



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

ANDRÉA VIANA LOUREIRO

**PAPEL DA CONEXINA-43 E PANEXINA-1 NA INFECÇÃO POR *Clostridioides*  
*difficile* E NA MORTE CELULAR E SUPRARREGULAÇÃO DE IL-6 PROMOVIDAS  
PELAS TOXINAS A E B**

FORTALEZA

2021



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

ANDRÉA VIANA LOUREIRO

**PAPEL DA CONEXINA-43 E PANEXINA-1 NA INFECÇÃO POR *Clostridioides difficile* E NA MORTE CELULAR E SUPRARREGULAÇÃO DE IL-6 PROMOVIDAS PELAS TOXINAS A E B**

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

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

Coorientadora: Dra Deiziane Viana da Silva Costa.

FORTALEZA

2021

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)

---

- L928p Loureiro, Andréa Viana.  
Papel da Conexina-43 e Panexina-1 na infecção por *Clostridioides difficile* e na morte celular e suprarregulação de IL-6 promovidas pelas toxinas A e B /  
Andréa Viana Loureiro. – 2021.  
69 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2021.  
Orientação: Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito.  
Coorientação: Profa. Dra. Deiziane Viana da Silva Costa.
1. Clostridioides difficile. 2. Sistema Nervoso Entérico. 3. Apoptose. 4. Inflamação. I. Título.  
CDD 610
-

ANDRÉA VIANA LOUREIRO

**PAPEL DA CONEXINA-43 E PANEXINA-1 NA INFECÇÃO POR *Clostridioides difficile* E NA MORTE CELULAR E SUPRARREGULAÇÃO DE IL-6 PROMOVIDAS PELAS TOXINAS A E B**

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

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

Coorientadora: Dra Deiziane Viana da Silva Costa.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Profa. Dra. Juliana de Mattos Coelho Aguiar  
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

---

Profa. Dra. Maria Luisa Pereira de Melo  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

À Deus,

Fonte inesgotável de cuidado e amor.

Que por meio de sua Palavra me ensina  
o verdadeiro caminho para a sabedoria.

Aos meus Pais Odil e Simone,

Meu amor e gratidão por tudo o que já  
fizeram por mim. Em cada degrau  
alcançado, o desejo latente de honrá-los.

Ao meu esposo Thiago,

O amor e suporte necessários em dias de  
luta.

Aos meus irmãos Antônio Bruno, Bruna e  
André, sobrinha Beatriz e cunhado  
Leandro, o apoio, entusiasmo e torcida em  
cada conquista, para além da distância  
física.

## AGRADECIMENTOS

À Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gerly Anne de Castro Brito, por me acolher como orientanda, recebendo-me de outro Estado com o sonho de pós-graduação e pouco conhecimento sobre a pesquisa científica. Há uma frase que diz: “um Professor afeta a eternidade, ele nunca saberá onde sua influência termina” (Henry Adams). Sempre recordarei com emoção e gratidão a oportunidade a mim concedida. Com o passar do tempo, percebi o quanto Deus foi generoso ao me presentear com uma orientadora excepcional, cujo vasto currículo é apenas adereço à grandiosidade de sua humanidade.

À Dr<sup>a</sup> Conceição da Silva Martins (Josy), minha coorientadora do coração, por sua amizade e incontáveis momentos divertidos. Por ter sido a primeira pessoa que me recebeu no laboratório e que, efetivamente, me inseriu no mundo da ciência. Dividindo seu conhecimento de bancada e compartilhando sobre a vida.

À Dr<sup>a</sup> Deiziane Viana da Silva Costa, minha coorientadora oficial, por toda paciência e tempo dispensado neste trabalho. Por ter estado tão presente, apesar da distância geográfica. E por me inspirar com seu exemplo de resiliência, dedicação e profissionalismo.

Aos amigos do laboratório NEMPI, Lucianny Lima, Letícia Terceiro, Luana Gaudêncio, Sandro Max e Ismael de Paula, pela parceria, ajuda mútua e cafés da tarde que tornaram a caminhada mais leve e descontraída.

Aos alunos de iniciação científica, Matheus Brandão e Mariana Oliveira, pelo empenho e disposição em ajudar nos momentos necessários.

À minha banca de qualificação, composta pela Dr<sup>a</sup> Renata Ferreira de Carvalho Leitão e Dr<sup>a</sup> Camila Nayane de Carvalho Lima, bem com a banca de defesa, composta pela Dr<sup>a</sup> Maria Luisa Pereira de Melo e Dr<sup>a</sup> Juliana de Mattos Coelho Aguiar, pela aceitação do convite e valiosas contribuições neste trabalho.

Aos técnicos de laboratório, Flávia e Alceu, pelo processamento das amostras para a realização de imuno-histoquímica.

Às secretárias Ivone e Rita do programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, por toda ajuda e eficiência nas resoluções burocráticas.

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

Gratidão a todos.

“A humildade é o mais alto grau de  
sofisticação”.

Leonardo da vinci

**Título: PAPEL DA CONEXINA-43 E PANEXINA-1 NA INFECÇÃO POR *Clostridioides difficile* E NA MORTE CELULAR E SUPRARREGULAÇÃO DE IL-6 PROMOVIDAS PELAS TOXINAS A E B.**

O *Clostridioides difficile* (*C. difficile*), um bacilo Gram positivo anaeróbio formador de esporos, é um dos maiores causadores de diarreia nosocomial associada ao uso de antibióticos. *C. difficile* produz as toxinas A (TcdA) e B (TcdB), ambas associadas ao dano intestinal causado por esse anaeróbio. Canais de Conexina-43 (Cx43) e Panexina-1 (Panx1), que podem ser expressos por uma variedade de células, permitem a passagem de moléculas mensageiras que regulam o processo inflamatório. O efeito da TcdA ou TcdB na expressão de Cx43 e Panx1 em células gliais entéricas (CGEs), bem como o papel deles nos efeitos deletérios dessas toxinas ainda não está esclarecido na literatura. Desse modo, esse estudo tem como objetivo verificar alterações induzidas pela infecção do *C. difficile* (ICD) na expressão de Cx43 e Panx1 no cólon e cécum de animais infectados, bem como investigar o papel desses canais na morte celular e expressão de *IL-6* induzidas por TcdA e TcdB em CGEs. Camundongos C57BL/6 machos (8 semanas de idade) foram infectados com *C. difficile* VPI10463 ( $10^5$  UFC /animal por gavagem), sendo que o grupo controle recebeu apenas CCP por gavagem. Após três dias da infecção, amostras de cécum e cólon foram coletadas para avaliar a expressão de Cx43 e Panx1 por imunohistoquímica. No estudo *in vitro*, linhagem de CGEs (PK060399egfr) foram desafiadas com as TcdA (50 ng/mL) ou TcdB (1 ng/mL), na presença ou ausência dos inibidores de Cx43 (Gap19 *trifluoroacetate*, 1 e 10  $\mu$ M) e Panx1 (10Panx *trifluoroacetate*, 10 e 50  $\mu$ M), por 2, 12 e/ou 18h. Decorrido esse tempo, os seguintes parâmetros foram avaliados: expressão de Cx43 e Panx1 (western blotting e qPCR), avaliação da atividade de caspase-3 e ligação de fosfatidilserina à anexina-V por ensaio de luminescência, bem como expressão de *IL-6* (qPCR). Conforme os dados do estudo *in vivo*, a ICD aumentou de forma expressiva os níveis de Cx43 no cécum ( $p = 0,03$ ) e de Panx1 no cécum ( $p = 0,01$ ) e no cólon ( $p = 0,04$ ) de camundongos comparado ao grupo controle. No estudo *in vitro*, TcdA, mas não TcdB, suprarregulou Cx43 em CGEs no tempo de 2h. A inibição de Cx43 não reduziu a atividade de caspase-3 induzida por ambas as toxinas, no entanto, diminuiu a expressão gênica de *IL-6* induzida por TcdB ( $p = 0,0001$ ), mas não por TcdA, enquanto que TcdA e TcdB aumentaram a sua expressão gênica de forma expressiva após 18h de incubação. O inibidor de Panx1 (50  $\mu$ M) diminuiu a atividade de caspase-3 ( $p = 0,002$ ) e ligação fosfatidilserina à anexina-V ( $p = 0,001$ ), mas não a expressão gênica de *IL-6* em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB. Com base nos achados deste estudo, conclui-se que Cx43 e Panx1, que estão aumentados durante a ICD, desempenham importante papel nos efeitos das toxinas do *C. difficile* em CGEs, Cx43 promovendo a expressão de *IL-6* induzida por TcdB, e Panx1, por sua vez, participando da morte celular induzida por ambas as toxinas em CGEs.

**Palavras-chave:** *Clostridioides difficile*, Infecção por *Clostridioides difficile*, Conexina-43, Panexina-1, glia entérica.

**Title: ROLE OF CONNEXIN-43 AND PANNEXIN-1 IN INFECTION WITH *Clostridioides difficile* AND IN CELL DEATH AND UPREGULATION OF IL-6 PROMOTED BY TOXINS A AND B.**

**ABSTRACT**

*Clostridioides difficile* (*C. difficile*), a gram-positive anaerobic spore-forming bacillus, is a major cause of nosocomial diarrhea associated with the use of antibiotics. *C. difficile* produces toxin A (TcdA) and B (TcdB), both associated with intestinal damage caused by this anaerobic. Connexin-43 (Cx43) and Pannexin-1 (Panx1), which can be expressed by a variety of cells, allow the passage of messenger molecules regulating the inflammatory process. The effect of TcdA or TcdB on Cx43 and Panx1 expression in enteric glial cells (EGCs), as well as their role in the deleterious effects of these toxins is still unclear in the literature. Thus, this study aims to verify changes induced by *C. difficile* infection (CDI) in the expression of Cx43 and Panx1 in the colon and cecum of infected animals, as well as to investigate the role of these channels in cell death and expression of IL-6 induced by TcdA and TcdB in EGCs. C57BL/6 male mice (8 weeks old) were infected with *C. difficile* VPI10463 ( $10^5$  CFU in Chopped Meat broth - CPP/animal via gavage), and control group received only CPP via gavage. After three days of infection, samples of cecum and colon were collected to evaluate the expression of Cx43 and Panx-1 by immunohistochemistry. *In vitro*, EGCs lineage (PK060399egfr) were challenged with TcdA (50 ng/mL) and TcdB (1 ng/mL), in the presence or absence of Cx43 (Gap19 trifluoroacetate, 1 and 10  $\mu$ M) and Panx1 (10Panx trifluoroacetate, 10 and 50  $\mu$ M) inhibitors for 2, 12 and/or 18h. After this, the following parameters were evaluated: expression of Cx43 and Panx1 (Western blotting and qPCR), analysis of caspase-3 activity and phosphatidylserine-annexin-V binding by luminescence assay, as well as *IL-6* expression (qPCR). CDI significantly increased the levels of Cx43 in cecum ( $p = 0.03$ ) and Panx1 in cecum ( $p = 0.01$ ) and colon ( $p = 0.04$ ) of mice compared to the control group. *In vitro*, TcdA, but not TcdB, upregulated Cx43 in EGCs in 2h. The inhibition of Cx43 did not reduce the caspase-3 activity induced by both toxins, however decreased *IL-6* gene expression induced by TcdB ( $p = 0.0001$ ), but not by TcdA. In relation to Panx1, TcdA and TcdB significantly increased its gene expression after 18h of incubation. Panx1 inhibitor (50  $\mu$ M) decreased caspase-3 activity ( $p = 0.002$ ) and phosphatidylserine-annexin-V binding ( $p = 0.001$ ), but not *IL-6* gene expression in TcdA and TcdB-challenged EGCs. In conclusion, Cx43 and Panx1, which are increased during CDI, play an important role in the effects of *C. difficile* toxins in EGCs, Cx43 promoting the expression of IL-6 induced by TcdB and Panx1, in turn, participating in cell death induced by both toxins in EGCs.

**Keywords:** *Clostridioides difficile*, *Clostridioides difficile* infection, Connexin-43, Pannexin-1, Enteric glia.

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1	- Primers utilizados no qPCR.....	36
----------	-----------------------------------	----

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- <i>Clostridioides difficile</i> .....	18
Figura 2	- Estrutura e função das TcdA e TcdB.....	22
Figura 3	- Representação das camadas intestinais e localização das células gliais entéricas.....	23
Figura 4	- CGEs em plexo mioentérico do cólon de camundongo.....	24
Figura 5	- Representação esquemática da ativação de CGEs e abertura de canais de ATP.....	25
Figura 6	- Representação esquemática da constituição dos canais de junção GAP.....	26
Figura 7	- Representação esquemática das estruturas de Panexina e Conexina.....	27
Figura 8	- Esquema de indução do modelo de ICD e protocolo experimental.....	33
Figura 9	- Imunomarcção de Cx43 em amostras de cécum e cólon de camundongos submetidos à ICD.....	39
Figura 10	- ICD aumenta imunomarcção de Cx43 no cécum, mas não no cólon de camundongos.....	40
Figura 11	- TcdA e TcdB alteram a expressão gênica de <i>Cx43</i> em CGEs <i>in vitro</i> .....	41
Figura 12	- Expressão proteica de Cx43 em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB <i>in vitro</i> .....	42
Figura 13	- Efeito do Gap19 na Viabilidade de CGEs <i>in vitro</i> .....	43
Figura 14	- Inibidor de Cx43 não reduz a atividade de caspase 3/7 induzida por TcdA e TcdB em CGEs.....	44
Figura 15	- Inibidor de Cx43 não diminui a formação de ligações fosfatidilserina-anexina V em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB.....	44
Figura 16	- Inibidor de Cx43 diminui a expressão de <i>IL-6</i> em CGEs desafiadas por TcdB, mas não por TcdA.....	45
Figura 17	- Imunomarcção de Panx1 em amostras de tecido de cécum e cólon de camundongos submetidos à ICD.....	46
Figura 18	- ICD aumenta imunomarcção de Panx1 no cécum e cólon de camundongos.....	47
Figura 19	- TcdA e TcdB alteram a expressão gênica de <i>Panx1</i> em CGEs <i>in vitro</i> .....	48
Figura 20	- Expressão proteica de Panx1 em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB <i>in vitro</i> .....	48

Figura 21	- Efeito do 10Panx na Viabilidade de CGEs <i>in vitro</i> .....	49
Figura 22	- Inibidor de panx1 reduz a atividade de caspase 3/7 induzida por TcdA e TcdB em CGEs.....	50
Figura 23	- Inibidor de Panx1 diminui a formação de ligações fosfatidilserina-anexina V em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB.....	50
Figura 24	- Inibidor de Panx1 não afeta a expressão de <i>IL-6</i> em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB.....	51
Figura 25	- Possível mecanismo da participação de Cx43 e Panx1 na ação de TcdA e TcdB em CGEs.....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus centígrados
µL	Microlitro
µg	Micrograma
µm	Micrômetro
µM	Micromolar
5-HT	Serotonina
10-Panx	Inibidor de Panexina-1
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio
CCP	Caldo de carne picado
CO <sup>2</sup>	Dióxido de carbono
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridioides difficile</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CDT	Toxina binária do <i>Clostridioides difficile</i>
CGEs	Células gliais entéricas
CROPS	do inglês —combined repetitive oligopeptides   (oligopeptídeos repetitivos combinados)
CSPG4	do inglês — chondroitin sulfate proteoglycan 4   (proteoglicano sulfato de condroitina-4)
Cx43	Conexina-43
DAP	Domínio autoproteolítico
DGT	Domínio glicosiltransferase
DLR	Domínio de ligação ao receptor
DMSO	Dimetilsulfóxido
DT	Domínio de translocação
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase	Desoxirribonuclease
DRGE	Doença do refluxo gastroesofágico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético

EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EPM	Erro padrão da média
<i>et al</i>	E colaboradores
FS	Fosfatidilserina
FZDs	Receptores da família Frizzled
GAP19	Inibidor de Conexina-43
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GDNF	Fator neurotrófico derivado de células gliais
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
GTPase	Guanosina trifosfatase
ICD	Infecção por <i>Clostridioides difficile</i>
IL-1 $\beta$	Interleucina -1 $\beta$
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
i.p.	Intraperitoneal
InsP6	Inositol-hexaquisfosfato
JNK	C-JUN kinase aminoterminal
KDa	KiloDalton
Kg	Kilograma
LEICA	Sistema de aquisição de imagens
mg	Miligrama
Min	Minuto
mL	Mililitro
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio
N	Número
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NF $\kappa$ B	Fator de transcrição nuclear- $\kappa$ B
ng	Nanograma

P	Página
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PaLoc	Locus de patogenicidade
Panx1	Panexina-1
Panx2	Panexina-2
Panx3	Panexina-3
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia de polimerase
Ph	Potencial hidrogeniônico
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
PVRL3	do inglês “poliovírus 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
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPM	Rotações por minuto
S100 $\beta$	Fração beta da proteína S100
SNC	Sistema nervoso central
SNE	Sistema nervoso entérico
SOX2	SRY-box 2
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
TGI	Trato gastrointestinal

UFC	Unidades formadoras de colônias
ULR	Unidade de luminescência relativa
V	Volume
VIP	Polipeptídeo intestinal vasoativo

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
1.1	<i>Clostridioides difficile</i> .....	18
1.2	Toxina A e Toxina B do <i>C. difficile</i> .....	20
1.3	Células gliais entéricas (CGEs).....	23
1.4	Conexina-43 (Cx43).....	25
1.5	Panexina-1 (Panx1).....	26
1.6	Efeitos das toxinas do <i>C. difficile</i> em componentes do SNE.....	27
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>29</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
3.1	Objetivo geral.....	30
3.2	Objetivos específicos.....	30
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
4.1	Fármacos, reagentes, materiais e soluções utilizados no estudo.....	31
4.2	Experimentos in vivo.....	31
4.2.1	Aspectos éticos em pesquisa animal.....	31
4.2.2	Animais.....	31
4.2.3	Preparação da bactéria.....	31
4.2.4	Modelo de Infecção por <i>C. difficile</i> .....	32
4.2.5	Grupos experimentais para o modelo de infecção.....	32
4.2.6	Parâmetros avaliados.....	33
4.2.6.1	Imunohistoquímica.....	33
4.3	Experimentos in vitro.....	34
4.3.1	Cultura de CGEs.....	34
4.3.2	Administração de toxinas e fármacos em CGEs.....	35
4.3.3	Parâmetros avaliados no estudo in vitro.....	35
4.3.3.1	Ensaio de viabilidade celular.....	35
4.3.3.2	Expressão Gênica de Cx43, Panx-1 e IL-6 por qPCR.....	35
4.3.3.3	Avaliação da expressão proteica de Cx43.....	36
4.3.3.4	Avaliação da atividade de caspase 3/7.....	37
4.3.3.5	Ensaio de ligação fosfatidilserina-anexina V.....	37
4.4	Análise estatística.....	38

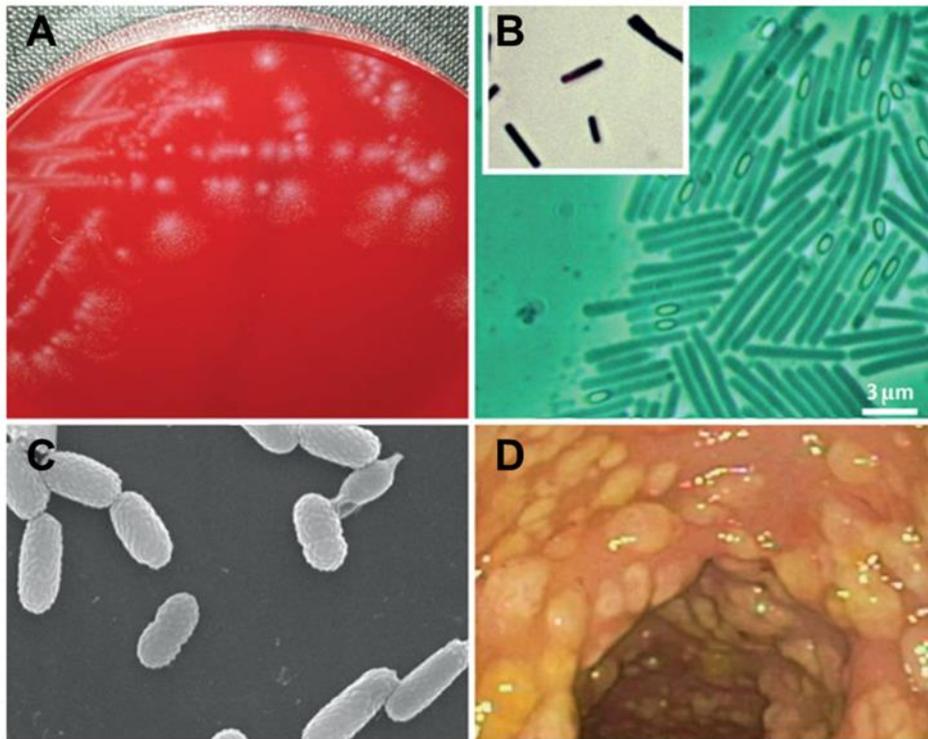
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
5.1	Alterações da expressão de Cx43 em amostras de cólon e cécum de camundongo com ICD.....	39
5.1.2	Alterações da expressão de Cx43 em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB <i>in vitro</i> .....	40
5.1.3	Viabilidade de CGEs expostas ao inibidor de Cx43 (Gap19) <i>in vitro</i> .....	42
5.1.4	Efeito do inibidor de Cx43 na atividade de caspase 3/7 e ligação fosfatidilserina-anexina V em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB <i>in vitro</i> .....	43
5.1.5	Efeito do inibidor de Cx43 na expressão da citocina pleiotrópica IL-6 em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB <i>in vitro</i> .....	45
5.2	Alterações da expressão de Panx1 em amostras de cólon e cécum de camundongo com ICD.....	46
5.2.1	Alterações da expressão de Panx1 em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB <i>in vitro</i> .....	47
5.2.2	Viabilidade de CGEs expostas ao inibidor de Panx1 (10Panx) <i>in vitro</i> .....	49
5.2.3	Efeito do inibidor de Panx1 na atividade de caspase 3/7 e ligação fosfatidilserina-anexina V em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB <i>in vitro</i> .....	49
5.2.4	Efeito do inibidor de Panx1 na expressão da citocina pleiotrópica IL-6 em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB <i>in vitro</i> .....	51
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>52</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>57</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>58</b>
	<b>APÊNDICE.....</b>	<b>69</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 *Clostridioides difficile*

O *Clostridioides* (anteriormente *Clostridium*) *difficile* (*C. difficile*) é um bacilo anaeróbio gram-positivo, formador de esporos e produtor de toxinas. *C. difficile* (Figura 1) é reconhecido como um dos principais causadores de diarreia associada a antibioticoterapia em ambiente hospitalar (ABT; MCKENNEY; PAMER, 2016; LEFFLER; LAMINT, 2015). A infecção por *C. difficile* (ICD) pode variar de diarreia leve a colite pseudomembranosa (ABT; MCKENNEY; PAMER, 2016).

Figura 1- *Clostridioides difficile*



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

A transmissão desse anaeróbio ocorre na forma de esporos por via fecal-oral ou via de contato com superfícies ou mãos contaminadas com os esporos dessa bactéria. Os esporos resistem ao ácido estomacal e alcançam o intestino delgado, onde encontram ácidos biliares

específicos como taurocolato, colato e quenodeocolato que contribuem para a sua germinação. Uma vez ativadas, as células vegetativas colonizam o cólon do hospedeiro. A infecção é favorecida pela exposição prévia a antibióticos que induzem alterações na microbiota intestinal, como redução de bacteroidetes (CHANDRASEKARAN; LACY, 2017; CZEPIEL *et al.*, 2019).

Os fatores de riscos para a aquisição de ICD incluem: idade (>65 anos), sexo feminino, comorbidades (doença renal crônica, diabetes mellitus, 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 opioides contribuem para o desenvolvimento de ICD (EZE *et al.*, 2017).

Nos Estados Unidos, um estudo de vigilância populacional realizado em 10 áreas geográficas, estimou a incidência da ICD em 453.000 casos no ano de 2011. Em 30 dias, a estimativa de óbitos foi de 29.000 (LESSA *et al.*, 2015). Em 2012, o Centro Europeu de Prevalência e Controle de Doenças (ECDC) realizou um estudo acerca das infecções associadas à saúde, em 30 países europeus, e identificou que o *C. difficile* foi responsável por 48% das infecções gastrointestinais nosocomiais (NAGY, 2018).

A ocorrência de ICD no Brasil não é bem estabelecida, sendo dificultada pela subnotificação de casos e diferentes metodologias na identificação desse patógeno. Apesar disso, o *C. difficile* é considerada como a terceira espécie associada a quadros diarreicos comunitários (TRINDADE; DOMINGUES; FERREIRA, 2019). Recentemente, um estudo prospectivo multicêntrico em cinco hospitais brasileiros das regiões Nordeste, Sudeste e Sul do Brasil, constatou que a taxa de prevalência de ICD foi de 15% (GIRÃO *et al.*, 2020).

No sul do Brasil, um estudo epidemiológico multicêntrico, entre os anos 2017 e 2019, encontrou a prevalência de 17,7% de ICD em pacientes com episódios diarreicos e com uso prévio de antibioticoterapia (MAESTRI *et al.*, 2020). Enquanto na região Nordeste, um estudo com pacientes oncológicos revelou alta taxa de ICD, onde 23 de 48 pacientes (48%) foram positivos para *C. difficile* (COSTA *et al.*, 2017).

A antibioticoterapia (metronidazol e vancomicina), probióticos, anticorpos monoclonais e transplante fecal fazem parte das opções de tratamento para ICD. Devido a menor resposta do antibiótico metronidazol, os EUA estão substituindo-o por vancomicina. No entanto, no Brasil, o metronidazol ainda é a primeira escolha de fármaco para o tratamento de ICD. Nos casos de diarreia recorrente por *C. difficile*, o tratamento pode ser realizado com fidaxomicina, tigeciclina e rifaximin, por serem mais efetivos. Somado a isso, o transplante

fecal tem sido excelente alternativa após antibioticoterapia, especialmente para os casos de recorrência (HOPKINS; WILSON, 2018).

A gravidade da ICD pode ser determinada pela resposta inflamatória do hospedeiro à virulência das toxinas do patógeno (KELLY; KYNE, 2011; MADAN; PETRI, 2012; YU *et al.*, 2017). Isso se deve à correlação positiva entre mediadores inflamatórios, persistência da diarreia e piora no desfecho clínico da doença (EL FEGHALY *et al.*, 2013; WALKER *et al.*, 2013).

No Canadá, em 2003, foi relatado pela primeira vez o surgimento de cepas hipervirulentas pertencentes ao ribotipo NAP1/027, que produzem a toxina binária (CDT), além das toxinas A (TcdA) e B (TcdB), responsáveis por surtos na América do Norte, Europa e alguns países da América Latina (GUERRERO-ARAYA *et al.*, 2020). Essa cepa é resistente a fluoroquinolonas e seu surgimento parece estar ligado ao uso indiscriminado dos antibióticos dessa classe. NAP1/027 induz uma forma mais grave da doença e aumento das taxas de recidiva e mortalidade (CARTMAN *et al.*, 2010). No Brasil, a cepa NAP1/027 nunca foi isolada, porém, uma cepa com características hipervirulentas, ICC-45, foi isolada de um paciente oncológico que foi a óbito em hospital cearense. ICC45 também produz toxina binária e induziu ruptura da mucosa intestinal acompanhada por intensa resposta inflamatória e estresse oxidativo semelhante a NAP1/027 em modelos animais. No entanto, diferente da NAP1/027, ICC45 se mostrou sensível a fluoroquinolona (COSTA *et al.*, 2016).

## **1.2 Toxina A e Toxina B do *Clostridioides difficile***

Os fatores de virulência primários do *C. difficile* são TcdA, TcdB e CDT, as quais são produzidas pelas cepas toxigênicas que são responsáveis pela ICD (JANOIR, 2016; RUPNIK, 2001). CDT, que é produzida por algumas cepas do *C. difficile*, pode aumentar a virulência da bactéria ocasionando formas mais graves da doença (BURKE; LAMONT, 2014; RUPNIK, 2001).

TcdA e TcdB são as principais toxinas secretadas pelo *C. difficile*. 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, 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).

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; PRUITT *et al.*, 2012; PAPTODOROU *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 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.

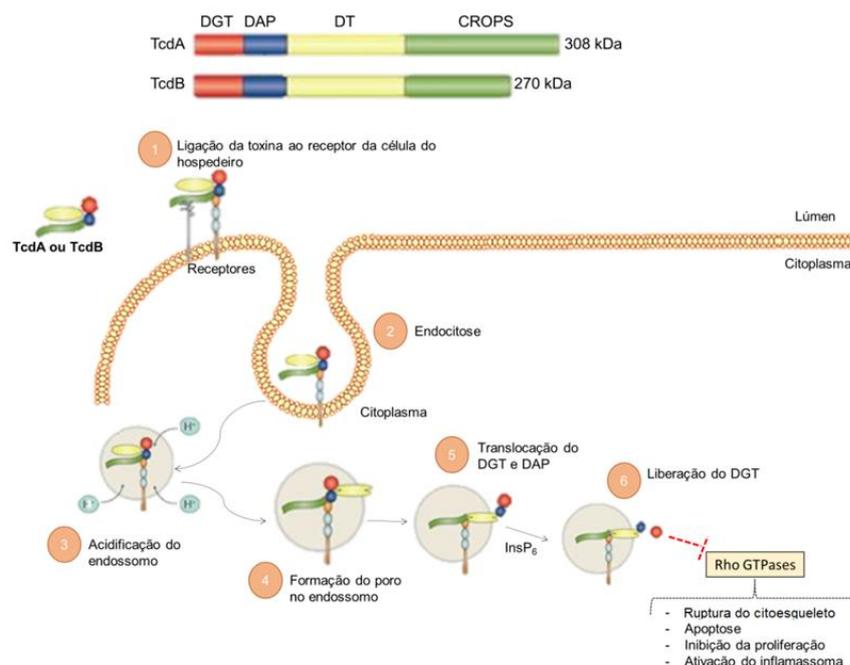
Após a endocitose, TcdA e TcdB sofrem uma mudança conformacional no DT, como consequência da acidificação do endossomo mediado pelo transporte ativo de H<sup>+</sup>. O DT, uma vez estruturalmente modificado, forma um poro na membrana do endossomo, propiciando a translocação do DAP e DGT. Um estudo identificou 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). Enquanto a variante de TcdB codificada pela cepa ICC-45 induz efeito citopático distinto de acordo com seu toxinótipo (COSTA *et al.*, 2016).

