteína, este estudo focou em estudar a cascata de sinalização relacionada a esse receptor.

Inicialmente demonstrou-se que TcdA e TcdB não alteram a expressão de RAGE em CGEs. No entanto, a inibição desse receptor por meio de FPSZM1, um antagonista de RAGE de alta afinidade, resultou em redução da expressão de S100B e IL-6 induzida por TcdA e TcdB, mostrando que RAGE está envolvido na regulação da expressão desses mediadores.

FPSZM1 inibe a interação de S100B com o receptor RAGE por se ligar ao domínio V do receptor RAGE (BONGARZONE *et al.*, 2017; MANIGRASSO *et al.*, 2016). A ativação desse receptor em fibroblastos resultou em suprarregulação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, via NFκB (NONAKA *et al.*, 2018). Da mesma forma, RAGE tem sido associado com a produção autócrina de S100B por astrócitos por meio de sua interação com o próprio S100B (PONATH *et al.*, 2007).

Entretanto, TcdB induz a expressão de S100B e IL-6 de forma dependente de RAGE mas independente de S100B, uma vez que pentamidina aumentou o efeito da TcdB na expressão de S100B e IL-6. O que leva a hipótese de que a TcdB atue como agonista do receptor RAGE.

A maioria dos efeitos da TcdA e da TcdB nas células eucarióticas está relacionada com a sua capacidade de causar inibição de Rho GTPases. No entanto, TcdB pode mediar seus efeitos ligando-se a receptores e de forma independente da inativação de Rho GTPases. Nossos dados sugerem que os efeitos das toxinas do *C. difficile* na expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e S100B) e morte celular em CGEs podem não ser dependentes de sua atividade Rho GTPase, uma vez que os efeitos de TcdA e TcdB foram modificados pelo bloqueio da interação S100B/RAGE.

Estudo prévio mostrou que a ativação do receptor RAGE em cardiomiócitos resulta na fosforilação de PI3K, levando a sua ativação (HOU *et al.*, 2014). Uma vez ativado, PI3K estimula a ativação de NFκB (TORREALBA *et al.*, 2019; XIE *et al.*, 2019; AHMAD *et al.*, 2013; CHOU *et al.*, 2005).

Sabendo-se que PI3K pode ser um sinalizador intracelular entre ativação de RAGE e NFκB, utilizou-se um inibidor de PI3K e demonstrou-se que LY294002 reduziu a expressão gênica de IL-6 em CGEs incubadas com TcdA e TcdB. Esse achado sugere que S100B/RAGE/PI3K/NFκB é a via de sinalização envolvida na suprarregulação de IL-6 induzida por TcdA e TcdB em CGEs.

IL-6 é uma citocina pleiotrópica considerada um preditor da severidade de ICD (YU *et al.*, 2017). Os efeitos de IL-6 variam entre promoção da sobrevivência celular e efeito pró-

inflamatório (CODELUPPI *et al.*, 2014; BRASIER, 2010). A regulação de IL-6 pela ativação de PI3K é relatada em células cancerígenas em astrócitos (CODELUPPI *et al.*, 2014; XIE *et al.*, 2004), e no presente estudo em CGEs expostas à TcdA e TcdB.

Por outro lado, o inibidor de PI3K aumentou a expressão gênica e a liberação de S100B em CGEs incubadas com TcdA e TcdB, indicando que sua expressão independe desta via.

Sendo assim, investigou-se se um outro fator de transcrição, diferente de NFκB, poderia estar envolvido na expressão de S100B em resposta às toxinas do *C. difficile*. Demonstrou-se então que as toxinas do *C. difficile* induzem ativação de STAT3 e que o inibidor de STAT3, galielalactona, reverte a suprarregulação de S100B induzida por TcdA e TcdB. Esses resultados sugerem que STAT3 está envolvido na expressão de S100B promovida por TcdA e TcdB em CGEs, de forma RAGE dependente e independente, respectivamente.

A ativação de STAT3 via interação S100/RAGE foi evidenciado por estudo prévio em micróglia (ZHANG *et al.*, 2011). Neste estudo, a via S100B/RAGE/STAT3 mediou à ativação de micróglia. Em adição, a fosforilação de STAT3 foi implicada na ativação de astrócitos (ANDERSON *et al.*, 2016; SHINOZAKI *et al.*, 2017; HERMANN *et al.*, 2008; OKADA *et al.*, 2006), assim como de CGEs desafiadas com as toxinas do *C. difficile* como evidenciado pelo presente estudo.

Adicionalmente, a suprarregulação de IL-6 induzida por TcdB, mas não por TcdA, também envolve STAT3. Deduz-se então que, de forma autócrina, S100B funciona como uma citocina pró-inflamatória em CGEs desafiadas com TcdA e TcdB por meio da ativação de uma cascata de vias de sinalização, como RAGE/PI3K/NFκB e RAGE/STAT3.

A inibição de PI3K aumentou a morte induzida por TcdA e TcdB em CGEs, sugerindo um efeito antiapoptótico de PI3K em CGEs. Essa função antiapoptótica de PI3K já foi demonstrada anteriormente *in vivo* e *in vitro* em cardiomiócitos, onde a inibição de PI3K resultou em morte celular por autofagia (ZHUNG *et al.*, 2011; MACHIDA *et al.*, 2005; HOU *et al.*, 2014).

Dados apresentados aqui, indicam que S100B, mas não IL-6, está envolvido com a morte de CGEs, uma vez que a regulação negativa de S100B causada pela inibição de STAT3, mas não a regulação negativa de IL-6 pela inibição de PI3K, diminuiu a morte de CGEs evocadas por TcdA e TcdB. Apesar da inibição de PI3K ter resultado em aumento da apoptose e suprarregulação de IL-6 em CGEs expostas às toxinas do *C. difficile* de forma concomitante, IL-6 não tem efeito direto na apoptose de CGEs (dados não mostrados).

Por outro lado, S100B induz apoptose em CGEs e reverte o efeito antiapoptótico de galielalactona em CGEs expostas à TcdA e TcdB, mostrando sua participação direta na apoptose dessas células. Em acordo com os achados evidenciados neste estudo, S100B induz morte em astrócitos por meio de uma via dependente de óxido nítrico (HU; Van ELDIK, 1996) e em miócito via RAGE/ ERK1/2 (TSOPORIS *et al.*, 2009) e em neurônio via NFκB (VILLARREAL *et al.*, 2011).

Os resultados do presente estudo apontam que a regulação positiva da S100B via ativação STAT3 é o mecanismo subjacente envolvido na apoptose induzida por TcdA e TcdB em CGEs. A morte de CGEs induzida por TcdB é mediada pela ativação de STAT3, mas ocorre de forma independente da interação S100B/RAGE. A ineficácia do antagonista de RAGE para bloquear a apoptose de CGEs induzida por TcdB sugere que esta toxina pode interagir diretamente com RAGE. No entanto, mais investigações são necessárias para elucidar a interação da TcdB com RAGE ou S100B.

STAT3, uma das sete proteínas STAT de mamíferos, é necessária para muitos processos biológicos, incluindo desenvolvimento embriogênico, função imunológica, homeostase celular, assim como diferenciação, proliferação, sobrevivência e apoptose (LEVY; DARNELL, 2002).

Citocinas (IL-6 e IL-10) e fatores de crescimento (VEGF), por meio de sua ligação ao seu respectivo receptor, podem promover a fosforilação de STAT3 por membros da família Janus de quinases (JAKs) ou Src quinases em um único resíduo de tirosina Tyr705 em STAT3, desencadeando sua translocação nuclear (BROMBERG, 2001). No núcleo, STAT3 fosforilada se liga a elementos de resposta ao DNA denominados seqüência ativada por interferon- γ (GAS) promovendo a transcrição de genes-alvo envolvidos na supressão de apoptose (BCL-xL, BCL-2, MCL-1 e BIRC5), proliferação (ciclina D1 e c- MYC), angiogênese (VEGF, ADM e ANG-PTL4) e migração (FGA, FGB, CTSB, SERPINE2) (TIMOFEEVA *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2007).

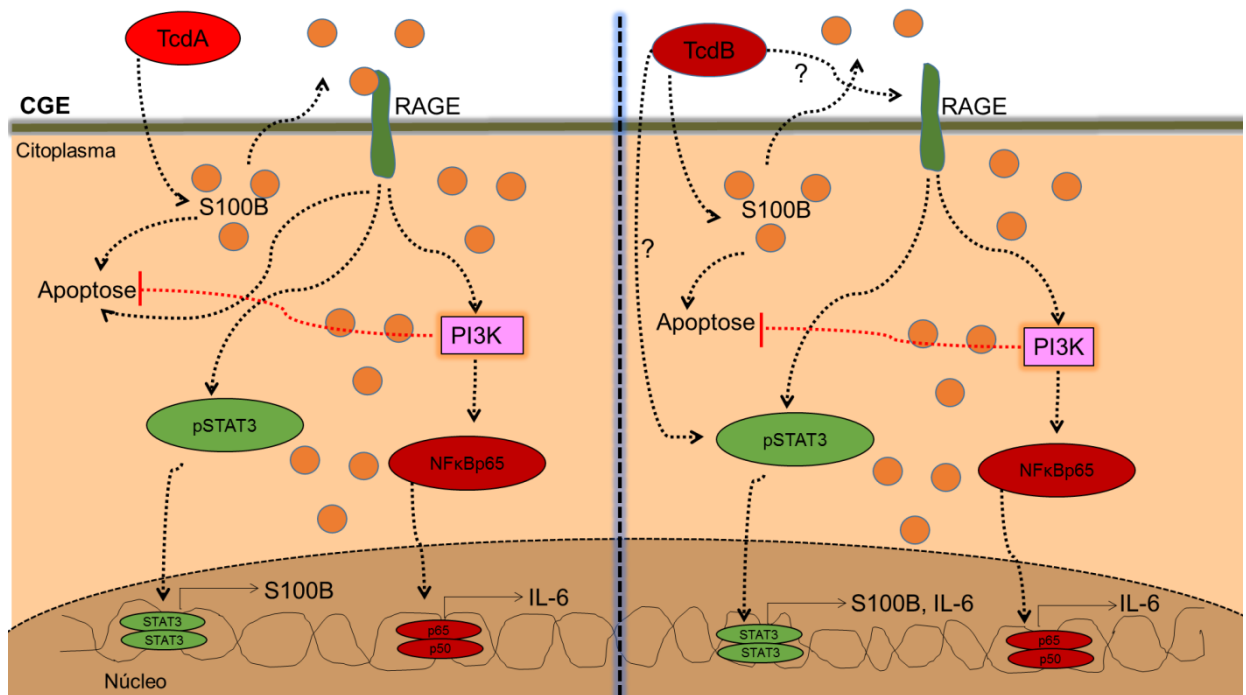
A inibição de STAT3 em células cancerígenas induz a apoptose reduzindo a expressão de survivina (AOKI *et al.*, 2003). Em contraste, mostramos que a galielalactona, um inibidor da STAT3, diminuiu a apoptose induzida por TcdA e TcdB em CGEs. Diferentemente de outras células, as CGEs produzem o mediador pró-apoptótico S100B, cuja transcrição gênica é promovida pelo STAT3 fosforilado, como mostrado em nossos achados.

Nosso estudo é o primeiro a mostrar o mecanismo pelo qual S100B e IL-6 são regulados em CGEs quando expostos a TcdA e TcdB. Evidenciou-se ainda importantes alvos terapêuticos, como a inibição de STAT3, que podem controlar a desregulação de CGEs

induzidas por TcdA e TcdB durante a ICD. Pesquisas adicionais sobre como a manipulação das vias de sinalização S100B/RAGE/PI3K/NF κ B ou S100B/RAGE/STAT3 influencia na gravidade da doença ou na inflamação em pacientes com ICD ou em modelos animais são necessárias.

Os dados do presente trabalho nos permitem sugerir um esquema do mecanismo de ação das TcdA e TcdB em CGEs. TcdA e TcdB aumentam a expressão de IL-6 e S100B, bem como apoptose, por meio da mesma via intracelular, no entanto o componente ativador da via foram distintos. A via de sinalização S100B/RAGE/PI3K/NF κ B está envolvida na suprarregulação de IL-6 induzida por TcdA e TcdB. A via de sinalização S100B/STAT3 está envolvida na apoptose e secreção de S100B induzida por TcdA, de forma dependente da interação de S100B/RAGE, enquanto que TcdB foi independente de RAGE (figura 54).

Figura 54 – Modelo esquemático do mecanismo de TcdA e TcdB em CGEs



Fonte: Elaborado pela autora. TcdA estimula a expressão e liberação de S100B em células gliais entéricas (CGEs), que por sua vez se liga ao receptor RAGE, estimulando apoptose, expressão do próprio S100B e IL-6 via ativação de STAT3 e PI3K/NFκB, respectivamente. TcdB estimula, via ativação de STAT3, expressão de IL-6 e liberação e expressão de S100B, que por sua vez induz apoptose em CGEs. TcdB também estimula a expressão de IL-6 por meio de RAGE/PI3K/NFκB. Em adição, PI3K é um inibidor da apoptose em CGEs.

7 CONCLUSÕES

Com os achados evidenciados pelo presente estudo, conclui-se que:

- ICD aumenta os níveis de S100B em humanos e em camundongos;
- TcdA aumenta a expressão de fatores gliais entéricos (S100B, GFAP e GDNF no íleo de camundongos);
- TcdA e TcdB diminuem a viabilidade, induzem apoptose e alteram a morfologia de CGEs. Em adição ambas as toxinas induzem secreção de S100B, suprarregulam S100B e IL-6, além de induzirem ativação de NF κ B e STAT3;
- A via de sinalização S100B/RAGE/PI3K/NK κ B está envolvida na suprarregulação de IL-6 induzida por TcdA e TcdB.
- A via de sinalização S100B/STAT3 está envolvida na apoptose e secreção de S100B induzidas por TcdA, de forma RAGE dependente, e TcdB, de forma RAGE independente, em CGEs.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, A. *et al.* Targeted regulation of PI3K/Akt/mTOR/NF- κ B signaling by indole compounds and their derivatives: mechanistic details and biological implications for cancer therapy. **Anticancer Agents Med. Chem.**, v. 13, n. 7, p. 1002-1013, 2013.
- ALCANTARA, C. *et al.* Role of inducible cyclooxygenase and prostaglandins in *Clostridium difficile* toxin A-induced secretion and inflammation in an animal model. **J. Infect. Dis.**, v. 184, n. 5, p. 648-52, Sep 2001.
- ALCANTARA, C. S. *et al.* Angiotensin II subtype 1 receptor blockade inhibits *Clostridium difficile* toxin A-induced intestinal secretion in a rabbit model. **J. Infect. Dis.**, v. 191, n. 12, p. 2090-6, Jun 2005.
- ALLEN, M. *et al.* HuD promotes BDNF expression in brain neurons via selective stabilization of the BDNF long 3'UTR mRNA. **Plos ONE**, v. 8, p. 55718e, 2013.
- ANDERSON, K. D. *et al.* Overexpression of HuD accelerates neurite outgrowth and increases GAP-43 mRNA expression in cortical neurons and retinoic acid-induced embryonic stem cells *in vitro*. **Exp. Neurol.**, v. 168, p. 250-258, 2001.
- ANDERSON, M. A. *et al.* Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. **Nature**, v. 532, p. 195-200, 2016.
- AOKI, Y.; FELDMAN, G. M.; TOSATO, G. Inhibition of STAT3 signaling induces apoptosis and decreases surviving expression in primary effusion lymphoma. **Blood**, v. 101, p. 1535-42, 2003.
- AUSTERMANN, J.; SPIEKERMANN, C.; ROTH, J. S100 proteins in rheumatic diseases. **Nature Reviews**, v. 14, p. 528-541, 2018.
- AZNAR, S.; LACAL, J. C. Searching new targets for anticancer drug design: the families of Ras and Rho GTPases and their effectors. **Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.**, v. 67, p. 193-234, 2001.
- BACH-NGOHO, K. *et al.* Enteric glia modulate epithelial cell proliferation and differentiation through 15-deoxy-12, 14-prostaglandin J2. **J. Physiol.**, v. 588, p. 2533-2544, 2010.
- BALASSIANO, I. T. *et al.* Characterization of *Clostridium difficile* strains isolated from immunosuppressed inpatients in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Anaerobe**, v. 15, p. 61-64, 2009.
- BARCLAY, A. N. Membrane proteins with immunoglobulin-like domains –a master superfamily of interaction molecules. **Semin. Immunol.**, v. 15, p. 215-223, 2003.
- BARLOW, A.; DE GRAAFF, E.; PACHNIS, V. Enteric nervous system progenitors are coordinately controlled by the G protein-coupled receptor EDNRB and the receptor tyrosine kinase RET. **Neuron**, v. 40, p. 905-916, 2003.