No citoplasma, DAP é ativado por inositol-hexaquisfosfato (InsP<sub>6</sub>), com consequente liberação de DGT para o citosol, que por sua vez, inibe as Rho GTPases (BELLA *et al.*, 2016; SMITS *et al.*, 2016). Além de participar na liberação das toxinas do *C. difficile*, DAP regula a atividade pró-inflamatória dessas toxinas (ZHANG *et al.*, 2018). A inativação das Rho GTPases

resulta no desarranjo do citoesqueleto celular, ruptura das junções oclusivas que altera a permeabilidade da barreira intestinal intensificando o processo inflamatório e interrompendo também o processo de renovação do epitélio intestinal (CZEPIEL *et al.*, 2019; RUPNIK, WILCOX, GERDING, 2009). Considerando que a via Wnt/  $\beta$ -catenina está envolvida na proliferação celular das células tronco das criptas intestinais, a inibição renovação do epitélio intestinal por toxinas do *C. difficile* pode ser explicada pelo menos em parte por estudos recentes que mostraram que TcdA inibe a via de sinalização Wnt/  $\beta$ -catenina (LIMA *et al.*, 2014), via inibição de Rac-1 (MARTINS *et al.*, 2020). Enquanto que TcdB também inibe essa via de sinalização via interação com receptores da família Frizzled (FZDs) (TAO *et al.*, 2016).

Na figura 2, pode-se observar ilustrativamente o processo de ligação das toxinas do *C. difficile* a célula do hospedeiro até a inibição das Rho GTPases.

Figura 2 – Estrutura e função das TcdA e TcdB



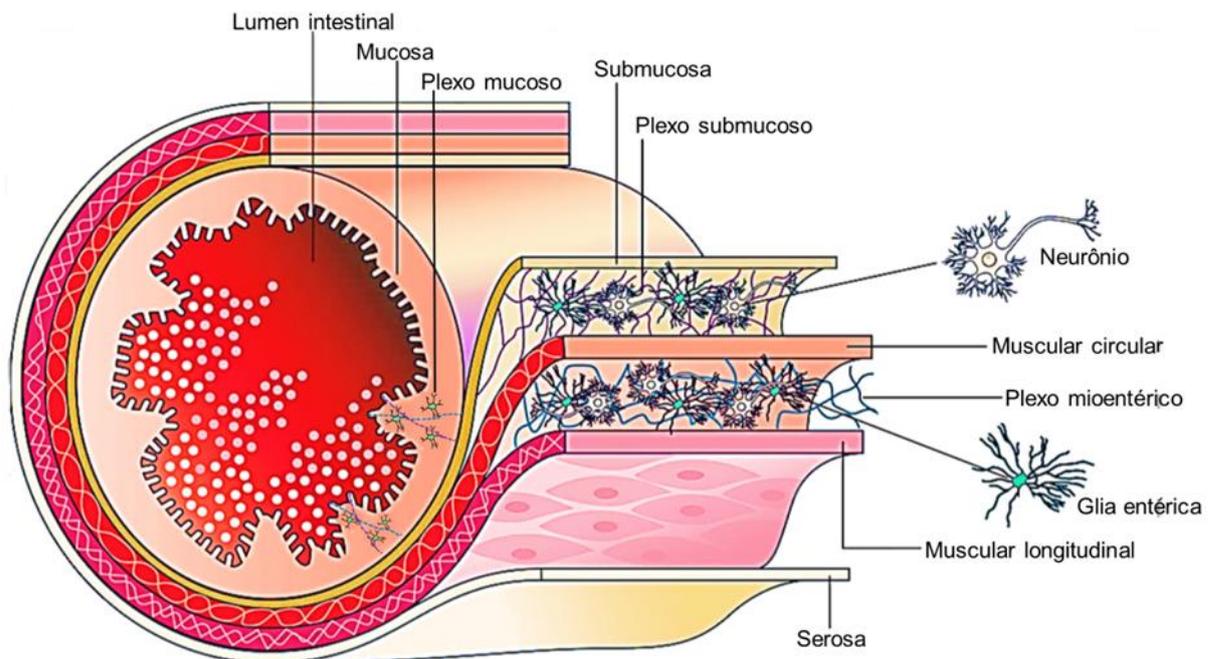
Fonte: Adaptado de Bella *et al.* (2016) e Smits *et al.* (2016). A toxina A (TcdA) e toxina B (TcdB) do *C. difficile* são formadas pelo domínio glicosiltransferase (DGT), domínio autoproteolítico (DAP), domínio de translocação (DT) e e domínio de ligação ao receptor (CROPS). As toxinas se ligam a receptores 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 ( $\text{InsP}_6$ ) 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.

Os sintomas causados pela ICD estão intimamente ligados a produção dessas toxinas (CHANDRASEKARAN; LACY, 2017). Dentre os principais sinais e sintomas, a diarreia aquosa com presença de muco e inflamação da mucosa colônica são bem documentados. Em casos de maior gravidade, ulcerações e pseudomembranas são formadas por exsudato inflamatório na mucosa do intestino grosso (RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009).

### 1.3 Células glias entéricas (CGEs)

O Sistema nervoso entérico (SNE), derivado da crista neural vagal e sacral, é formado por neurônios e células glias entéricas (CGEs) que integram o controle do reflexo intestinal (peristaltismo) e regulação de fluidos locais (GRUBISIC; GULBRANSEN, 2017). As CGEs podem ser encontradas: no plexo mucoso; no plexo submucoso (Meissner), presente na camada submucosa próximo à camada muscular circular interna; e no plexo mioentérico (Auerbach), localizado entre a camada muscular circular interna e a camada longitudinal externa (NAGY; GOLDSTEIN, 2017; OCHOA-CORTES *et al.*, 2016; VERGNOLLE, CIRILLO, 2018).

Figura 3 – Representação das camadas intestinais e localização das células glias entéricas.



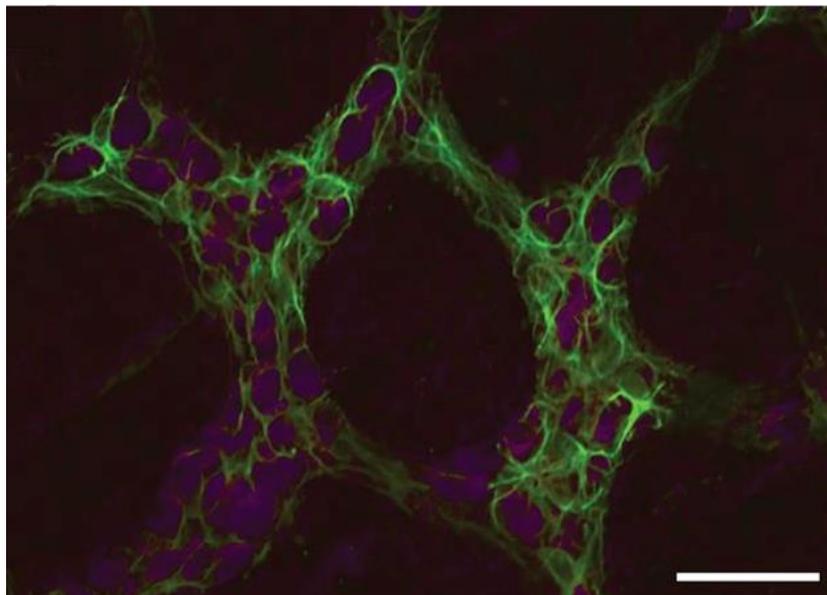
Fonte: Adaptado de Grubisic e Gulbransen (2017). O intestino é formado pela camada mucosa, submucosa, muscular (muscular circular e muscular longitudinal) e serosa. O sistema nervoso entérico é composto pelos plexos mucoso, submucoso e mioentérico. O plexo mucoso, localizado na camada mucosa, é constituído por células glias entéricas (CGEs) e terminações nervosas. O plexo submucoso pode ser encontrado na camada submucosa próximo

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.

A morfologia das CGEs se assemelha aos astrócitos do Sistema Nervoso Central (SNC). Tal semelhança foi observada primeiramente por Hanani e Reichenbach (1994), que descreveram como sendo tipo I, ou protoplasmáticos, as CGEs presentes dentro dos gânglios dos plexos mioentérico e submucoso (intraganglionares). Já o tipo II, ou fibroso, compreende as células encontradas dentro ou nas bordas das fibras interganglionares (BOESMANS *et al*, 2015; OCHOA-CORTES *et al*, 2016). Posteriormente, outros dois tipos de CGEs foram descritas, de acordo com sua morfologia e/ou localização, classificadas como tipo III ou mucosa, e o tipo IV ou intramuscular (GULBRANSEN e SHARKEY, 2012; BOESMANS *et al*, 2015).

Anteriormente, o papel funcional das CGEs se restringia como suporte estrutural para sobrevivência e diferenciação de neurônios entéricos. No entanto, nos últimos anos, estudos têm demonstrado funções complexas que vão além de uma estrutura passiva que circunda neurônios (Figura 4), mas com desempenho importante na homeostase e motilidade intestinal, com capacidade de resposta a diversos neuromediadores liberando mediadores neuroprotetores (OCHOA-CORTES *et al*, 2016, SHARKEY, 2015; NEUNLIST *et al*, 2014).

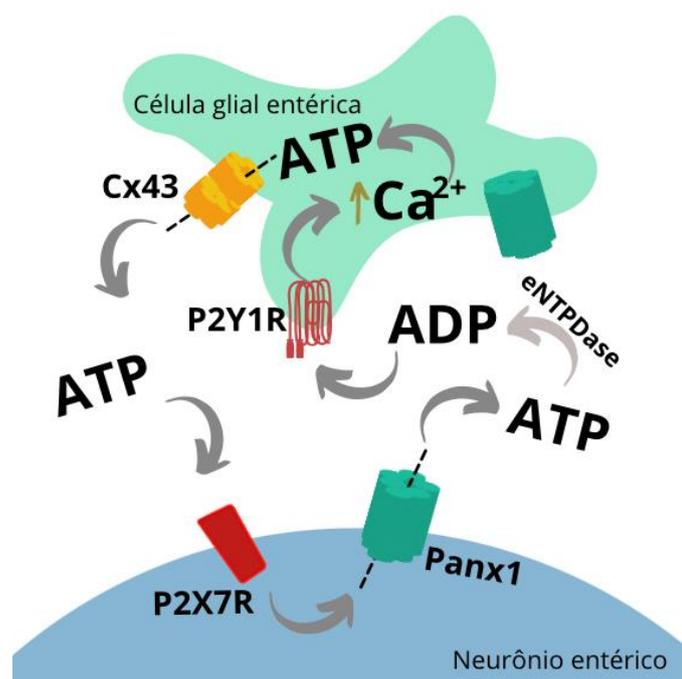
Figura 4 – CGEs em plexo mioentérico do cólon de camundongo.



Fonte: Adaptado de Sharkey (2015). CGEs (verde) ao redor dos neurônios entéricos (roxo) no plexo mioentérico do cólon de camundongo. Barra de escala: 50  $\mu$ m.CGEs.

A ativação das CGEs (Figura 5) resulta na expressão de vários receptores, como o receptor P2X7, que estão envolvidos no processo inflamatório. Tal processo se inicia com a liberação de ATP (adenosina trifosfato) por meio dos canais de Panexina-1 (Panx1), que é potencializada pela abertura dos canais de Conexina-43 (Cx43), que são ativados via sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  (SEGUELLA, L., GULBRANSEN, 2021; BROWN, I. *et al*, 2016).

Figura 5 – Representação esquemática da ativação de CGEs e abertura de canais de ATP.

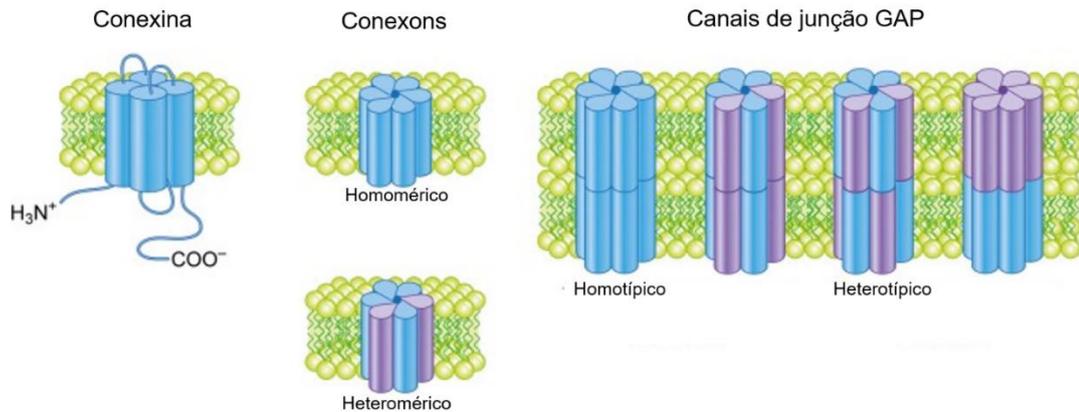


Fonte: Adaptado de Brown *et al* (2016). Ativação do receptor P2X7 conduz a liberação de ATP via abertura dos canais de Panx1, resultando em ativação do receptor glial (P2Y1) e ativação dos canais de Cx43 com liberação de ATP por meio de mecanismo dependente de CX43.

#### 1.4 Conexina-43 (Cx43)

As Conexinas são proteínas que compõem as junções comunicantes do tipo GAP, sendo 20 tipos, identificados até o momento, expressos em humanos e camundongos. A união de 6 Conexinas formam um hemicanal chamado conaxon (Figura 6). Esse conaxon pode ser homomérico, constituído por um único tipo de Conexina, ou pode ser heteromérico, formado por diferentes Conexinas. O acoplamento dos hemicanais de conaxon formam um canal e, vários canais, constituem a junção comunicante entre células (GAP) que permitem a passagem de íons, metabólitos e moléculas que atuam como segundo mensageiros (KAMERITSCH; POGODA, 2020; WONG *et al*, 2019).

Figura 6 – Representação esquemática da constituição dos canais de junção GAP.



Fonte: Adaptado de Totland *et al* (2020). Canais de junção do tipo GAP formados por hemiconexons denominados conexons, estes últimos constituídos por Conexinas.

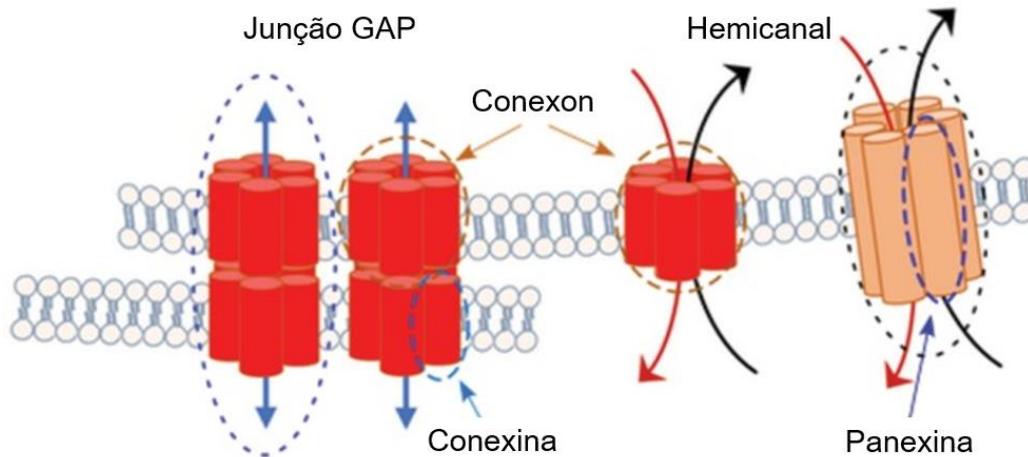
A Conexina-43 (Cx43) está presente em vários tecidos intestinais como células musculares, epiteliais e CGEs (MAES *et al*, 2015; WONG *et al*, 2019). Embora ainda não esteja totalmente elucidado, a Cx43 parece contribuir para disfunções visceral e motora em condições inflamatórias do trato gastrointestinal (TGI). Além disso, níveis elevados de Cx43 podem causar efluxo de eletrólitos intracelulares e, por conseguinte, aumentar a quantidade de água no lúmen, contribuindo para o quadro diarreico (WONG *et al*, 2019).

### 1.5 Panexina-1 (Panx1)

A família de Panexinas foi identificada pela primeira vez por Panchin *et al*, 2000. Esta família é constituída por três tipos de Panexinas expressas em camundongos e humanos: Panexina-1 (Panx1), Panexina-2 (Panx2) e Panexina-3 (Panx3). As Panexinas são proteínas que participam da comunicação entre a célula e o meio extracelular, sendo a Panx1 uma das mais bem investigada (JALALEDDINE *et al*, 2019).

A Panx1 está localizada, principalmente, na membrana celular e apresenta semelhanças estrutural e funcional com a Cx43 (Figura 7) (MAKARENKOVA *et al*, 2018; PENUELA, GEHI, LAIRD, 2013). Funcionalmente, a Panx1 é considerada um mediador na liberação extracelular de ATP e é frequentemente associada ao receptor purinérgico P2X7, cuja ativação pode desencadear a morte celular e alterações na expressão de citocinas pró-inflamatórias, como a Interleucina-6 (IL-6) (DIEZMOS *et al*, 2018).

Figura 7 – Representação esquemática das estruturas de Panexina e Conexina.



Fonte: Adaptado de Makarenkova *et al* (2018). Canais de Panexina com semelhança estrutural à Conexina presentes na membrana celular.

Os canais de Panx1, assim como de Cx43, medeiam a liberação de ATP que resulta na intensificação da resposta inflamatória, ocasionando processos deletérios como a morte celular (KAMERITSCH; POGODA, 2020). Apesar da crescente quantidade de estudos sobre Conexinas e Panexinas, pouco se sabe sobre a participação desses canais nos efeitos celulares das toxinas do *C. difficile*.

### 1.6 Efeitos das toxinas do *C. difficile* em componentes do SNE

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; CASTAGLIUOLO *et al.*, 1994; KEATES *et al.*, 1998).

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 induzindo 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 peptídeo vasoativo intestinal (VIP) por neurônios entéricos do plexo submucoso via IL-1 $\beta$  (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).

Resultados do nosso grupo de pesquisa, ainda não publicados, concluíram que TcdA induz aumento da expressão do receptor P2X7 no íleo de camundongos e promove perda de neurônios entéricos via ativação desse receptor purinérgico (SANTOS, 2017). Outro estudo mostrou que TcdA e TcdB aumentam a expressão do receptor P2X7, cuja ativação resultou em suprarregulação da expressão de IL-6 e morte celular de CGEs via ativação de PI3K e caspase-3, respectivamente (MOURA NETO, 2019). Como mostrado por um recente estudo do nosso grupo, a sinalização S100B/RAGE/PI3K/NF $\kappa$ B e S100B/STAT3 contribuíram, respectivamente, para a expressão de IL-6 e morte celular induzidos por TcdA e TcdB em CGEs (COSTA, 2019). No entanto, o papel da Cx43 e Panx1 nos efeitos de TcdA e TcdB em CGEs não foi elucidado por estudos anteriores.

## 2 JUSTIFICATIVA

A ICD é uma das principais causas de diarreia nosocomial, sobretudo, nos países desenvolvidos. Um estudo retrospectivo de caso-controle realizado em 8 hospitais de Países latino-americanos (Argentina, Brasil, Chile e México) constatou que pacientes com ICD apresentaram risco de morte maior que três vezes e tempo de permanência geral no hospital de 14,5 dias a mais, em comparação com pacientes sem a infecção (YU *et al.*, 2021).

Estima-se que 453,000 casos, 83,000 recorrências e 15,000 mortes ocorrerão anualmente, gerando gastos de aproximadamente 40 bilhões de dólares (BARTLETT, 2017; LESSA; WINSTON; MCDONALD, 2015).

Pacientes apresentando colite infecciosa por *C. difficile* exibem aumento da expressão proteica e da imunomarcagem de GDNF e GFAP, ambos expressos pela glia entérica do intestino, na mucosa colônica inflamada (VON BOYEN *et al.*, 2011).

A interação de CGEs e neurônios entéricos pode ser mediada por diversas moléculas ativas, como por acetilcolina, serotonina (5-HT) e ATP. Este último, quando liberado por CGEs, promove a ativação de receptores P2X7 em neurônios que potencializa a inflamação e morte celular, alterando o papel regulador das CGEs na motilidade gastrointestinal (BOESMANS *et al.*, 2013; BROWN *et al.*, 2016; GRUBISIC *et al.*, 2018). Adicionalmente, o nosso grupo mostrou aumento da expressão de receptores P2X7 e de IL-6 envolvidos no processo inflamatório desencadeados pelas TcdA e TcdB em CGEs (COSTA, 2019; MOURA NETO, 2019; SANTOS, 2017).

Além disso, um estudo com militares dos EUA, entre 1998 e 2010, demonstrou que pacientes com ICD apresentavam risco aumentado para distúrbios gastrointestinais funcionais, como síndrome do intestino irritável, doença do refluxo gastroesofágico (DRGE), dispepsia e constipação, dentro de três meses após o primeiro episódio de infecção (GUTIERREZ *et al.*, 2015).

O papel da glia entérica na patogênese da lesão intestinal por toxinas do *C. difficile*, incluindo as dismotilidades gastrointestinais, é uma ampla área de pesquisa ainda pouco explorada e pode revelar alvos terapêuticos e profiláticos voltados para ICD.

Desse modo, este trabalho se propôs identificar alterações da expressão de Cx43 e Panx1 durante a ICD e seu papel na morte celular e na expressão do mediador inflamatório IL-6 induzidos pelas TcdA e TcdB.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

- Investigar alterações na expressão de Cx43 e Panx1 no cécum e cólon de camundongos com ICD, bem como esclarecer o papel desses canais na morte celular e expressão de *IL-6* induzidos por TcdA e TcdB em CGEs.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Investigar a expressão de Cx43 e Panx1 no cécum e cólon de animais infectados pelo *C. difficile*;
- Verificar a expressão de Cx43 e Panx1 em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB;
- Avaliar o papel da Cx43 (via inibição desse canal mediada pelo GAP19) na morte celular e expressão de *IL-6* induzidos por TcdA e TcdB em CGEs;
- Avaliar o papel da Panx1 (via inibição desse canal mediada pelo 10Panx) na morte celular e expressão de *IL-6* induzidos por TcdA e TcdB em CGEs;

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Fármacos, reagentes, materiais e soluções utilizados no estudo

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

### 4.2 Experimentos in vivo

#### 4.2.1 Aspectos éticos em pesquisa animal

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

#### 4.2.2 Animais

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

#### 4.2.3 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 abdominal, é uma cepa do toxinótipo 0, ribotipo 087 e positiva para *tcdA* e *tcdB* e negativa para *cdtB*. Para a preparação do inóculo, inicialmente, 100µL do estoque de *C. difficile* VPI10463 (em fase de esporo em caldo de carne picada, CCP) foi adicionado em CCP (10 mL). Para atingir um crescimento de fase log, a amostra foi incubada por 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

$10^5$  UFC (Unidades formadoras de colônia) de *C. difficile* VPI10463/100 $\mu$ L, realizou-se uma diluição de 1:100 (bactéria em suspensão: CCP). A leitura de densidade óptica de 1,0 foi considerada ser equivalente a  $10^8$  UFC/ml.

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

#### 4.2.4 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 = 6 para cada grupo) foram pré-tratados por três dias 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. Vinte e quatro horas (24h) após o término desse pré-tratamento, os camundongos receberam clindamicina (32 mg/kg) por via intraperitoneal. Após 24h da administração de clindamicina, os camundongos receberam  $10^5$  UFC da forma vegetativa de *C. difficile* VPI10463 em CCP por gavagem. Ao grupo controle foi administrado apenas CCP. O peso e o desenvolvimento dos sintomas da doença de cada animal foram monitorizados diariamente. Animais moribundos ou com perda > 20% do peso corporal foram eutanasiados. Os animais foram eutanasiados três dias após inoculação de *C. difficile*.

#### 4.2.5 Grupos experimentais para o modelo de infecção

Os camundongos submetidos ao modelo de ICD foram divididos em dois grupos:

- Grupo controle (n=6): camundongos C57BL/6 submetidos ao mesmo protocolo experimental dos animais infectados por *C. difficile*, porém receberam apenas CCP por gavagem no dia 0 da infecção.
- Grupo infectado por *C. difficile* (ICD) (n=6): camundongos C57BL/6 submetidos ao modelo de ICD, recebendo  $10^5$  UFC de *C. difficile* VPI10463 no dia 0 da infecção.

Os animais foram eutanasiados, três dias após a infecção por meio do uso de cetamina e xilazina (180 e 15 mg/kg, i.p.), conforme demonstrado na figura 8.



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. 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 Cx43 ou Panx1, 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:

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

### 4.3 Experimentos in vitro

#### 4.3.1 Cultura de CGEs

A linhagem de CGEs imortalizadas obtidas da ATCC (PK060399egfr, CRL 2690). Essas células são aderentes provenientes do jejuno de *Rattus norvegicus* 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 µg/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina) e 1 mM de piruvato de sódio, sendo mantidas em incubadora a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. 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 e fármacos em CGEs

As CGEs foram incubadas com TcdA (50 ng/mL) ou TcdB (1 ng/mL) proveniente da Techlab por 2, 12 e/ou 18h de incubação. Para estudar o papel de Cx43 nas alterações induzidas por TcdA e TcdB em CGEs, as células foram incubadas com Gap19 *trifluoroacetate* (1 e 10  $\mu$ M), um inibidor de Cx43, uma hora antes da incubação com as TcdA e TcdB. Para verificar a participação de Panx1, CGEs foram pré-tratadas com 10Panx *trifluoroacetate* (10 e 50  $\mu$ M), um inibidor de Panx1, uma hora antes da incubação com as TcdA e TcdB.

### 4.3.3 Parâmetros avaliados no estudo in vitro

#### 4.3.3.1 Ensaio de viabilidade celular

Para definir as concentrações de GAP19 e 10Panx capazes de não afetar a viabilidade de CGEs em 18h de incubação, realizou-se o ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT). As CGEs ( $5 \times 10^3$  células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços e após 24h foram incubadas com GAP19 (1, 10, 100, 300 e 1000 $\mu$ M) ou 10Panx (1, 10, 100 e 300 $\mu$ M) por 18h de incubação. Em seguida, as células foram incubadas com MTT (0,5 mg/mL reconstituído em DMEM suplementado) por 2h a 37°C em incubadora úmida sob condição de 5% de CO<sup>2</sup>. Após remoção da solução de MTT, 150  $\mu$ l 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.

#### 4.3.3.2 Expressão Gênica de Cx43, Panx1 e IL-6 por qPCR

Para avaliar a expressão gênica de Cx43, Panx1 e IL-6 em CGEs expostas à TcdA e TcdB, realizou-se qPCR. CGEs ( $6 \times 10^5$  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 Cx43, Panx1, IL-6 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 1 - Primers utilizados no qPCR

<b>Cx43</b>	
Forward	CCCCACTCTCACCTATGTCTCC
Reverse	ACTTTTGCCGCCTAGCTATCCC
<b>Panx1</b>	
Forward	CAAGGGAGAGGACCAGGGC
Reverse	ATCTATTCTTCTATGACGCTG
<b>IL-6</b>	
Forward	GCCAGAGTCATTCAGAGCAATA
Reverse	GTTGGATGGTCTTGGTCCTTAG
<b>GAPDH</b>	
Forward	AGACAGCCGCATCTTCTTGT
Reverse	CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT

Fonte: Elaborado pela autora.

#### 4.3.3.3 Avaliação da expressão proteica de Cx43

A expressão da proteica de Cx43 em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB foi avaliada por meio de Western Blotting. CGEs (6x10<sup>5</sup> 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 (Thermo Fisher Scientific, 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. 40 µg de proteína (previamente preparadas com Laemmil sample buffer e β-mercaptoetanol) foram desnaturadas a 95°C durante 5 min, separadas em gel

BIS-Tris 10% e transferido para membranas de PVDF por 2 h. Após bloqueio com 5% de solução de bloqueio (BioRad) em temperatura ambiente por 1 h, as membranas foram incubadas overnight com os anticorpos primários (anti- $\alpha$ -tubulina, Sigma, T8203, 1:500; anti-Cx43, R&D system, PPS045, 1:400; e Panx1, Invitrogen, 488100, 1:333) a 4°C sob agitação. No dia seguinte, as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários (anti-mouse 1:500 e anti-rabbit 1:500) por 2 h. As membranas foram lavadas em solução salina tamponada com Tris contendo Tween 20 a 0,05% (TSB-T) e incubadas com ECL. O sinal de quimioluminescência foi detectado utilizando o sistema ChemiDoc (BioRad). A quantificação densitométrica das bandas foi realizada utilizando o software ImageJ.

#### **4.3.3.4 Avaliação da atividade de caspase 3/7**

Para avaliar a ativação de caspase-3 e 7 em CGEs incubadas com TcdA ou TcdB, recebendo ou não Gap19 ou 10Panx realizou-se um ensaio de atividade de caspase 3/7 conforme descrito pelo fabricante (caspase-Glo 3/7, Promega). Primeiramente, CGEs (104 células/ poço) foram plaqueadas em placas brancas e opacas de 96 poços (Falcon). Após 24h, as células foram incubadas com TcdA (50 ng/mL) ou TcdB (1 ng/mL) isoladamente ou precedida por Gap19 (1 ou 10 $\mu$ M) ou 10Panx (10 e 50  $\mu$ M). Após 18h de incubação, a placa de 96 poços contendo as células tratadas foram retiradas da incubadora e colocadas em temperatura ambiente por 10 min. Em seguida, adicionaram-se 100  $\mu$ L de reagente de caspase-Glo 3/7 (substrato de caspase-Glo 3/7 reconstituído em tampão de caspase-Glo 3/7, equilibrado em temperatura ambiente antes do uso) a cada poço, agitou-se a placa num agitador de placas por 30s em 500 rpm e incubou-se por 2h em temperatura ambiente e protegido da luz. A luminescência foi mensurada por meio de um luminômetro (NanoLuc technology, PROMEGA). Para a obtenção da unidade de luminescência relativa (ULR), o sinal de luminescência de todas as amostras foi subtraído pela luminescência intrínseca do reagente de caspase-Glo 3/7 (poço apenas com DMEM suplementado e reagente de caspase-Glo 3/7 sem células).