- BARRETO, A. R. *et al.* Fucoidin prevents *Clostridium difficile* toxin-A-induced ileal enteritis in mice. **Dig. Dis. Sci.**, v. 53, p. 990-6, 2008.
- BARTLETT, J. G. Bezlotoxumab—a new agent for *Clostridium difficile* infection. **N. Engl. J. Med.**, v. 376, p. 381–382, 2017.
- BASSOTTI, G. *et al.* Gastrointestinal motility disorders in inflammation bowel diseases. **World J. Gastroenterol**, v. 20, p. 37-44, 2014.
- BAUER, M. P. *et al.* *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. **Lancet**, v. 377, n. 9759, p. 63-73, Jan 2011.
- BAUMAN, B. D. *et al.* Enteric glia-mediated enhancement of intestinal barrier integrity is compromised by morphine. **Journal of Surgical Research**, v. 219, p. 214-221, 2017.
- BELKIND-GERSON, J. *et al.* Colitis neuronal differentiation of Sox2+ and PLP1+ enteric cells. **Sci. Rep.**, v.7, p. 2525, 2017.
- BELLA, S. D. *et al.* *Clostridium difficile* toxins A and B: Insights into pathogenic properties and extraintestinal effects. **Toxins**, v. 8, n. 5, 2016.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquimica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara (2008). 1059p.
- BERNARDINI, N. *et al.* Immunohistochemical analysis of myenteric ganglia and interstitial cells of Cajal in ulcerative colitis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 16, n. 2, p. 318–327, 2012.
- BERTHELOOT, D.; LATZ, E. HMGB1, IL-1 α , IL-33 and S100 proteins: dual-functions alarmins. **Cell. Mol. Immunol.**, v. 14, p. 43-64, 2017.
- BEST, E. L. *et al.* The potential for airborne dispersal of *Clostridium difficile* from symptomatic patients. **Clin. Infect. Dis.**, v. 10, p. 1450-1457, 2010.
- BIANCHI, R. *et al.* S100B protein stimulates microglia migration via RAGE-dependent up-regulation of chemokine expression and release. **J. Biol. Chem.**, v. 286, p. 7214-26, 2011.
- BISCHOFF, S. C. *et al.* Role of serotonin in intestinal inflammation: knockout of serotonin reuptake transporter exacerbates 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid colitis in mice. **Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.**, v. 296, p. 685-695, 2009.
- BOESMANS, W. *et al.* Neurotransmitters involved in fast excitatory neurotransmission directly activate enteric glial cells. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 35, p. 151-160e, 2013.
- BOESMANS W. *et al.* The astrocyte marker Aldh1L1 does not reliably label enteric glia cells. **Neurosci. Lett.**, v. 566, p. 102-105, 2014.

BONDURAND, N. *et al.* Maintenance of mammalian enteric nervous system progenitors by SOX10 and endothelin 3 signalling. **Development.**, v. 133, p. 2075–2086, 2006.

BONDURAND, N. *et al.* Neuron and glia generating progenitors of the mammalian enteric nervous system isolated from foetal and postnatal gut cultures. **Development.**, v. 130, p. 6387–400, 2003.

BONGARZONE, S. *et al.* Targeting the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE): a medicinal chemistry perspective. **J. Med. Chem.**, v. 60, n. 17, p. 7213-7232, 2017.

BODY-MALAPEL, M. *et al.* The RAGE signaling pathway is involved in intestinal inflammation and represents a promising therapeutic target for inflammatory bowel diseases. **Mucosal Immunology**, v. 12, p. 468-478, 2018.

BRADLEY, J. S.; PARR, E. J.; SHARKEY, K. A. Effects of inflammation on cell proliferation in the myenteric plexus of the guinea-pig ileum. **Cell Tissue Res.**, v. 289, p. 455–461, 1997.

BRASIER, A. R. The nuclear factor- κ B-interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation. **Cardiovascular Res.**, v. 86, n. 2, p. 211-218, 2010.

BRAUN, V. *et al.* Definition of the single integration site of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile*. **Gene**, v. 181, n. 1-2, p. 29-38, Nov 1996.

BRESNICK, A. R. S100 proteins as therapeutic targets. **Biophys. Rev.**, v. 10, n. 6, p. 1617-1629, 2018.

BREY, E. M. *et al.* Automated selection of DAB-labeled tissue for immunohistochemical quantification. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 51, n. 5, p. 575-84, May 2003.

BRITO, G. A. *et al.* *Clostridium difficile* toxin A alters *in vitro*-adherent neutrophil morphology and function. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185, p. 1297-1306, 2002a.

BRITO, G. A. *et al.* *Clostridium difficile* toxin A induces intestinal epithelial cell apoptosis and damage: role of Gln and Ala-Gln in toxin A effects. **Dig. Dis. Sci.**, v. 50, n. 7, p. 1271-8, Jul 2005.

BRITO, G. A. *et al.* Mechanism of *Clostridium difficile* toxin A-induced apoptosis in T84 cells. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, p. 1438-1447, 2002b.

BROMBERG, J. F. Activation on STAT proteins and growth control. **Bioessays**, v. 23, p. 161-9, 2001.

BROWN, I. A. M. *et al.* Enteric glia mediate neuron death in colitis through purinergic pathways that require connexin-43 and nitric oxide. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, 2015 (article in press).

BULUT, K. *et al.* Glucagon-like peptide 2 improves intestinal wound healing through induction of epithelial cell migration *in vitro*-evidence for a TGF-beta- mediated effect. **Regul. Pept.**, v. 121, p. 137-143, 2004.

BUONOMO, E. L. *et al.* Role of interleukin 23 signaling in *Clostridium difficile* colitis. **J. Infect. Dis.**, v. 208, p. 917–920, 2013

BUONOMO, E. L.; PETRI W. A. The microbiota and immune response during *Clostridium difficile* infection. **Anaerobe**, v. 41, p. 79-84, 2016.

BURDA, J. E.; SOFRONIEW, M. V. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. **Neuron**, v. 81, p. 229–248, 2014.

BUSH, T. G. *et al.* Fulminant jejuno-ileitis induced by ablation of enteric glia in adult transgenic mice. **Gastroenterology**, v. 210, p. A186-A187, 2001.

CALDERÓN, G. M. *et al.* Effects of toxin A from *Clostridium difficile* on mast cell activation and survival. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 6, p. 2755-61, Jun 1998.

CARBONE, S. E. *et al.* Electrophysiological and morphological changes in colonic myenteric neurons from chemotherapy-treated patients: a pilot study. **Neurogastroenterol. Motil.**, v. 28, n. 7, p. 975-84, Jul 2016.

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, n. 1, p. 81-7, Jan 2006.

CARTER, G. P. *et al.* Binary toxin production in *Clostridium difficile* is regulated by CdtR, a LytTR family response regulator. **J. Bacteriol.**, v. 189, n. 20, p. 7290-301, Oct 2007.

CARTER, G. P.; ROOD, J. I.; LYRAS, D. The role of toxin A and toxin B in the virulence of *Clostridium difficile*. **Trends in Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 21–29, 2012.

CASTAGLIUOLO, I. *et al.* Neuronal involvement in the intestinal effects of *Clostridium difficile* toxin A and *Vibrio* enterotoxin in rat ileum. **Gastroenterology**, v. 107, p. 657-665, 1994.

CASTAGLIUOLO, I. *et al.* Neurotensin is a proinflammatory neuropeptide in colonic inflammation. **J. Clin. Invest.**, v. 103, n. 6, p. 843-9, Mar 1999.

CAVALIER, M. C. *et al.* Small molecule inhibitors of Ca²⁺-S100B reveal two protein conformations. **J. Med. Chem.**, v. 28, n. 2, p. 592-608, 2016.

CELIKBILEK, A. *et al.* The serum S100B level as a biomarker of enterogial activation in patients with Ulcerative Colitis. **International Journal of Inflammation**, v. 2014, p. 1-6.

CHARPENTIER, T. H. *et al.* Divalent metal ion complexes of S100 β in the absence and presence of pentamidine. **J. Mol. Biol.**, v. 382, p. 56-73, 2008.

CHEADLE, G. A. *et al.* Enteric glia cells attenuate cytomix-induced intestinal epithelial barrier breakdown. **Plos one**, v. 8, n. 7, p. 1-11, 2013.

CHEN, P. *et al.* Structural basis for recognition of frizzled proteins by *Clostridium difficile* toxin B. **Science**, v. 360, p. 664-669, 2018.

CHEN, R. *et al.* Whole genome sequences of three Clade 3 *Clostridium difficile* strains carrying binary toxin genes in China. **Scientific reports**, v. 7, n. 43555, 2017.

CHEN, Y. *et al.* Molecular characteristics of *Clostridium difficile* strains from patients with a first recurrence more than 8 weeks after the primary infection. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, Dec 2015.

CHOU, C. *et al.* Up-regulation of interleukin-6 in human ovarian cancer cell via a Gi/PI3K-Akt/NF- κ B pathway by lysophosphatidic acid, an ovarian cancer-activating factor. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 1, p. 45-52, 2005.