#### **4.3.3.5 Ensaio de ligação fosfatidilserina-anexina V**

Para avaliar apoptose em CGEs incubadas com TcdA ou TcdB, realizou-se um ensaio de ligação fosfatidilserina-anexina V em tempo real em células vivas conforme descrito pelo fabricante (ensaio em tempo real Glo-anexina V apoptose, Promega). Primeiramente, CGEs

(104 células/ poço) foram plaqueadas em placas brancas e opacas de 96 poços (Falcon). Após 24h, as células foram incubadas com TcdA (50 ng/mL) ou TcdB (1 ng/mL) isoladamente ou precedida por Gap19 (1  $\mu$ M) ou 10Panx (50  $\mu$ M). Em seguida, adicionaram-se 100  $\mu$ L de reagente de detecção 2x (2  $\mu$ L do substrato de anexina NanoBit, 2  $\mu$ L CaCl<sub>2</sub>, 2  $\mu$ L anexina V-SmBit e 2  $\mu$ L anexina V-LgBit em 1000  $\mu$ L de DMEM suplementado pré-aquecido a 37°C) a cada poço, sendo incubadas a 37°C numa incubadora umidificada sob 5% CO<sub>2</sub> condição. A luminescência foi mensurada por meio de um luminômetro (NanoLuc technology, PROMEGA). Para a obtenção da unidade de luminescência relativa (ULR), o sinal de luminência de todas as amostras foi subtraído pela luminescência intrínseca do reagente de detecção (poço apenas com DMEM suplementado sem células).

#### **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 a comparação de dois grupos; teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey para comparar mais de dois grupos; Two-way ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. O nível de significância adotado foi de 0,05 ( $\alpha = 5\%$ ) e níveis descritivos (p) inferiores a esse valor foram considerados significantes.

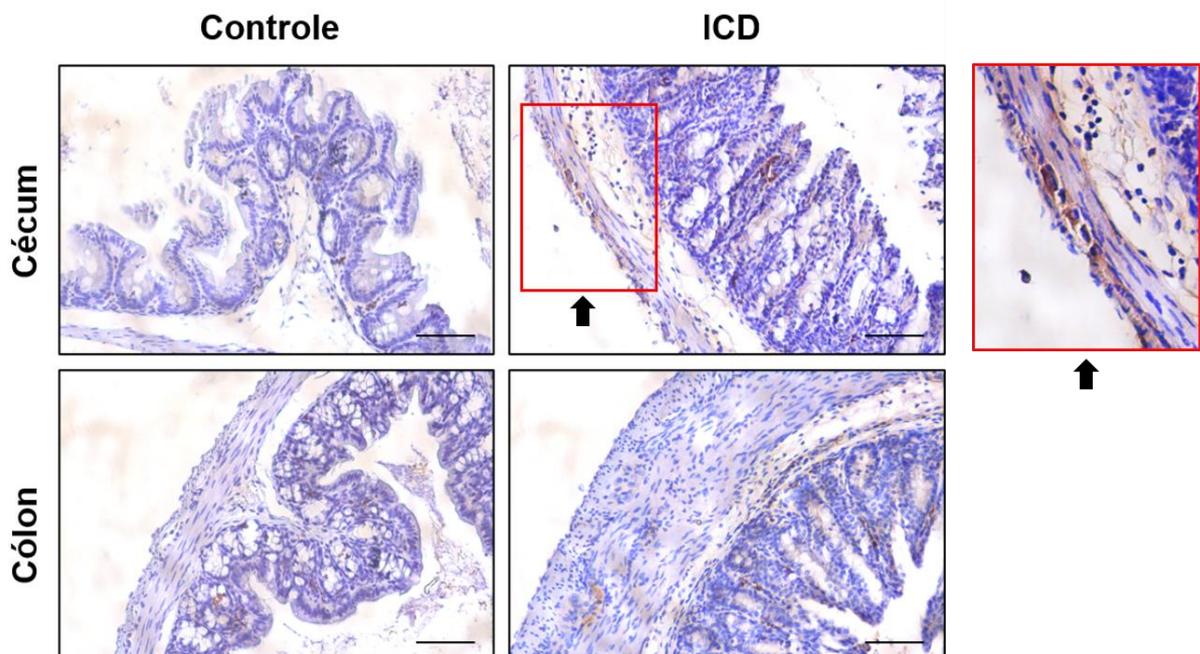
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Alterações da expressão de Cx43 em amostras de cólon e cécum de camundongo com ICD

Dado que o cécum e cólon são as porções do intestino mais afetadas pela ICD, investigou-se se a ICD altera a expressão de Cx43 em amostras intestinais de camundongos por meio da técnica de imunohistoquímica.

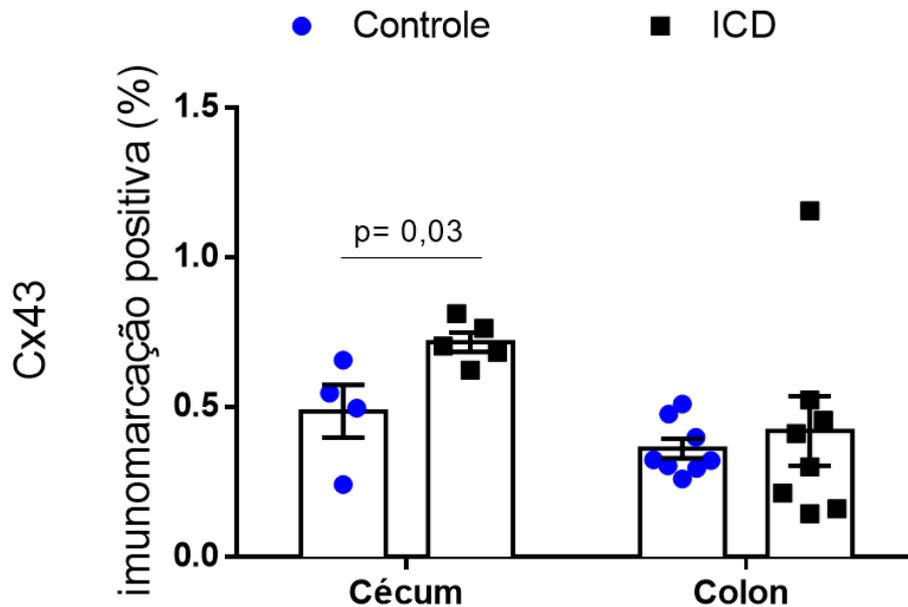
Conforme apresentado na figura 9, amostras de cécum e cólon de camundongos com ICD apresentaram imunomarcção para Cx43 comparado ao grupo controle. Ao mensurar a imunomarcção positiva para Cx43 nessas amostras, observou-se que ICD aumentou no cécum ( $p = 0,03$ , Figura 10), mas não no cólon, comparado ao grupo controle. Esse aumento de Cx43 foi evidenciado na lâmina própria e plexo mioentérico (Figura 9).

Figura 9 – Imunomarcção de Cx43 em amostras de cécum e cólon de camundongos submetidos à ICD.



Os painéis representam imagens de imunohistoquímica para Cx43 em tecidos de cólon e cécum de camundongos com ICD (infecção pelo *C. difficile*). Amostras de tecido de cécum e cólon de animais que receberam somente CCP são representadas pelo grupo controle (Barra=100  $\mu\text{m}$ ).

Figura 10 - ICD aumenta imunomarcção de Cx43 no cécum, mas não no cólon de camundongos.



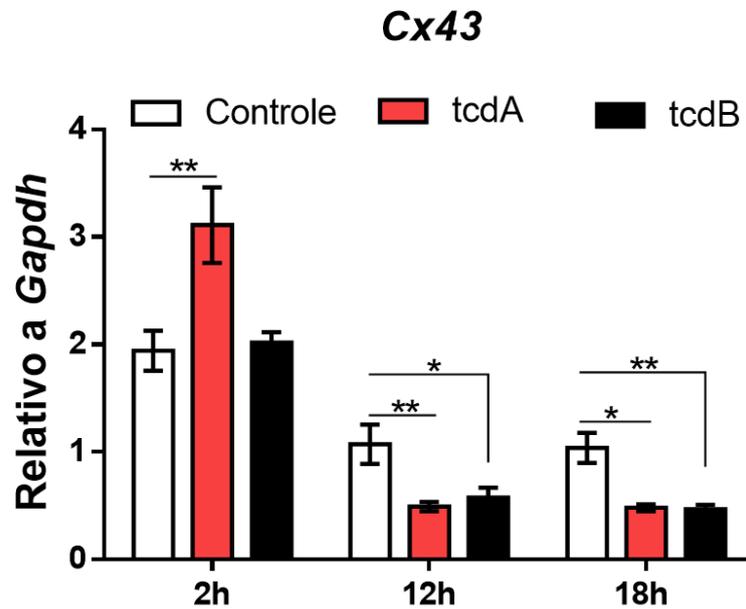
O gráfico representa a média  $\pm$  EPM da porcentagem da área imunopositiva para Cx43 no cécum e cólon de camundongos submetidos à ICD (grupo ICD) e não infectados (grupo controle) em relação à área total. Teste t de Student, onde o valor de  $p$  encontra-se representado no gráfico.

### 5.1.2 Alterações da expressão de Cx43 em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB *in vitro*

Dentre os diversos tipos celulares presentes no intestino, a CGE é uma das principais células que expressam Cx43 (MCCLAIN *et al.*, 2014). Devido essas células desempenharem importantes funções no intestino em condições normais e patológicas, bem como a sua interação com diversos tipos celulares, questionou-se se TcdA e TcdB alteravam a expressão de Cx43 em CGEs *in vitro*.

Conforme apresentado na figura 11, TcdA, mas não TcdB, elevou de forma estatisticamente significativa a expressão gênica de Cx43 em CGEs no tempo de 2h, comparado ao grupo controle. Contudo, TcdA ( $p < 0,0001$ ) e TcdB ( $p < 0,001$ ) reduzem a expressão gênica de Cx43 após 12h de incubação comparada ao grupo controle (Figura 11).

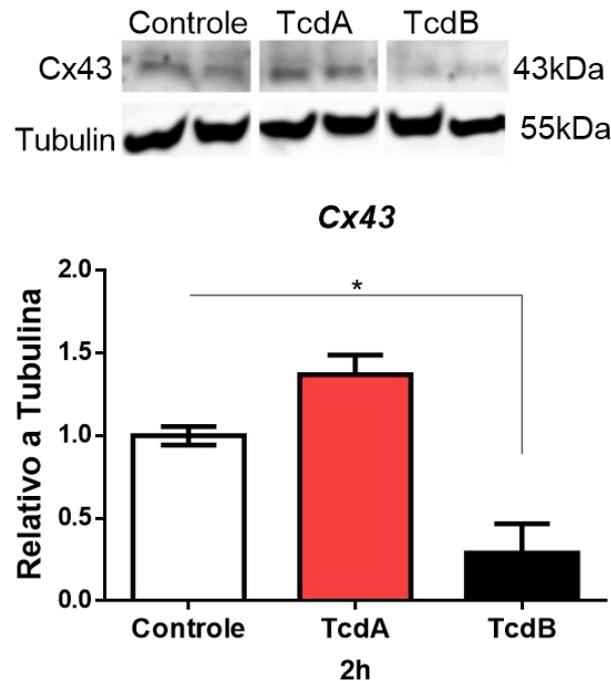
Figura 11 - TcdA e TcdB alteram a expressão gênica de *Cx43* em CGEs *in vitro*.



A expressão relativa de *Cx43* em CGEs desafiadas com TcdA (50 ng/mL) e TcdB (1 ng/mL) foi avaliada por qPCR após 2, 12 e 18h de incubação. Barras representam a média  $\pm$  EPM (n=3). Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Tukey. \*p<0,001 e \*\*p<0,0001.

A análise por western blotting revelou que TcdA tende a aumentar de forma expressiva os níveis proteicos de *Cx43* em CGEs no tempo de 2h comparado às células controle (Figura 12), enquanto TcdB reduziu os níveis proteicos de *Cx43* em CGEs em comparação com o grupo controle no tempo de 2h de incubação (figura 12).

Figura 12 - Expressão proteica de Cx43 em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB *in vitro*.



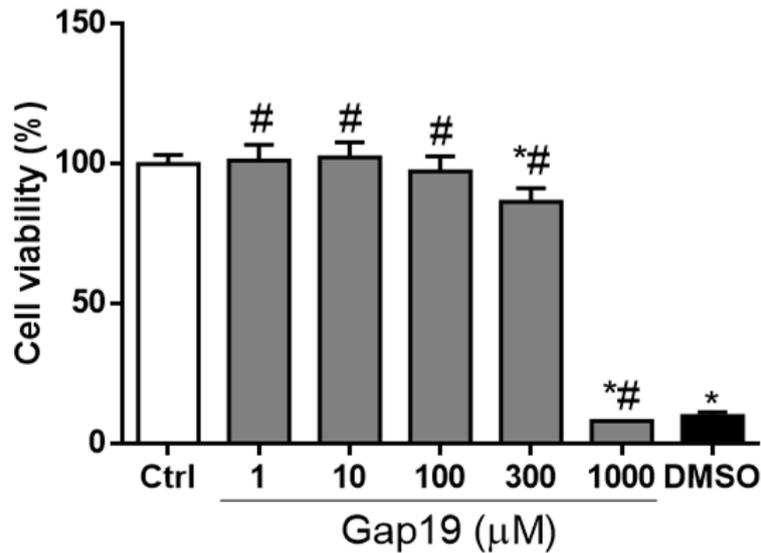
A expressão proteica de Cx43 em CGEs expostas à TcdA (50 ng/mL) e TcdB (1 ng/mL) foi avaliada por Western Blotting. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM da expressão proteica de Cx43 relativo a  $\alpha$ -tubulina. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Tukey. \* $p < 0,001$  e \*\* $p < 0,0001$ .

### 5.1.3 Viabilidade de CGEs expostas ao inibidor de Cx43 (Gap19) *in vitro*

Para identificar as melhores concentrações do inibidor de Cx43 (Gap19), foi avaliada a viabilidade de CGEs expostas a diferentes concentrações de Gap19 por 18h de incubação. Viabilidade celular foi determinada por meio do ensaio de MTT.

Observou-se que as concentrações de 300 e 1000  $\mu$ M reduziram a viabilidade celular das CGEs comparado ao grupo controle. No entanto, somente as concentrações de 1, 10 e 100  $\mu$ M foram viáveis por não apresentarem diferença estatística com o grupo controle e serem estatisticamente diferentes do grupo DMSO. Posteriormente, foram escolhidas as concentrações de 1 e 10  $\mu$ M para a execução do estudo (Figura 13).

Figura 13 – Efeito do Gap19 na Viabilidade de CGEs *in vitro*.