CHOUDHURY, K.; LEIBOWITZ, M. J. Pentamidine-induced alteration in restriction endonuclease cleavage of plasmid DNA. **J. Biomol. Struct. Dyn.**, v. 21, n. 1, p. 127-134, 2003.

CHUMBLER, N. M., *et al.* Crystal structure of *Clostridium difficile* toxin A. **Nat. Microbiol.**, v. 1, n. 15002, 2016.

CICCARELLI, R. *et al.* Activation of A1 adenosine or mGlu3 metabotropic glutamate receptors enhances the release of nerve growth factor and S100 β protein from cultured astrocytes. **Glia**, v. 27, p. 275-281, 1999.

CIRILLO, C. *et al.* Increased mucosal nitric oxide production in ulcerative colitis is mediated in part by the enteroglia-derived S100B protein. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 21, n. 11, p. 1209-1218, 2009.

CIRILLO, C. *et al.* S100 β inhibitor pentamidine attenuates reactive gliosis and reduces neuronal loss in a mouse model of Alzheimer's disease. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-8, 2015.

CIRILLO, C. *et al.* Proinflammatory stimuli activates human-derived enteroglia cells and induces autocrine nitric oxide production. **Neurogastroenterol. Motil.**, v. 23, n. 9, p. 372-382, 2011.

CODELUPPI, S. *et al.* Interleukin-6 secretion by astrocytes is dynamically regulated by PI3K-mTOR-calcium signaling. **Plos One**, v. 9, e92649, 2014.

COSTA, D. V. S. **Papel da via S100 β /RAGE/NF κ B na patogênese da mucosite intestinal experimental por 5-fluorouracil: regulação de células gliais e de neurônios entéricos.**

2016. 155 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

COSTA, D. V. S. *et al.* 5-Fluorouracil induces enteric neuron death and glial activation during intestinal mucositis via S100B-RAGE-NFκB-dependent pathway. **Scientific Reports**, v. 9, n. 665, 2019.

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, Aug 2016.

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

COSTA, C. L. *et al.* Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* infection in a brazilian cancer hospital. **Anaerobe**, v. 48, p. 232-236, 2017.

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

COWARDIN, C. A. *et al.* The binary toxin CDT enhances *Clostridium difficile* virulence by suppressing protective colonic eosinophilia. **Nature Microbiology**, v. 1, 2016.

D'AURIA, K. M. *et al.* High temporal resolution of glucosyltransferase dependent and independent effects of *Clostridium difficile* toxins across multiple cell types. **BMC Microbiol.**, v. 15, p. 7, Feb 2015.

DAVIES, K. A. *et al.* Underdiagnosis of *Clostridium difficile* across Europe: the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalized patients with diarrhea (EUCLID). **Lancet Infect. Dis.**, v. 14, p. 1208-19, 2014.

DESMET, A. S.; CIRILLO, C.; VANDEN BERGHE, P. Distinct subcellular localization of the neuronal marker HuC/D reveals hypoxia-induced damage in enteric neurons. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 16, p. 1131-1143, 2014.

DINGLE, K. E. *et al.* Evolutionary history of the *Clostridium difficile* pathogenicity locus. **Genome Biol. Evol.**, v. 6, n. 1, p. 36-52, Jan 2014.

DOLGIN, E. 'Game changer' antibiotic and others in works for superbug. **Nat. Med.**, v. 17, n. 1, p. 10, Jan 2011.

DONATO, R. *et al.* Functions of S100 proteins. **Curr. Mol. Med.**, v. 13, p. 24-57, 2013.

DONATO, R. *et al.* S100β's double life: intracellular regulator and extracellular signal. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1773, p. 1008-1022, 2009.

DONATO, R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. **Microsc. Res. Tech.**, v. 60, p. 540-551, 2003.

DRAKE, S. *et al.* Pentamidine isethionate in the treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia. **Clinical Pharmacy**, v. 4, n. 5, p. 507-516, 1985.

DRUCKENBROD, N. R.; EPSTEIN, M. L. The pattern of neural crest advance in the cecum and colon. **Dev. Biol.**, v. 287, p. 125–133, 2005.

EDWARDS, M. M.; ROBINSON, S. R. TNF- α affects the expression of GFAP and S100 β : implications for Alzheimer's disease. **J. Neural. Transm.**, v. 113, p. 1709-1715, 2006.

ESPOSITO, G. *et al.* Enteric glial-derived S100B protein stimulates nitric oxide production in celiac disease. **Gastroenterology**, v. 133, p. 918-25, 2007.

ESPOSITO, G. *et al.* The antiprotozoal drug pentamidine ameliorates experimentally induced acute colitis in mice. **Journal of Neuroinflammation**, v. 9, n. 277, p. 1-12, 2012.

EZE, P. *et al.* Risk factors for *Clostridium difficile* infectious- an overview of the evidence base and challenges in data synthesis. **Journal of Global Health**, v. 7, n. 1, 2017.

FARLIE, P. G.; MCKEOWN, S. J.; NEWGREEN, D. F. The neural crest: basic biology and clinical relationships in the craniofacial and enteric nervous systems. **Birth Defects Res C Embryo Today**, v. 72, p. 173–189, 2004.

FETTUCCIARI, K. *et al.* *Clostridium difficile* toxin B induces senescence in enteric glial cells: a potential new mechanism of *Clostridium difficile* pathogenesis. **BBA Mol. Cell Research**, v. 1865, p. 1945-1958, 2018.

FETTUCCIARI, K. *et al.* Enteric glia cells are susceptible to *Clostridium difficile* toxin B. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 74, p. 1527-1551, 2017.

FRANCESCHI, R. C. *et al.* Enteric glial reactivity to systemic LPS administration: changes in GFAP and S100B protein. **Neuroscience Research**, v. 119, p. 15-23, 2017.

FUJITANI, S.; GEORGE, W. L.; MURTHY, A. R. Comparison of clinical severity score indices for *Clostridium difficile* infection. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v. 32, p. 220-228, 2011.

FU, M., *et al.* HOXB5 expression is spatially and temporarily regulated in human embryonic gut during neural crest cell colonization and differentiation of enteric neuroblasts. **Dev. Dyn.**, v. 228, p. 1–10, 2003.

FURNESS, J. B. The enteric nervous system and neurogastroenterology. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, 2012.

GABELLA, G. Size of neurons and glial cells in the intramural ganglia of the hypertrophic intestine of the guinea-pig. **J. Neurocytol.**, v. 13, p. 73–84, 1984.

GATZA, C. E. *et al.* Type III TGF- β receptor enhances colon cancer cell migration and anchorage-independent growth. **Neoplasia**, v. 13, p. 758-770, 2011.

GENTIL B. J. *et al.* The giant protein AHNAK is a specific target for the calcium- and zinc-binding S100B protein: potential implications for Ca²⁺ homeostasis regulation by S100B. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 26, p. 23253–23261, 2001.

GERHARD, R. *et al.* Glucosylation of Rho GTPases by *Clostridium difficile* toxin A triggers apoptosis in intestinal epithelial cells. **J. Med. Microbiol.**, v. 57, n. Pt 6, p. 765-70, Jun 2008.

GOVIND, R.; DUPUY, B. Secretion of *Clostridium difficile* toxins A and B requires the holin-like protein TcdE. **PLoS Pathog.**, v. 8, n. 6, p. e1002727, 2012.

GRUBISIC, V. *et al.* Enteric glia regulate gut motility in health and disease. **Brain Research Bulletin**, v. 136, p. 109-117, 2018.

GRUBISIC, V.; GULBRANSEN, BD. Enteric glia: the most alimentary of all glia. **J. Physiol.**, v. 595, n. 2, p. 557-70, 2017.

GULBRANSEN, B. D. **Enteric glia**. Morgan & Claypool publishers, San Rafael. 2014.

GULBRANSEN, B. D. *et al.* Activation of neuronal P2X7 receptor-pannexin-1 mediates death of enteric neurons during colitis. **Nature Medicine**, v. 18, n. 4, p. 600-605, 2012.

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

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

HANSEN, M. B. The enteric nervous system I: organization and classification. **Pharmacology & toxicology**, v. 92, p. 105-113, 2003.

HARTMAN, K. G. *et al.* The evolution of S100B inhibitors for the treatment of malignant melanoma. **Future Med. Chem.**, v. 5, n. 1, p. 97-109, 2003.

HEANUE, T. A.; PACHNIS, V. Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies. **Nature Review Neuroscience**, v. 8, p. 466-479, 2007.

HEIZMANN, C. W.; FRITZ, G.; SCHAFER, B. W. S100 proteins: structure, functions and pathology. **Front. Biosci.**, v. 7, p. 1356-1368d, 2002.

HERMANN, J. E. *et al.* STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury. **J. Neurosci.**, v. 28, p. 7231-7243, 2008.

HINMAN, M. N.; LOU, H. Diverse molecular functions of Hu proteins. **Cell. Mol. Life. Sci.**, v. 65, p. 3168-3181, 2008.

HOFF, S. S.; ZELLER, F. F.; WEYHERN VON, C. W. H. C.; WEGNER, M. M.; SCHEMANN, M. M.; MICHEL, K. K.; RÜHL, A. A. Quantitative assessment of glial cells in the human and guinea pig enteric nervous system with an anti-Sox8/9/10 antibody. **J. Comp. Neurol.**, v. 509, p. 356–371, 2008.

HONG, W. *et al.* Higher plasma S100B concentrations in Schizophrenia patients, and dependently associated with inflammatory markers. **Scientific Reports**, v, 6, 2016.

HOPKINS, R. J.; WILSON, R. B. Treatment of recurrence *Clostridium difficile* colitis: a narrative review. **Gastroenterology report**, v. 6, n. 1, p. 21-28, 2018.

HOU, X. *et al.* Advanced glycation endproducts trigger autophagy in cardiomyocyte via RAGE/PI3K/AKT/mTOR pathway. **Cardiovascular Diabetology**, v.13, n. 78, 2014.

HSIEH, H. *et al.* S100 protein translocation in response to extracellular S100 is mediated by receptor for advanced glycation endproducts in human endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 316, p. 949-959, 2004.

HUEBENER, P. *et al.* The HMGB1/RAGE axis triggers neutrophil -mediated injury amplification following necrosis. **J. Clin. Invest.**, v. 125, n. 2, p. 539-550, 2015.

HUNT, J. J. *et al.* Amino acid differences in the 1753-to-1851region of TcdB influence variations in TcdB1 and TcdB2 cell entry. **mSphere**, v. 2, 2017.

IMREH, G. *et al.* Chromosomal breaks during mitotic catastrophe trigger gammaH2AX-ATM-p53- mediated apoptosis. **J. Cell Sci.**, v. 124, p. 2951-2963, 2011.

INUI, M. *et al.* Protective roles of CX3CR1-mediated signals in toxin A-induced enteritis through the induction of heme oxygenase-1 expression. **J. Immunol.**, v. 186, n. 1, p. 423-31, Jan 2011.

ISHIDA, Y. *et al.* Essential involvement of IFN-gamma in *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis. **J. Immunol.**, v. 172, n. 5, p. 3018-25, Mar 2004.

JAFFE, A. B.; HALL, A. Rho GTPases: biochemistry and biology. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 21, p. 247-69, 2005.

JOHAL, S. S. *et al.* Colonic IgA producing cells and macrophages are recurrent and non-recurrent *Clostridium difficile* associated diarrhea. **J. Clin. Pathol.**, v. 57, p. 973-9, 2004.

JOHNSON, S. Recurrent *Clostridium difficile* infection: causality and therapeutic approaches. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 33 Suppl 1, p. S33-6, Mar 2009.

JUNG, H. J. *et al.* Pentamidine reduces expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in DU145 and MDA-MB-231 cancer cells. **Cancer lett.**, v. 303, n. 1, p. 39-46, 2011.

JUNQUEIRA, A. F. *et al.* Adenosine deaminase inhibition prevents *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis in mice. **Infect. Immun.**, v. 79, n. 2, p. 653-662, Feb 2011.

KABOURIDIS, P. S. *et al.* Microbiota controls the homeostasis of glial cells in the gut lamina propria. **Neuron**, v. 85, p. 289-95, 2015.

KAPUR, R. P. Colonization of the murine hindgut by sacral crest-derived neural precursors: experimental support for an evolutionarily conserved model. **Dev. Biol.**, v. 227, p. 146-155, 2000.

KEATES, A. C. *et al.* GGRP upregulation in dorsal root ganglia and ileal mucosa during *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis. **Am. J. Physiol.**, v. 274, p. 196-202, 1998.

KELLY, C. P. Can we identify patients at high risk of recurrent *Clostridium difficile* infection? **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 18 Suppl 6, p. 21-7, Dec 2012.

KELLY, C. P.; KYNE, L. The host immune response to *Clostridium difficile*. **J. Med. Microbiol.**, v. 60, p. 1070-9, 2011.

KERMARREC, L. *et al.* Enteric glial cells have specific immunosuppressive properties. **Journal of Neuroimmunology**, v. 295, p. 79-83, 2016.

KIBA, T. Relationships between the autonomic nervous system, humoral factors and immune functions in the intestine. **Digestion**, v. 4, p. 215-27, 2006.

KIERDORF, K.; FRITZ, G. RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 94, p. 55-68, 2013.

KIM, H. *et al.* Inflammation and apoptosis in *Clostridium difficile* enteritis is mediated by PGE2 up-regulation of Fas ligand. **Gastroenterology**, v. 133, n. 3, p. 875-86, Sep 2007.

KOCH, M. *et al.* Structural basis for ligand recognition and activation of RAGE. **Structure**, v. 18, n. 10, p. 1342-1352, 2010.

KRETSINGER, R. H.; NOCKOLDS, C. E. Carp muscle calcium-binding protein. II. structure determination and general description. **J. Biol. Chem.** v. 248, n. 9, p. 3313-3326, 1973.

KYNE, L.; KELLY, C. P. Recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. **Gut**, v. 49, n. 1, p. 152-3, Jul 2001.

JAFFREY, S. R. *et al.* Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. **Nat. Cell. Biol.**, v. 3, p. 193-197, 2001.

JANOIR, C. Virulence factors of *Clostridium difficile* and their role during infection. **Anaerobe**, v. 37, p. 13-24, 2016.

KABOURIDIS, P. S. *et al.* Microbiota controls the homeostasis of glial cells in the gut lamina propria. **Neuron**, v. 85, p. 289-295, 2015.

KLIGMAN, D.; HILT, D. C. The S100 protein family. **Trends Biochem. Sci.**, v. 13, n. 11, p. 437-443, 1988.

KYNE, L. *et al.* Asymptomatic carriage of *Clostridium difficile* and serum levels of IgG antibody against toxin A. **N. Engl. J. Med.**, v. 342, p. 390-397, 2000.

LaFRANCE, M. E. *et al.* Identification of an epithelial cell receptor responsible for *Clostridium difficile* TcdB-induced cytotoxicity. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 112, p. 7073–7078, 2015.

LANGNESS, S. *et al.* Enteric glia cells are critical to limiting the intestinal inflammatory response after injury. **Am. J. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 312, 2017.

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

LARENTIS, D. Z. *et al.* Outcomes and riskfactors associated with *Clostridium difficile* diarrhea in hospitalized adult patients. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2015, n. 346341, 2015.

LECLERC, E. *et al.* Binding of S100 proteins to RAGE: an update. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1793, p. 993-1007, 2009.

LE DOUARIN, N. M. *et al.* Neural crest cell plasticity and its limits. **Development**, v. 131, p. 4637-4650.

LESSA, F. C.; GOULD, C. V.; MCDONALD, L. C. Current status of *Clostridium difficile* infection epidemiology. **Clin. Infect. Dis.**, v. 55 Suppl 2, p. S65-70, Aug 2012.

LESSA, F. C. *et al.* Burden of *Clostridium difficile* infection in the United States. **N. Engl. J. Med.**, v. 372, p. 2369-70, 2015.

LEVY D. E.; DARNELL J. E. States: transcriptional control and biologic impact. **Nar Rev. Cell. Biol.**, v. 3, p. 651-62, 2002.

LI, Y. *et al.* Adenosine A2A receptor activation reduces recurrence and mortality from *Clostridium difficile* infection in mice following vancomycin treatment. **BMC Infect. Dis.**, v. 12, p. 342, Dec 2012.

LIN, Z.; SANDGREN, K.; EKBLAD, E. Increased expression of vasoactive intestinal polypeptide in cultured myenteric neurons from adult rat small intestine. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 107, p. 9-19, 2003.

LINEVSKY, J. K. *et al.* IL-8 release and neutrophil activation by *Clostridium difficile* toxin-exposed human monocytes. **Am. J. Physiol.**, v. 273, n. 6 Pt 1, p. G1333-40, Dec 1997.

LIU, T. *et al.* NF- κ B signaling in inflammation. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 2, 2017.

LIU, Y. *et al.* The ATP-P2X7 signaling axis is an essential sentinel for intracellular *Clostridium difficile* pathogen-induced inflammasome activation. **Front Cell. Infect. Microbiol.**, v. 8, 2018.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

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.

LOPES-CANÇADO, G. G. *et al.* Clinical epidemiology of *Clostridium difficile* infection among hospitalized patients with antibiotic-associated diarrhea in a university hospital of Brazil. **Anaerobe**, v. 54, p. 65-71, 2018.