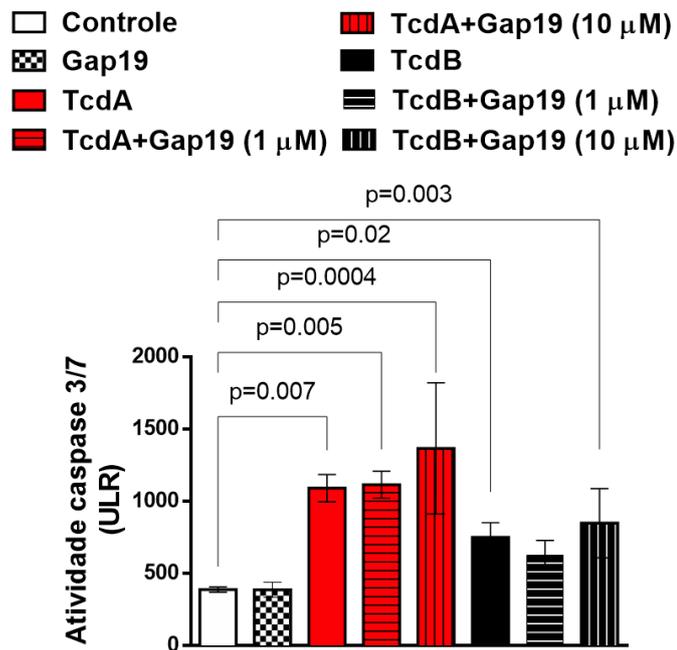
Ensaio de viabilidade celular realizado em CGEs incubadas com Gap19 (1, 10, 100, 300 e 1000 $\mu$ M), apenas com meio (grupo controle) ou com DMSO (grupo controle de morte) por 18h. A viabilidade celular foi determinada por meio do ensaio de MTT. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Tukey. \* $p < 0,0001$  versus o grupo controle e # $p < 0,0001$  versus o grupo DMSO.

#### 5.1.4 Efeito do inibidor de Cx43 na atividade de caspase 3/7 e marcação da fosfatidilserina com anexina V em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB *in vitro*

Estudo anterior mostrou que TcdA e TcdB induzem morte de CGEs (COSTA, 2019). Para investigar a participação de Cx43, mediante o uso do inibidor de Cx43 (Gap19), no aumento da atividade das caspase 3/7 induzidos por TcdA e TcdB em CGEs, quantificou-se os níveis dessas caspases por luminescência.

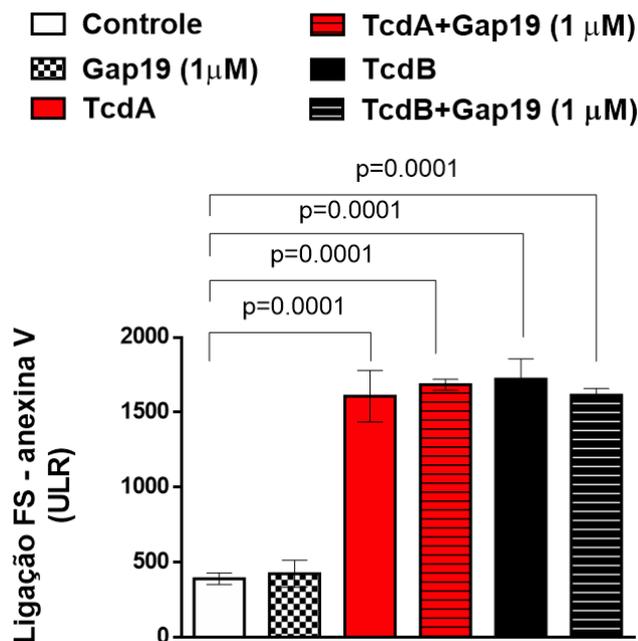
O inibidor de Cx43 (Gap 19, 1 e 10  $\mu$ M) não reduziu a atividade de caspase 3/7 induzidas por TcdA e TcdB em CGEs (Figura 14). Além disso, o Gap19 não reduziu a marcação de fosfatidilserina com anexina V induzidas por ambas as toxinas em CGEs (Figura 15).

Figura 14 - Inibidor de Cx43 não reduz a atividade de caspase 3/7 induzida por TcdA e TcdB em CGEs.



A atividade de caspase 3/7 em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB, previamente incubadas ou não com inibidor de Cx43 (Gap19, 1 e 10 μM), por 18h. O grupo controle são CGEs incubadas apenas com meio de cultivo. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Tukey, onde o valor de  $p$  encontra-se representado no gráfico.

Figura 15 - Inibidor de Cx43 não diminui a formação de ligações fosfatidilserina-anexina V em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB.



A formação de ligações fosfatidilserina (FS)-anexina V, um marcador de morte celular, foi avaliada por meio do ensaio de ligação FS-anexina V em tempo real em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB, previamente incubadas ou

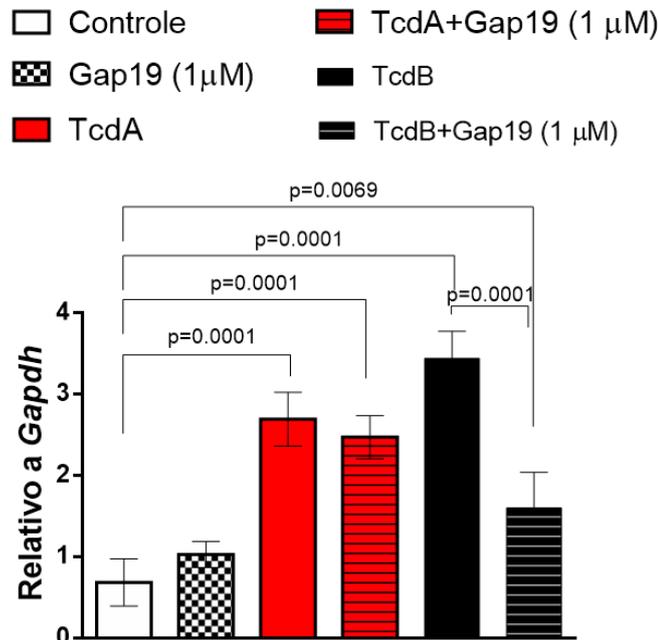
não com inibidor de Cx43 (Gap19, 1  $\mu$ M), por 18h. O grupo controle são CGEs incubadas apenas com meio de cultivo. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM (n=5). A unidade de luminescência relativa (ULR) é proporcional à quantidade de ligação FS-anexina V. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Tukey, onde o valor de  $p$  encontra-se representado no gráfico.

### 5.1.5 Efeito do inibidor de Cx43 na expressão da citocina pleiotrópica IL-6 em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB *in vitro*

Sendo as CGEs uma importante fonte de IL-6, investigou-se o papel de Cx43 na expressão dessa citocina pleiotrópica (YANG *et al.*, 2018). Conforme apresentado na figura 16, o inibidor de Cx43 (Gap19, 1  $\mu$ M) diminuiu a expressão gênica de *IL-6* em CGEs desafiadas com TcdB ( $p = 0,0001$ ), mas não por TcdA comparado ao grupo controle.

Em conjunto, esses dados sugerem que Cx43 não previne a morte de CGEs induzida por TcdA e TcdB, mas reduz a expressão da citocina pleiotrópica IL-6 em CGEs desafiadas com TcdB.

Figura 16 - Inibidor de Cx43 diminui a expressão de *IL-6* em CGEs desafiadas por TcdB, mas não por TcdA.

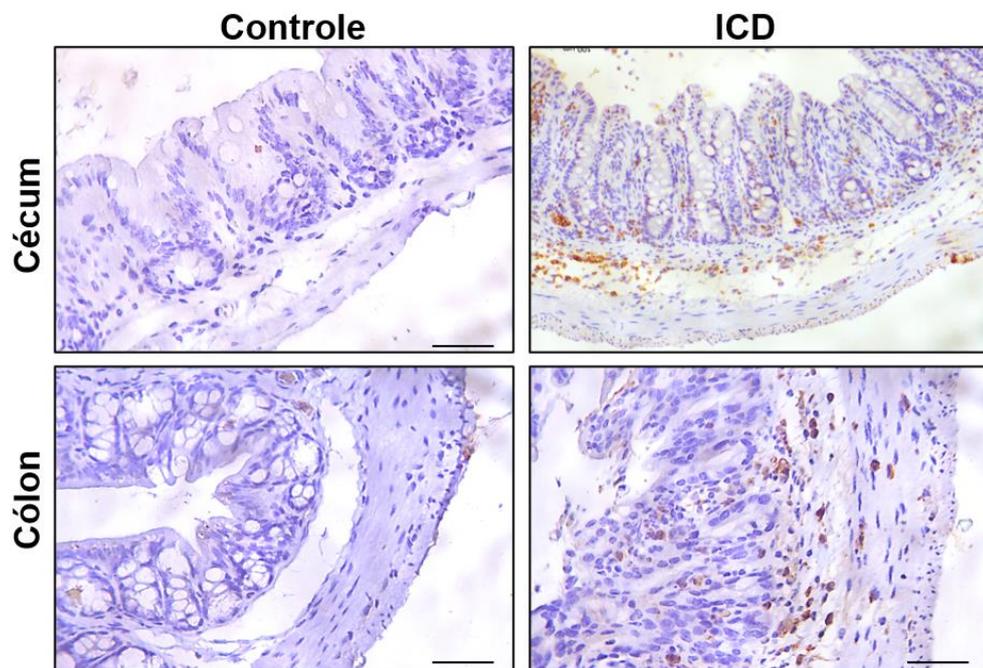


Expressão gênica de *IL-6* foi avaliada por qPCR em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB, previamente incubadas ou não com inibidor de Cx43 (Gap19, 1  $\mu$ M), por 18h. O grupo controle são CGEs incubadas apenas com meio de cultivo. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM (n=5). Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Tukey, onde o valor de  $p$  encontra-se representado no gráfico.

## 5.2 Alterações da expressão de Panx1 em amostras de cólon e cécum de camundongo com ICD

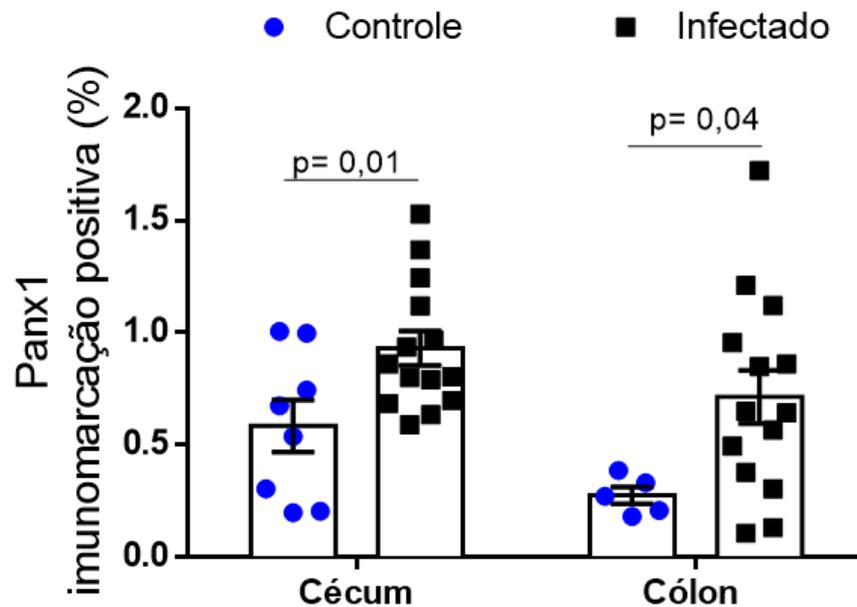
Conforme apresentado na figura 17, amostras de cécum e cólon de camundongos com ICD apresentaram aumento notório de imunomarcação na lâmina própria e na submucosa para Panx1 comparado ao grupo controle. Ao mensurar a imunomarcação positiva para Panx1 nessas amostras, observou-se que ICD aumentou no cécum ( $p = 0,01$ , Figura 18) e no cólon ( $p = 0,04$ ), comparado ao grupo controle.

Figura 17 - Imunomarcação de Panx1 em amostras de tecido de cécum e cólon de camundongos submetidos à ICD.



Os painéis representam imagens de imunohistoquímica para Panx1 em tecidos de cólon e cécum de camundongos com ICD (infecção pelo *C. difficile*). Amostras normais de cécum e cólon são representadas pelo grupo controle (100  $\mu\text{m}$ ).

Figura 18 - ICD aumenta imunomarcção de Panx1 no cécum e cólon de camundongos.

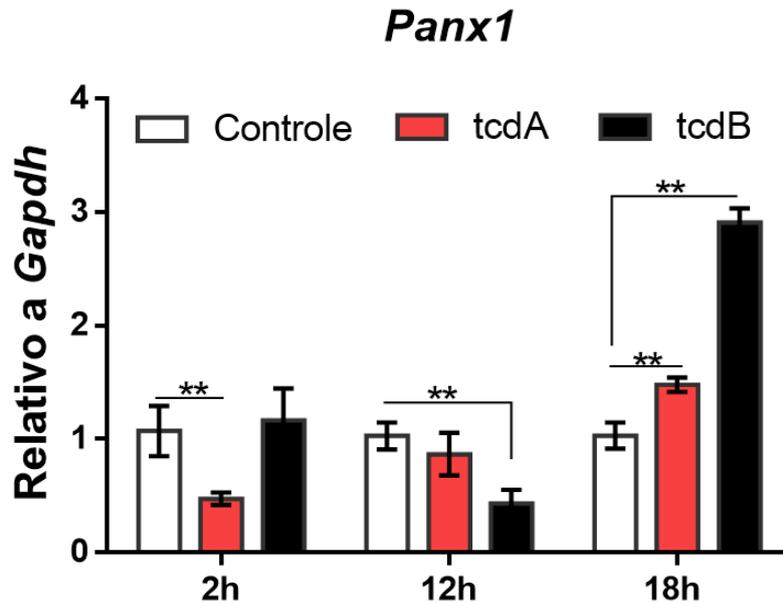


O gráfico representa a média  $\pm$  EPM da porcentagem da área imunopositiva para Panx1 no cécum e cólon de camundongos submetidos à ICD (grupo ICD) e não infectados (grupo controle) em relação à área total. Teste t de Student, onde o valor de  $p$  encontra-se representado no gráfico.

### 5.2.1 Alterações da expressão de Panx1 em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB *in vitro*

A figura 19 mostra que TcdA e TcdB elevaram de forma estatisticamente significativa a expressão gênica de *Panx1* em CGEs no tempo de 18h, comparado ao grupo controle. Contudo, TcdA ( $p < 0,0001$ ) e TcdB ( $p < 0,0001$ ) reduzem a expressão gênica de *Panx1* nos tempos de 2h e 12h de incubação, respectivamente, comparado ao grupo controle (Figura 19).

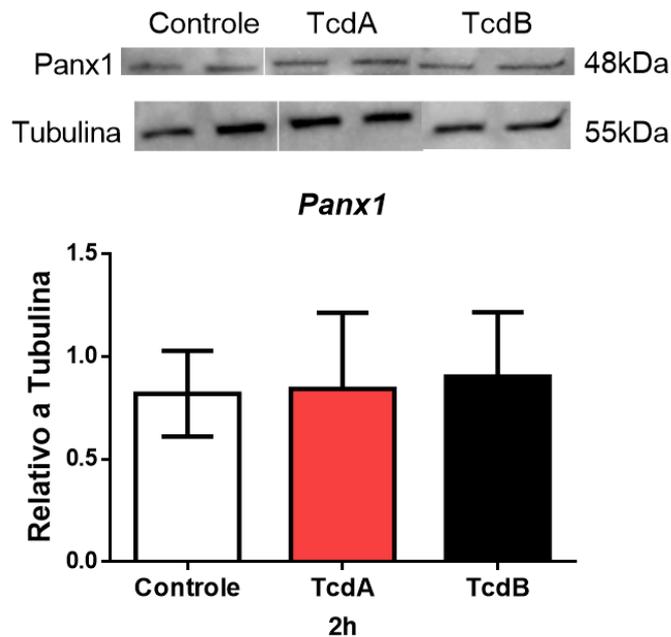
Figura 19 - TcdA e TcdB alteram a expressão gênica de *Panx1* em CGEs *in vitro*.



A expressão relativa de *Panx1* em CGEs desafiadas com TcdA (50 ng/mL) e TcdB (1 ng/mL) foi avaliada por qPCR após 2, 12 e 18h de incubação. Barras representam a média  $\pm$  EPM (n=3). Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Tukey.  $**p < 0,0001$ .

A análise por western blotting não revelou alteração nos níveis proteicos de Panx1 em CGEs no tempo de 2h, em comparação ao grupo controle (Figura 20).

Figura 20 - Expressão proteica de Panx1 em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB *in vitro*.



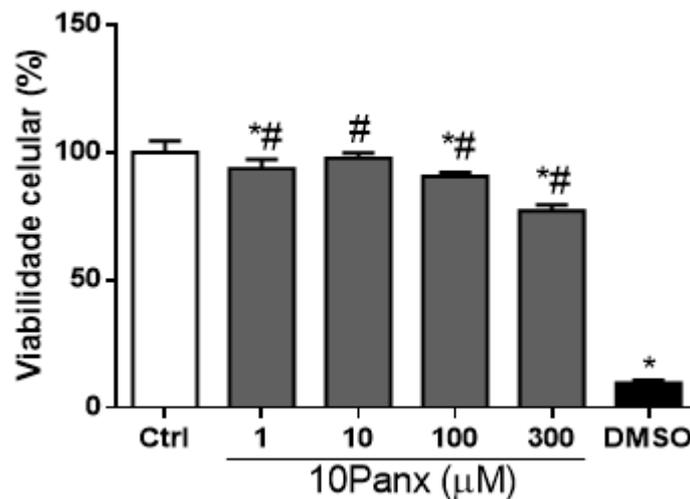
A expressão proteica de Panx1 em CGEs expostas à TcdA (50 ng/mL) e TcdB (1 ng/mL) foi avaliada por Western Blotting. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM da expressão proteica de Panx1 relativo a  $\alpha$ -tubulina. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Tukey.

### 5.2.2 Viabilidade de CGEs expostas ao inibidor de Panx1 (10Panx) *in vitro*

Para identificar as melhores concentrações do inibidor de Panx1 (10Panx), foi avaliada a viabilidade de CGEs expostas a diferentes concentrações de 10Panx por 18h de incubação. Viabilidade celular foi determinada por meio do ensaio de MTT.

Observou-se que as concentrações de 1, 100 e 300  $\mu\text{M}$  reduziram a viabilidade celular das CGEs comparado ao grupo controle. No entanto, somente a concentração de 10  $\mu\text{M}$  foi viável por não apresentar diferença estatística com o grupo controle e ser estatisticamente diferente do grupo DMSO. Posteriormente, foram escolhidas as concentrações de 10 e 50  $\mu\text{M}$  para a execução do estudo (Figura 21).

Figura 21 – Efeito do 10Panx na viabilidade de CGEs *in vitro*.



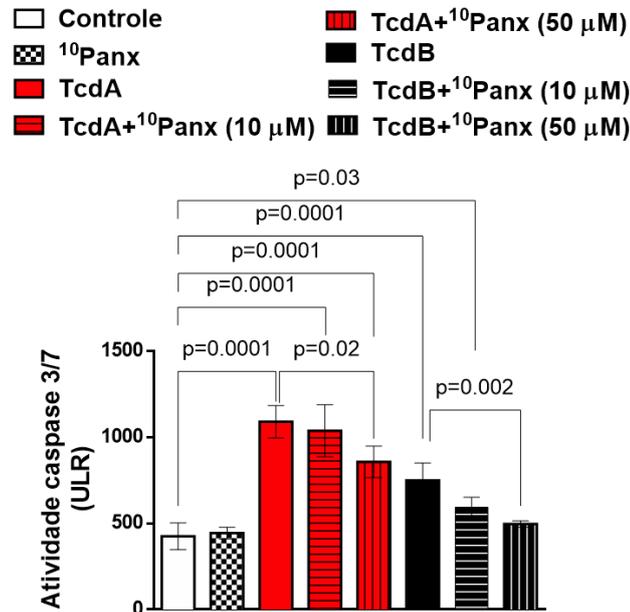
Ensaio de viabilidade celular realizado em CGEs incubadas com 10Panx (1, 10, 100 e 300  $\mu\text{M}$ ), apenas com meio (grupo controle) ou com DMSO (grupo controle de morte) por 18h. A viabilidade celular foi determinada por meio do ensaio de MTT. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Tukey. \* $p < 0,0001$  versus o grupo controle e # $p < 0,0001$  versus o grupo DMSO.

### 5.2.3 Efeito do inibidor de Panx1 na atividade de caspase 3/7 e ligação fosfatidilserina-anexina V em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB *in vitro*

O inibidor de Panx1 (10Panx) na concentração de 50  $\mu\text{M}$ , e não 10  $\mu\text{M}$ , reduziu a atividade de caspase 3/7 induzidas por TcdA e TcdB em CGEs (Figura 22). Além disso, o 10Panx reduziu a ligação fosfatidilserina-anexina V induzidas por ambas as toxinas em CGEs (Figura 23).

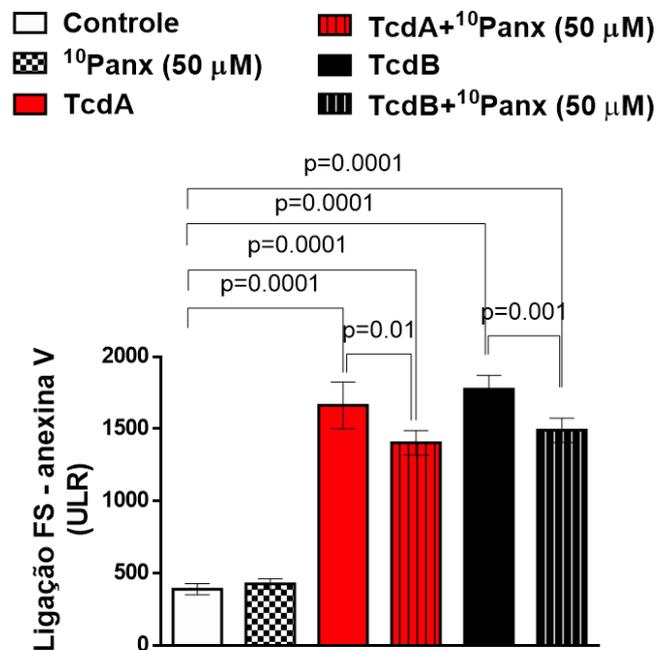
Em conjunto, esses dados demonstram que a Panx1 está envolvida na morte celular da glia entérica induzida por TcdA e TcdB.

Figura 22 - Inibidor de panx1 reduz a atividade de caspase 3/7 induzida por TcdA e TcdB em CGEs.



A atividade de caspase 3/7 em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB, previamente incubadas ou não com inibidor de Panx1 (10Panx, 10 e 50  $\mu\text{M}$ ), por 18h. O grupo controle são CGEs incubadas apenas com meio de cultivo. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Tukey, onde o valor de  $p$  encontra-se representado no gráfico.

Figura 23 - Inibidor de Panx1 diminui a formação de ligações fosfatidilserina-anexina V em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB.



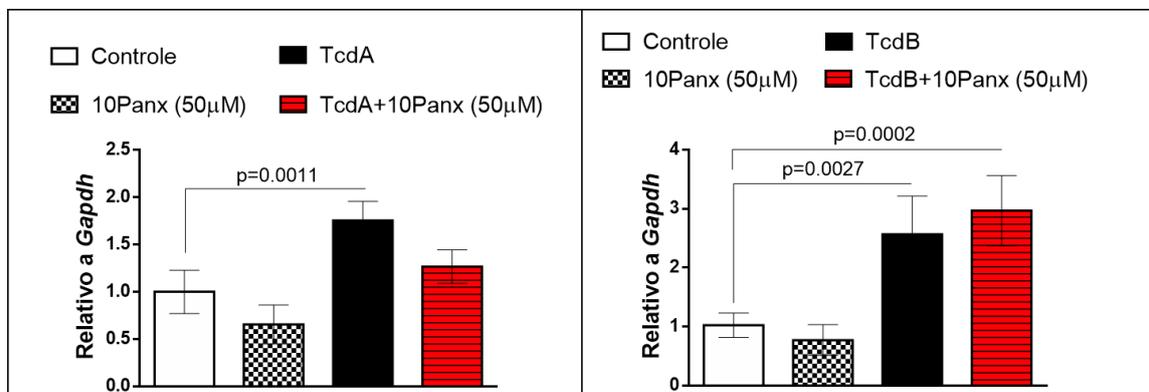
A formação de ligações fosfatidilserina (FS)-anexina V, um marcador de morte celular, foi avaliada por meio do ensaio de ligação FS-anexina V em tempo real em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB, previamente incubadas ou não com inibidor de Panx (10Panx, 50  $\mu\text{M}$ ), por 18h. O grupo controle são 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 quantidade de ligação FS-anexina V. Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Tukey, onde o valor de  $p$  encontra-se representado no gráfico.

### 5.2.4 Efeito do inibidor de Panx1 na expressão da citocina pleiotrópica IL-6 em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB *in vitro*

Conforme apresentado na figura 24, o inibidor de Panx1 (10Panx, 50  $\mu$ M) não afetou a expressão gênica de *IL-6* em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB quando comparado ao grupo controle.

Figura 24 - Inibidor de Panx1 não afeta a expressão de *IL-6* em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB.



Expressão gênica de *IL-6* foi avaliada por qPCR em CGEs desafiadas por TcdA e TcdB, previamente incubadas ou não com inibidor de Panx1 (10Panx, 50  $\mu$ M) por 18h. O grupo controle são CGEs incubadas apenas com meio de cultivo. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM (n=5). Para análise estatística foi utilizado o teste one-way ANOVA seguido do teste de Tukey, onde o valor de  $p$  encontra-se representado no gráfico.

## 6 DISCUSSÃO

No presente estudo, evidenciou-se elevada expressão de Panx1 em amostras de cólon e cécum de animais infectados por *C. difficile*, enquanto que o aumento da expressão de Cx43 se deu somente em amostras de cécum de camundongos com ICD. O cécum, de fato, é a região do intestino mais atingida pela ICD (CHEN *et al.*, 2020; CHENG; ZHU; FADEN *et al.*, 2019; JENIOR *et al.*, 2018), apresentando extensa ruptura do epitélio intestinal, hemorragia, edema e recrutamento de células inflamatórias, dessa forma, os achados de Cx43 indicam que esse canal pode ser hiperexpresso apenas nos sítios com maior grau de inflamação.

A Cx43 é expressa em diversos órgãos, a saber, timo, pulmão, cérebro, coração, pele e intestino em condições fisiológicas (MANIAS *et al.*, 2008; SRINIVAS *et al.*, 2019; GRUBISIC *et al.*, 2020). Contudo, os níveis de Cx43 podem aumentar em condições inflamatórias e contribuir para a geração de diarreia infecciosa, como foi observado em colonócitos durante infecção por *Citrobacter rodentium* em camundongos (GUTTMAN *et al.*, 2010).

Por outro lado, a expressão de Panx1 pode ser evidenciada em tecidos com maior ou menor grau de inflamação como mostrado pelo dado de imunohistoquímica do cécum e cólon, respectivamente, de animais infectados por *C. difficile* apresentado aqui neste estudo. O aumento da Panx1 também foi associada à presença de inflamação, e já foi descrito em várias doenças como a isquemia cerebral, em modelo de acidente vascular cerebral isquêmico em camundongos (BARGIOTAS *et al.*, 2011; CISNEROS-MEJORADO *et al.*, 2015), em linhagem de células metastáticas de pacientes com câncer de mama (FURLOW *et al.*, 2015), na doença de Crohn e na colite ulcerativa (DIEZMOS *et al.*, 2013; GULBRANSEN *et al.*, 2012). Pela primeira vez, mostrou-se aqui que Cx43 e Panx1 aumentam em amostras do intestino grosso durante a ICD.

A expressão dos canais de Panx1 e Cx43 também foi descrita nas células endoteliais de microvasos do cérebro (TACHIKAWA *et al.*, 2020), em células epiteliais intestinais (DIEZMOS *et al.*, 2018) e em células do sistema imunológico, como macrófagos e neutrófilos (VALDEBENITO; BARRETO; EUGENIN, 2018). Neste estudo, observamos imunomarcagem para Cx43, principalmente, na mucosa e células do plexo mioentérico do cécum, e para Panx1, em células da mucosa, submucosa e em células dispersas na camada muscular. A presença de imunomarcagem no plexo mioentérico e em células da mucosa e submucosa motivou a continuação da investigação em células gliais entéricas. Dados prévios mostram que a Cx43 foi identificada em CGEs de camundongos e humanos (GRUBISIC *et al.*, 2020). De fato, conforme

observado pelos achados do presente estudo, a linhagem de CGEs proveniente do jejuno de ratos utilizadas aqui para investigar o papel de Cx43 e Panx1 nos efeitos deletérios das toxinas do *C. difficile*, também expressam ambos os canais.

A glia entérica é uma população intrigante de células que atua de forma ativa e complexa no trato gastrointestinal, modulando processos fisiológicos intestinais como motilidade, secreções e função de barreira (GULBRANSEN e CHRISTOFI, 2018; GULBRANSEN e SHARKEY, 2012). Ao detectar sinais de perigo celular, como ATP, as CGEs são ativadas liberando outros mediadores que induzem morte neuronal e resposta inflamatórias (GULBRANSEN e CHRISTOFI, 2018).