LÓPES-URENA, D. *et al.* Predominance and high antibiotic resistance of the emerging *Clostridium difficile* genotypes NAPCR1 and NAP9 in a Costa Rican hospital over a 2-year period without outbreaks. **Emerging Microbes and Infectious**, v. 5, e42, 2016.

LYON, S. A. *et al.* CdtR regulates TcdA and TcdB production in *Clostridium difficile*. **Plos Pathogens**, v. 12, n. 7, e1005758, 2016.

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

MACHIDA, K. *et al.* Activation of PI3K-AKT pathway mediates antiapoptotic effects of β -adrenergic agonist in airway eosinophils. **Lung Cell. Mol. Physiol.**, v. 288, p. L860-L867, 2005.

MADAM, R.; PETRI, W. A. Immune responses to *Clostridium difficile* infection. **Trends Mol. Med.**, v. 18, p. 658-66, 2012.

MANI, N.; DUPUY, B. Regulation of toxin synthesis in *Clostridium difficile* by an alternative RNA polymerase sigma factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 98, n. 10, p. 5844-9, May 2001.

MANIGRASSO, M. B. *et al.* Small molecule inhibition of ligand-stimulated RAGE-DIAPH1 signal transduction. **Scientific Reports**, v. 6, n. 24450, 2016.

MANTYH, C. R. *et al.* Substance P activation of enteric neurons in response to intraluminal *Clostridium difficile* toxin A in the rat ileum. **Gastroenterology**, v. 111, n. 5, p. 1272-80, Nov 1996.

MARKOWITZ, J. *et al.* Identification and characterization of small molecule inhibitors of the calcium -dependent S100 β -p53 tumor suppressor interaction. **J. Med. Chem.**, v. 47, p. 5085-5093, 2004.

MARTIN, J. S.; MONAGHAN, T. M.; WILCOX, M. H. *Clostridium difficile* infection: epidemiology, diagnosis and understanding transmission. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 13, n. 4, p. 206-16, Apr 2016.

MATAMOUROS, S.; ENGLAND, P.; DUPUY, B. *Clostridium difficile* toxin expression is inhibited by the novel regulator TcdC. **Mol. Microbiol.**, v. 64, n. 5, p. 1274-88, Jun 2007.

MCCLAIN, J. L.; FRIED, D. E. ; GULBRANSEN, B. D. Agonist-evoked Ca²⁺ signaling in enteric glia drives neural programs that regulate intestinal motility in mice. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, v. 1, n. 6, 2015.

MCCLAIN, J. L.; GULBRANSEN, B. D. The acute inhibition of enteric glial metabolism with fluoroacetate alters calcium signaling, hemichannel function and the expression of key proteins. **J. Neurophysiol.**, v. 117, n. 1, p. 365-375, 2017.

MCFARLAND, L. V.; ELMER, G. W.; SURAWICZ, C. M. Breaking the cycle: treatment strategies for 163 cases of recurrent *Clostridium difficile* disease. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 97, n. 7, p. 1769-75, Jul 2002.

MCVEY, D. C.; VIGNA, S. R. The capsaicin VR1 receptor mediates substance P release in toxin A-induced enteritis in rats. **Peptides**, v. 22, n. 9, p. 1439-46, Sep 2001.

MELO FILHO, A. A. *et al.* Role of tumor necrosis factor and nitric oxide in the cytotoxic effects of *Clostridium difficile* toxin A and toxin B on macrophages. **Toxicon**, v. 35, n. 5, p. 743-52, May 1997.

MÉRIAN, J. *et al.* Development of a liposome formulation for improved biodistribution and tumor accumulation of pentamidine for oncology applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 488, p. 154-164, 2015.

MESQUITA, A. M. R. C. *et al.* Diarréia nasocomial e outras infecções adquiridas em hospital universitário. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 10, 2011.

MEYER, G. K. *et al.* *Clostridium difficile* toxins A and B directly stimulate human mast cells. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 8, p. 3868-76, Aug 2007.

MOORE, B. W. A soluble protein characteristic of the nervous system. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 19, n. 6, p. 739-744, 1965.

MOORE, J. H. *et al.* Correction: Defined Nutrient Diets Alter Susceptibility to *Clostridium difficile* Associated Disease in a Murine Model. **PLoS One**, v. 10, n. 9, p. e0137037, 2015.

NA, X. *et al.* *Clostridium difficile* toxin B activates the EGF receptor and the ERK/MAP kinase pathway in human colonocytes. **Gastroenterology**, v. 128, n. 4, p. 1002-11, Apr 2005.

NAGAHAMA, M. *et al.* L-arginine immunoreactive enteric glial cells in the enteric nervous system of rat ileum. **Biological signals and receptors**, v. 10, n. 5, p. 336-340, 2001.

NAKAGAWA, T. *et al.* Endogenous IL-17 as a factor determining the severity of *Clostridium difficile* infection in mice. **J. Med. Microbiol.**, v. 65, p. 821-827, 2016.

NASCIMENTO, S. B. *et al.* Glutamine depletion potentiates leucocyte-dependent inflammatory events induced by carrageenan or *Clostridium difficile* toxin A in rats. **Immunology**, v. 116, n. 3, p. 328-36, Nov 2005.

NATARAJAN, D. *et al.* Requirement of signalling by receptor tyrosine kinase RET for the directed migration of enteric nervous system progenitor cells during mammalian embryogenesis. **Development**, v. 129, p. 5151–5160, 2002.

NEUNLIST, M. *et al.* Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF- β 1-dependent pathway. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 292, p. 231–241, 2007.

NEUNLIST, M. *et al.* Toxin B of *Clostridium difficile* activates human VIP submucosal neurons, in part via an IL-1 β -dependent pathway. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 285, p. 1049-55, 2003.

NG, J. *et al.* *Clostridium difficile* toxin-induced inflammation and intestinal injury are mediated by the inflammasome. **Gastroenterology**, v. 139, n. 2, p. 542-52, 552.e1-3, Aug 2010.

NOGUEIRA, L. T. *et al.* The involvement of mast cells in the irinotecan-induced enteric neurons loss and reactive gliosis. **Journal of Neuroinflammation**, v. 14, n. 79, p. 1-13, 2017.

NONAKA, K. *et al.* Advanced glycation end-products increase IL-6 and ICAM-1 expression via RAGE, MAPK and NF κ B pathways in human gingival fibroblasts. **J. periodontal Res.**, v. 53, n. 3, p. 334-344, 2018.

OKADA, S. *et al.* Conditional ablation of STAT3 or Socs3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury. **Nat. Med.**, v. 12, p. 829-834, 2006.

OLLING, A. *et al.* The repetitive oligopeptide sequences modulate cytopathic potency but are not crucial for cellular uptake of *Clostridium difficile* toxin A. **PLoS ONE**, v. 6, e17623, 2011.

OSTENDORP, T. *et al.* Structural and functional insights into RAGE activation by multimeric S100 β . **The EMBO Journal**, v. 26, n. 16, p. 3868-3878, 2007.

PARK, M. *et al.* Overexpression of soluble RAGE in mesenchymal stem cells enhances their immunoregulatory potential for cellular therapy in autoimmune arthritis. **Scientific Reports**, v. 6, n. 35933, 2016.

PAWLOWSKI, S. W. *et al.* Murine model of *Clostridium difficile* infection with aged gnotobiotic C57BL/6 mice and a BI/NAP1 strain. **J. Infect. Dis.**, v. 202, n. 11, p. 1708-12, Dec 2010.

PEERY, A. F. *et al.* Burden and cost of gastrointestinal, liver, and pancreatic diseases in the United States: Update 2018. **Gastroenterology**, v. 156, p. 254-272, 2019.

PINTO, S. S. *et al.* Immunocontent and secretion of S100 β in astrocytes cultures from different brain regions in relation to morphology. **FEBS Lett.**, v. 486, p. 203-207, 2000.

PORTELA, L. V. C. *et al.* Serum S100B levels in patients with lúpus erythematosus: preliminary observation. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, p. 164-166, 2002.

QUESADA-GOMÉZ, C. *et al.* Analysis of TcdB proteins within the hypervirulent clade 2 reveals an impact of RhoA glucosylation on *Clostridium difficile* proinflammatory activities. **Infection and Immunity**, v. 84, n. 3, p. 856-865, 2016.

RESCIGNO, M. Don't forget to have a second brain. **Mucosal Immunology**, v.1, p. 328-329, 2008.

RIETHMACHER, D. *et al.* Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor. **Nature**, v. 389, p. 725-730, 1997.

PAPATHEODOROU, P. *et al.* Clostridial glucosylating toxins enter cells via clathrin-mediated endocytosis. **PLoS ONE**, v. 5, e10673, 2010.

PATHAK, M. K. *et al.* Pentamidine is an inhibitor of PRL Phosphatases with anticancer activity. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 1, p. 1255-1264, 2002.

PERRONE-BIZZOZERO, N.; BIRD, C. W. Role of HuD in nervous system function and pathology. **Front. Biosci.**, v. 5, p. 554-563, 2013.

POCHARD, C. *et al.* Defects in 15-HETE production and control of epithelial permeability by human enteric glial cells from patients with Crohn's disease. **Gastroenterology**, v. 150, p. 168-170, 2016.

PONATH, G. *et al.* Autocrine S100B effects on astrocytes are mediated via RAGE. **J. Neuroimmunol.**, v. 184, p. 214-222, 2007.

PRUITT, R. N., *et al.* Structural determinants of *Clostridium difficile* toxin A glucosyltransferase activity. **J. Biol. Chem.**, v. 287, p. 8013-8020, 2012.

RABOLD, D. *et al.* The zoonotic potential of *Clostridium difficile* from small companion animals and their owners. **PLoS ONE**, v. 13, n. 2, e0193411, 2018.

RAO, M. *et al.* Enteric glia express proteolipid protein 1 and are a transcriptionally unique population of glia in the mammalian nervous system. **Glia**, v. 63, p. 2040-2057, 2015.

RAO, M. *et al.* Enteric glia regulate gastrointestinal motility but are not required for maintenance of the epithelium in mice. **Gastroenterology**, v. 153, p. 1068-1081, 2017.

ROTHERMUNDT, M. *et al.* Increased S100B blood levels in unmedicated and treated schizophrenic patients are correlated with negative symptomatology. **Mol. Psychiatry**, v. 6, p. 445–449, 2001.

RUPNIK, M.; WILCOX, M. H.; GERDING, D. N. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 7, n. 7, p. 526-36, Jul 2009.

RYBNIKER, J. *et al.* Treatment of visceral leishmaniasis with intravenous pentamidine and oral fluconazole in an HIV-positive patient with chronic renal failure — a case report and brief review of the literature. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, p. 522-525e, 2010.

SAITO, K. *et al.* TAP/NXF1, the primary mRNA export receptor, specifically interacts with a neuronal RNA-binding protein HuD. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 321, p. 291-297, 2004.

SALAZAR, C. L. *et al.* Molecular, microbiological and clinical characterization of *Clostridium difficile* isolates from tertiary care hospitals in Colombia. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, 2017.

SANTOS, A. A. *et al.* Glutamine and alanyl-glutamine increase RhoA expression and reduce *Clostridium difficile* toxin-a-induced intestinal epithelial cell damage. **Biomed. Res. Int.**, v. 2013, p. 152052, 2013.

SASSELLI, V.; PACHNIS, V.; BURNS, A. J. The enteric nervous system. **Developmental Biology**, v. 366, p. 64-73, 2012.

SATHE, K. *et al.* S100B is increased in Parkinson's disease and ablation protects against MPTP-induced toxicity through the RAGE and TNF- α pathway. **Brain**, v. 135, p. 3336-47, 2012.

SAVIDGE, T. C. *et al.* Enteric Glia Regulate Intestinal Barrier Function and Inflammation Via Release of S-Nitrosoglutathione. **Gastroenterology**, v. 132, n. 4, p. 1344–1358, 2007.

SBAI, O. *et al.* RAGE-TXNIP axis is required for S100B-promoted Schwann cell migration, fibronectin expression and cytokine secretion. **J. Cell. Sci.**, v. 123, p. 4332-4339, 2010.

SCHREIBER, S. *et al.* Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta in relapse of Crohn's disease. **Lancet**, v. 353, p. 459-461, 1999.

SECCO, D. A. *et al.* *Clostridium difficile* infection among immunocompromised patients in Rio de Janeiro, Brazil and detection of moxifloxacin resistance in a ribotype 014 strain. **Anaerobe**, v. 28, p. 85-89, 2014.

- SEEKATZ, A. M.; YOUNG, V. B. *Clostridium difficile* and the microbiota. **J. Clin. Invest.**, v. 124, n. 10, p. 4182-9, Oct 2014.
- SHEN, A. *Clostridium difficile* toxins: Mediators of inflammation. **J. Innate Immun.**, v. 4, p. 149-158, 2012.
- SHINOZAKI, Y. *et al.* Transformation of astrocytes to a neuroprotective phenotype by microglia via P2Y1 receptor downregulation. **Cell Reports**, v. 19, p. 1151-1164, 2017.
- SINGH, G.; DEY, C. S. Induction of apoptosis-like cell death by pentamidine and doxorubicin through differential inhibition of topoisomerase II in arsenite-resistant *L. donovani*. **Acta Trop.**, v. 103, n. 3, p. 172-185, 2007.
- SMITS, W. K. *et al.* *Clostridium difficile* infection. **Primer**, v. 2, 2016.
- SORCI, G; AGNELETTI, A. L.; DONATO, R. Effects of S100A1 and S100 β on microtubule stability: an *in vitro* study using triton-cytoskeletons from astrocyte and myoblast cell lines. **Neuroscience**, v. 99, p. 773-783, 2000.
- SÖRENSSON, J.; JODAL, M.; LUNDGREN, O. Involvement of nerves and calcium channels in the intestinal response to *Clostridium difficile* toxin A: an experimental study in rats *in vivo*. **Gut**, v. 49, n. 1, p. 56-65, Jul 2001.
- SORET, R. *et al.* Characterization of human, mouse, and rat cultures of enteric glial cells and their effect on intestinal epithelial cells. **Neurogastroenterol. Motil.**, v. 25, p. 755-64, 2013.
- STABLER, R. A. *et al.* Macro and micro diversity of *Clostridium difficile* isolates from diverse sources and geographical locations. **PLoS One**, v. 7, e31559, 2012.
- STEINKAMP, M. *et al.* Brain derived neurotrophic factor inhibits apoptosis in enteric glia during gut inflammation. **Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research**, v. 18, n. 4, p. 117-22, 2012.
- STEINKAMP, M. *et al.* Glial-derived neurotrophic factor regulates apoptosis in colonic epithelial cells. **Gastroenterology**, v. 124, p. 1748-1757, 2003.
- STEINKAMP, M. *et al.* GDNF protects enteric glia from apoptosis: evidence for an autocrine loop. **BMC Gastroenterology**, v. 12, n. 6, p. 1-7, 2012.
- SUN, X. *et al.* Essential role of the glucosyltransferase activity in *Clostridium difficile* toxin-induced secretion of TNF-alpha by macrophages. **Microb. Pathog.**, v. 46, n. 6, p. 298-305, Jun 2009.
- TAO, L. *et al.* Frizzled are colonic epithelial receptors for *Clostridium difficile* toxin B. **Nature**, v. 538, n. 7625, p. 350-355, 2016.
- TIMOFEEVA, O. A. *et al.* Mechanisms of unphosphorylate STAT3 transcription factor binding to DNA. **J. Biol. Chem.**, v. 287, p. 14192-200, 2012.

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, n. 10, 2017.

TIXIER, E. *et al.* Human mucosa/submucosa interactions during intestinal inflammation: involvement of the enteric nervous system in interleukin-8 secretion. **Cell Microbiol.**, v. 7, n. 12, p. 1798-810, Dec 2005.

THACKER, M.; RIVERA, L. R.; CHO, H. J.; FURNESS, J. B. The relationship between glial distortion and neuronal changes following intestinal ischemia and reperfusion. **Neurogastroenterol. Motil.**, v. 23, p.500-509, 2011.

TORREALBA, N. *et al.* TGF- β /PI3K/AKT/mTOR/NF- κ B pathway: clinicopathological features in prostate cancer. **Aging Male**, v. 11, p. 1-11, 2019.

TURCO, F. *et al.* Enterogial-derived S100 β protein integrates bacteria-induced toll-like receptor signalling in human enteric glial cells. **Gut**, v. 63, p. 105-115, 2014.

TURCO, F. *et al.* Enterogial-derived S100 β protein modulates differentiation and proliferation of human intestinal apithelial cells in a RAGE-dependent manner. **Gastroenterology**, v. 142, n. 5, p. 837, 2012.

UESAKA, T. *et al.* Conditional ablation of GFRalpha1 in postmigratory enteric neurons triggers unconventional neuronal death in the colon and causes a Hirschsprung's disease phenotype. **Development**, v. 134, n. 11, p. 2171-81, Jun 2007.

VAN LANDEGHEM, L. *et al.* Enteric glia promote intestinal mucosal healing via activation of focal adhesion kinase and release of proEGF. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 300, p. 976–987, 2011.

VILLARREAL, A. *et al.* S100 β alters neuronal survival and dendrite extension via RAGE-mediated NF- κ B signaling. **Journal of Neurochemistry**, v. 117, p. 321-332, 2011.

VON BOYEN, G. B. *et al.* Gut inflammation modulated by the enteric nervous system and neurotrophic factors. **Scand J. Gastroenterol.**, v. 37, p. 621–25, 2002.

VON BOYEN, G. B. T. *et al.* Distribution of enteric glia and GDNF during gut inflammation. **BMC Gastroenterology**, v. 11, n. 3, p. 1-8, 2011.

VON BOYEN, G. B. T. *et al.* Proinflammatory cytokines increase glial fibrillary acidic protein expression in enteric glia. **Gut**, v. 53, n. 2, p. 222-228, 2004.

VON BOYEN, G.; STEINKAMP, M. The role of enteric glia in gut inflammation. **Neuron Glia Biology**, v. 6, n. 4, p. 231-236, 2011.

WALKER, A. S. *et al.* Relationship between bacterial strain type, host biomarkers, and mortality in *Clostridium difficile* infection. **Clin. Infect. Dis.**, v. 56, p. 1589-600, 2013.

- WANG, J. *et al.* Autocrine and exogenous transforming growth factor beta control cell cycle inhibition through pathways with different sensitivity. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 40237-40244, 2004.
- WANG, J. *et al.* Genetic polymorphisms of RAGE and risk of ulcerative colitis in a chinese population. **Immunol. Lett.**, v. 15, p. 30027-30034, 2015.
- WANG, Z. *et al.* RAGE gene three polymorphism with Crohn's disease susceptibility in chinese an population. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 9, p. 2397-2402, 2014.
- WEI, J. Y. *et al.* Activation of RAGE/STAT3 pathway by methylglyoxal contributes to spinal central sensitization and persistent pain induced by bortezomib. **Exp. Neurol.**, v. 296, p. 74-82, 2017.
- WEINGARDEN, A. R. *et al.* Changes in colonic bile acid composition following fecal microbiota transplantation are sufficient to control *Clostridium difficile* germination and growth. **PLoS One**, v. 11, e0147210, 2016.
- WILDER, P. T. *et al.* Solution structure of zinc- and calcium -bound rat S100 β as determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Biochemistry**, v. 44, p. 5690-5702, 2005.
- WU, D. *et al.* Effects of *Clostridium difficile* toxin A and B on human T lymphocytes migration. **Toxins**, v. 4, p. 926-938, 2013.
- XIA, Y. *et al.* *Clostridium difficile* toxin A excites enteric neurones and suppresses sympathetic neurotransmission in the guinea pig. **Gut**, v. 46, n. 4, p. 481-6, Apr 2000.
- XIE, L. *et al.* Inhibiting the PI3K/AKT/NF- κ B signal pathway with nobiletin for attenuating the development of osteoarthritis: *in vitro* and *in vivo* studies. **Food & Function**, v. 10, p. 2161-2175, 2019.
- XIE, L. *et al.* Regulation of interleukin-6-mediated PI3K activation and neuroendocrine differentiation by androgen signaling in prostate cancer LNCaP cells. **Prostate**, v. 60, n. 1, p. 61-7, 2004.
- XIONG, S. *et al.* Neuronal hypertrophy in acute appendicitis. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 124, n. 10, p. 1429-1433, 2000.
- XU, H. *et al.* Innate immune sensing of bacterial modifications of Rho GTPases by the Pyrin inflammasome. **Nature**, v. 513, p. 237-41, 2014.
- YAN-BO, Y.; YAN-QING, L. Enteric glial cells and their role in the intestinal epithelial barrier. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 32, p. 11273-11280, 2014.
- YAN, S. S. *et al.* Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by selective blockade of encephalitogenic T-cell infiltration of the central nervous system. **Nat. Med.**, v. 9, p. 287-293, 2003.

YANG, J. *et al.* Stat3 activation is limiting for reprogramming to ground state pluripotency. **Cell. Stem Cell**, v. 7, p. 319-28, 2010.

YANG, J. *et al.* Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NFkappaB. **Genes Dev.**, v. 21, n. 11, p. 1396–1408, 2007.

YANG, J.; STARK, G. R. Roles of unphosphorylated STATs in signaling. **Cell Res.**, v. 18, n. 4, p. 443–451, 2008.

YOUNG, H. M.; JONES, B. R.; MCKEOWN, S. J. The projections of early enteric neurons are influenced by the direction of neural crest cell migration. **J. Neurosci.**, v. 22, p. 6005-6018, 2002.

YU, H. *et al.* Cytokines are markers of the *Clostridium difficile*-induced inflammatory response and predict disease severity. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 24, n. 8, 2017.

YUAN, P. *et al.* Chondroitin sulfate proteoglycan 4 functions as the cellular receptor for *Clostridium difficile* toxin B. **Cell Res.**, v. 25, p. 157–168, 2015.

ZHANG, D. K. *et al.* Glial-derived neurotrophic factor regulates intestinal epithelial barrier function and inflammation and is therapeutic for murine colitis. **J. Pathol.**, v. 222, p. 213-222, 2010.

ZHANG, L. *et al.* S100B attenuates microglia activation in gliomas: possible role of STAT3 pathway. **Glia**, v. 59, n. 3, p. 486-498, 2011.

ZHANG, Y. *et al.* Cysteine protease-mediated autocleavage of *Clostridium difficile* toxins regulates their proinflammatory activity. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, v. 5, n. 4, p. 611-625, 2018.

ZHANG, Z. *et al.* Translocation domain mutations affecting cellular toxicity identify the *Clostridium difficile* toxin B pore. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 111, p. 3721–3726, 2014.

ZHOU, Y. *et al.* Epidemiology of *Clostridium difficile* infection in hospitalized adults and the first isolation of *C. difficile* PCR ribotype 027 in central China. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 232, 2019.

ZHUNG, Z. *et al.* The anti-apoptotic effect of PI3K-AKT signaling pathway after subarachnoid hemorrhage in rats. **Ann. Clin. Lab. Sci. Autumn**, v. 41, n. 4, p. 364-372, 2011.

APÊNDICE A**Fármacos**

Fármacos e proteínas	Fabricante	Código do produto
Cloridrato de cetamina 10% (Cetamin [®])	Syntec	-
FPSZM1	Tocris	6237
Galielalactona	Tocris	6218
Isotiocianato de pentamidina	Sigma-Aldrich	P0547
LY294002	Tocris	1130
S100B	Sigma	S6677
Xilazina 2% (Calmin [®])	Agener União	-

Reagentes e materiais

Reagentes/materiais	Fabricante	Código do produto
Agente redutor da amostra	Invitrogen	NP0009
Albumina sérica bovina	Sigma-Aldrich	A2153-100
<i>Antifade Prolong Gold</i> contendo DAPI	Thermo Scientific	P36931
brometo de tiazolil azul de tiazolil (MTT)	Sigma-Aldrich	M2128
DAB	Dako	K3468
Dako Pen	Dako	52002
Diluyente do anticorpo	Spring Bioscience	ADS-125
DNase I	Invitrogen	18068-015
Ensaio de apoptose RealTime-Glo annexin V	Promega	JA1000
<i>Gel BIS-Tris 4-12%</i>	Invitrogen	NP0322BOX
High Capacity cDNA (Kit de transcriptase reversa)	Applied biosystems	4368814
Inibidor de fosfatase	Roche	4906845001
Inibidor de protease livre de EDTA	Roche	11873580001
Kit de citocinas para IL-1 β	R&D Systems	DY501
Kit de citocinas para IL-6	R&D Systems	DY506
Kit de citocinas para S100B	R&D Systems	DY1820
Kit de dosagem de proteína	Thermo Scientific	23227
Kit de ensaio Qubit RNA BR	Invitrogen	Q10211
Kit de extração do RNA	Promega	Z3105
Kit de extração nuclear	Thermo Scientific	78833
Kit de síntese de cDNA iScript	Biorad	1708891
Membrana de nitrocelulose	Invitrogen	LC2000/LC2006
<i>Precision Plus Protein Kaleidoscope</i> (Western Blotting)	Biorad	1610375
Reagente A e B (dosagem de citocinas)	R&D Systems	DY999
Reagente diluyente (dosagem de citocinas)	R&D Systems	DY995
Solução de parada (dosagem de citocinas)	R&D Systems	DY994
Solução de paraformaldeído	Alfa Aesar	43388
Soro de burro normal	Jackson ImmunoResearch	017-000-121
SYBER Green PCR master mix	Applied biosystems	4309155
Supermix iTaq universal Syber	Biorad	172-5124
Tampão de carga da proteína	LICOR	928-40004
Tampão de lavagem 25x concentrado (dosagem de citocinas)	R&D Systems	895126
Taq Man <i>Gene Expression Master Mix</i>	Applied biosystems	4369016
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