Adicionalmente, demonstrou-se que TcdA e TcdB aumentam tardiamente a expressão de Panx1 em CGEs e apenas a TcdA suprarregula Cx43 precocemente. No entanto, ambas as toxinas reduzem a expressão de Cx43 em CGEs a partir de 12h de incubação. Assim como as toxinas do *C. difficile*, LPS também reduz a expressão de Cx43 em cultura primária de astrócitos (LIAO *et al.*, 2010). Em relação ao aumento da expressão precoce de Cx43 em CGEs e posterior redução tempo-dependente, hipotizou-se que está relacionado ao fato de que as toxinas do *C. difficile* promovem inativação das Rho GTPases, causando desarranjo do citoesqueleto de actina e consequente arredondamento celular (CZEPIEL *et al.*, 2019; TINOCO-VERAS *et al.*, 2017). É possível que a maior potência citotóxica da TcdB em relação a TcdA possa explicar a diferença inicial sobre expressão de Cx43 (BASSOTTI *et al.*, 2020; BEER *et al.*, 2018). Apesar das duas toxinas atuarem sobre Rho GTPases, a TcdB possui outras ações independentes de Rho GTPases (HENKEL *et al.*, 2020; ERDMANN *et al.*, 2017). A Cx43, por se tratar de uma proteína de membrana que potencializa a comunicação célula-célula (WONG *et al.*, 2019), pode exibir redução de sua expressão em CGEs devido alteração morfológica induzida pelas toxinas do *C. difficile*. Diferente da Cx43, a Panx1 estabelece uma via de comunicação entre o citosol de uma determinada célula e seu ambiente extracelular (JALALEDDINE *et al.*, 2019; CRESPO YANGUAS *et al.*, 2017).

Os canais de Cx43 e Panx1 são fundamentais para a comunicação celular e liberação de moléculas sinalizadoras, como o ATP (BENNET *et al.*, 2012; KAMERITSCH; POGODA *et al.*, 2020; WONG *et al.*, 2019). Além do ATP, os canais de Cx43 e Panx1 também medeiam o influxo e/ou efluxo de moléculas de sinalização, como o glutamato (DÍAZ *et al.*, 2019).

No presente estudo, detectou-se que Panx1, mas não Cx43, está envolvida na morte de CGEs induzida por TcdA e TcdB. Esses dados foram constatados pela redução da ativação de caspases 3/7 e da marcação de fosfatidilserina na membrana celular com anexina V em CGEs

desafiadas pelas toxinas do *C. difficile* na presença do inibidor de Panx1. Um dos mecanismos pode ser via liberação de ATP mediado pela abertura dos canais de Panx1, resultando em ativação de receptores purinérgicos e aumento do fluxo de cálcio intracelular que estimulam a ativação de caspases ativadoras e efetoras culminado no processo apoptótico (GALLUZZI *et al.*, 2018; KAMERITSCH; POGODA *et al.*, 2020; CHEKENI *et al.*, 2010 ; CISNEROS-MEJORADO *et al.*, 2015 ; CRESPO YANGUAS *et al.*, 2017).

O ATP extracelular não só opera como um sinalizador para as células de defesa circundantes, mas também medeia o estímulo de ativação do inflamassoma canônico ao se ligar à receptores purinérgicos e promover a ativação de caspases (GALLUZZI *et al.*, 2018). A liberação de ATP no meio extracelular é implicada na ativação de vários receptores purinérgicos, dentre eles, o P2X7 que é de particular interesse por estar envolvido na morte celular (DIEZMOS *et al.*, 2016). Resultados do nosso grupo de pesquisa, ainda não publicados, evidenciaram que TcdA induz o aumento da expressão do receptor P2X7, que por sua vez promove perda de neurônios no intestino (SANTOS, 2017). Estudo realizado por Moura-Neto (2019) mostrou que TcdA e TcdB suprarregulam o receptor P2X7 nas CGEs, culminado com morte celular (MOURA-NETO, 2019). Em modelo de colite experimental, Panx1 foi associada a morte de neurônios entéricos via ativação de caspases (GULBRASEN *et al.*, 2012; DIEZMOS *et al.*, 2013).

A apoptose é um tipo de morte celular regulada iniciada por perturbações microambientais que resulta na ativação de um ou mais módulos de transdução de sinal (DIEZMOS *et al.*, 2016; GALLUZZI *et al.*, 2018). As caspases são enzimas proteolíticas que desempenham papel no controle da morte celular. A caspase-3 é responsável pela maioria dos efeitos deletérios celulares e, juntamente com a caspase 7, são reconhecidas como efetoras e ativadas proteoliticamente por caspases iniciadoras (SHALINI *et al.*, 2015; JULIEN; WELLS, 2017). A clivagem proteolítica leva a mudanças importantes na morfologia celular, como a fragmentação do DNA e exposição da fosfatidilserina (FS) na superfície celular (JULIEN; WELLS, 2017). Isso porque a FS é um fosfolípido abundante nas membranas plasmáticas e, normalmente, mantida dentro da célula (NAGATA *et al.*, 2016). A exposição de FS atua como um sinalizador em células mortas e resulta de mecanismos apoptóticos, atraindo fatores como a anexina V, o qual se liga a FS, indicando uma célula em apoptose (SHLOMOVITZ *et al.*, 2019). Nosso grupo de pesquisa demonstrou que TcdA do *C. difficile* induz morte celular por apoptose em células epiteliais intestinais humanas (T84) e que essa morte celular é mediada pela via intrínseca com alteração do potencial de membrana mitocondrial, ativação de caspase

9 e liberação de citocromo C. A via extrínseca também é ativada pela TcdA através de ativação de caspase 8 e Bid. As caspases efetoras 3 e 6 também são ativadas, resultando em clivagem do DNA (Brito *et al.*, 2002). Os dados apresentados aqui, reforçam os o efeito pró-apoptótico da TcdA e mostram que a Panx1 está envolvida na morte celular induzida pela TcdA em células gliais entéricas.

Diferentemente do que foi demonstrado no presente estudo, estudos prévios mostraram que Cx43 expressa por CGEs tem importante participação na morte de neurônios entéricos durante a inflamação (BROWN *et al.*, 2016, BURNSTOCK; JACOBSON; CHRISTOFI, 2017, DIEZMOS *et al.*, 2016). Esses dados prévios, em conjunto com os dados obtidos aqui, indicam que Cx43 não participa da morte de CGEs, porém pode desempenhar importante função na interação dessas células com outras, como neurônios. No entanto, mais investigações são necessárias para melhor compreender o papel de Cx43 em outras células.

Anteriormente, um estudo do nosso grupo mostrou que TcdA e TcdB induzem suprarregulação de *IL-6* (COSTA, 2019; MOURA-NETO, 2019) via ativação do receptor P2X7 (MOURA NETO, 2019) e via S100B/RAGE/PI3K/NKκB em CGEs (COSTA, 2019). No presente estudo, Cx43, mas não Panx1, participou da expressão de *IL-6* induzida pela TcdB, mas não por TcdA. De forma similar, a deleção de Cx43 diminuiu significativamente a expressão de *IL-6* na artrite experimental, reduzindo os danos ocasionados por esse processo (TSUCHIDA *et al.*, 2013).

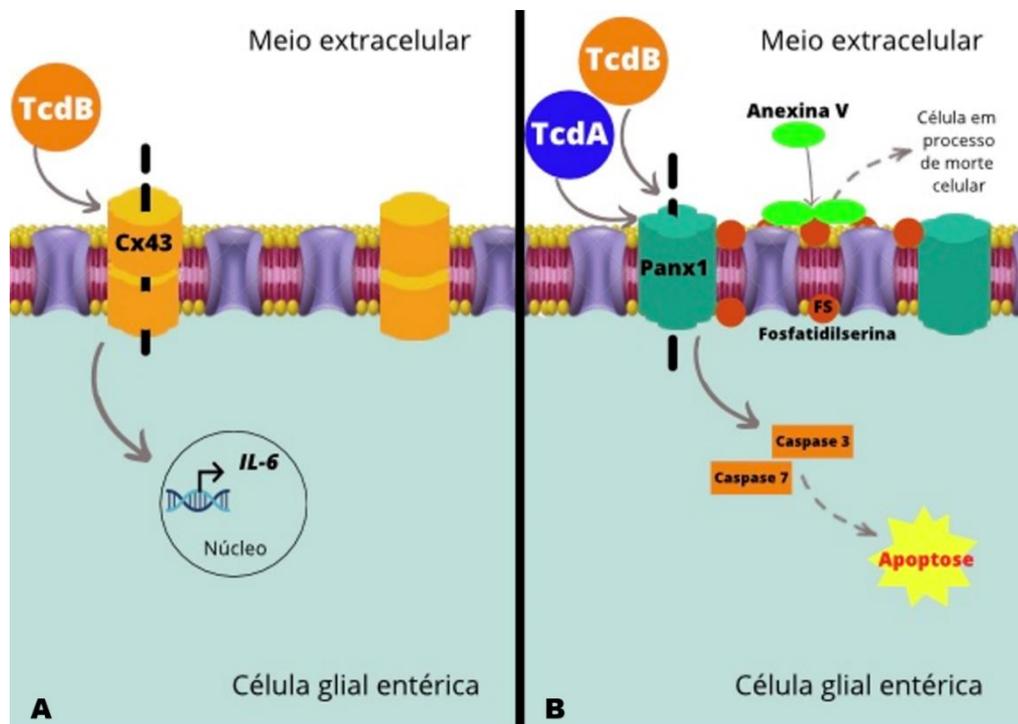
A *IL-6*, pode ser sintetizada por uma variedade de células, incluindo as CGEs (MOURA-NETO, 2019; COSTA 2019; PUZAN *et al.*, 2018; RUHL *et al.*, 2001). *IL-6* é considerada uma citocina pleiotrópica por desempenhar um papel anti-inflamatório ou inflamatório a depender do contexto ao qual a mesma está inserida (MURAKAMI *et al.*, 2019). *IL-6* tem mostrado ser um importante marcador da gravidade da ICD (YU *et al.*, 2017). Aqui, mostramos que a ativação de Cx43 contribui para a expressão gênica de *IL-6* induzida por TcdB. Interessantemente, Lazzerini *et al* (2019) demonstraram que a incubação de cardiomiócitos atriais de camundongos com *IL-6* está associada a uma diminuição significativa na expressão de Cx43. De fato, estudo anterior mostrou que a Cx43 contribui para a resposta inflamatória, regulando, por exemplo, a produção de mediadores como proteína inflamatória de macrófagos-1α (MIP), eotaxina e interleucina-2 (IL-2) durante a colite aguda e crônica em camundongos (GRUBISIC *et al.*, 2020).

De acordo com os achados do presente estudo, a Panx1 não é requerida, por exemplo, para a ativação do inflamassoma, mas participa da apoptose celular (RUSSO *et al.*, 2016; QU

*et al.*, 2011), ao contrário da Cx43 que, conforme demonstrado, participa da liberação e expressão de mediadores inflamatórios. Em um desses estudos realizados *in vitro* com macrófagos murinos, foi demonstrado que o inibidor de Panx1 não interferiu na ativação de caspase-1, um ativador do inflamassoma, induzida por TcdB (RUSSO *et al.*, 2016).

Nosso estudo é o primeiro a mostrar o papel da Cx43 na suprarregulação de *IL-6* e o envolvimento da Panx1 na morte celular de CGEs desafiadas por TcdA e TcdB (Figura 25). Em suma, TcdB ativa Cx43 resultando em suprarregulação da expressão gênica de *IL-6*. Enquanto que ambas TcdA e TcdB ativam Panx1, levando a ativação de caspase-3/7, culminando em exposição de PS na membrana plasmática com consequente ligação a anexina V, que caracterizam CGE em processo de morte celular (Figura 25). Evidenciou-se, ainda, o aumento de expressão de Panx1 e Cx43 em modelo de infecção, sugerindo que a modulação desses canais são potenciais alvos terapêuticos na ICD. Pesquisas adicionais sobre Cx43 e Panx1 na ICD são necessárias.

Figura 25 – Possível mecanismo da participação de Cx43 e Panx1 na ação de TcdA e TcdB em CGEs.



Elaborado pela autora. **A-** TcdB aumenta a expressão de Cx43 levando à expressão gênica de *IL-6*. **B-** TcdA e TcdB aumentam a expressão de Panx1, resultando em ativação de caspase 3/7, e culminando em apoptose. Além disso, a ativação desse canal também leva à exposição de FS na membrana plasmática com consequente ligação de Anexina V.

## CONCLUSÃO

- ICD aumenta a expressão de Panx1 no cólon e cécum de camundongos, bem como a expressão de Cx43 apenas no cécum;
- TcdA e TcdB aumentam a expressão de Cx43 e Panx1 de forma dependente do tempo de exposição;
- A inibição de Cx43 não previne a morte celular de CGEs desafiadas pelas toxinas do *C. difficile*, mas participa na expressão de IL-6 induzida pela TcdB;
- A inibição de Panx1 diminui a morte celular, mas não a expressão de IL-6, de CGEs desafiadas por ambas toxinas do *C. difficile*.

## REFERÊNCIAS

ABT, M; MCKENNEY, P; PAMER, E. *Clostridium difficile* colitis: pathogenesis and host defence. **Nature reviews Microbiology**, v. 14, p. 609-620, 2016.

ANDELOVA, K., *et al.* Cardiac Connexin-43 Hemichannels and Pannexin1 Channels: Provocative Antiarrhythmic Targets. **Int J Mol Sci**, v. 22, n. 1, p. 260, 29 Dez 2020.

BARGIOTAS, P., *et al.* Pannexins in ischemia-induced neurodegeneration. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v.108, p.20772-20777, 2011.

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.* The cytotoxic synergy between *Clostridioides difficile* toxin B and proinflammatory cytokines: an unholy alliance favoring the onset of *Clostridioides difficile* infection and relapses. **MicrobiologyOpen**, v. 9, p. 8, Ago 2020.

BEER, L. A. *et al.* Early cell death induced by *Clostridium difficile* TcdB: Uptake and Rac1-glucosylation kinetics are decisive for cell fate. **Cellular microbiology**, v. 20, p. 10, Out 2018.

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.

BENNETT, M. *et al.* Connexin and pannexin hemichannels in inflammatory responses of glia and neurons. **Brain research**, v. 1487, p. 3–15, 3 Dez 2012.

BOESMANS, W. *et al.* Neurotransmitters involved in fast excitatory neurotransmission directly activate enteric glial cells. **Neurogastroenterol Motil.** v. 25, v. e151-e160, 2013.

BOESMANS, W. *et al.* Heterogeneity and phenotypic plasticity of glial cells in the mammalian enteric nervous system. **Glia**, v. 63, p. 229–241, 2015.

BOUILLAUT, L. *et al.* Integration of metabolism and virulence in *Clostridium difficile*. **Research in Microbiology**, v. 166, p. 375-83, 2015.

BRITO, A. *et al.* Mechanism of *Clostridium difficile* Toxin A–Induced Apoptosis in T84 Cells, **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 10, p. 1438–1447, 15 Nov 2002.

BROWN, I. *et al.* Enteric glia mediate neuron death in colitis through purinergic pathways that require connexin-43 and nitric oxide. **Cell Mol Gastroenterol Hepatol.**, v. 2, p.77-91, 2016.

- BURKE, K; LAMONT, J. *Clostridium difficile* infection: a worldwide disease. **Gut Liver**, v. 8, p. 1-6, 2014.
- BURNSTOCK, G.; JACOBSON, K. A.; CHRISTOFI, F. L. Purinergic drug targets for gastrointestinal disorders. **Curr Opin Pharmacol**, v. 37, p. 131-141, Dez 2017.
- CARTMAN, S.; MINTON, N. A mariner- Based Transposon System for In Vivo Random Mutagenesis of *Clostridium difficile*. **Appl Environ Microbiol**. v.76, n.4, p. 1103-1109, 2010.
- 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.
- CHANDRASEKARAN, R.; LACY, B. The role of toxins in *Clostridium difficile* infection, **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, p. 723–750, Nov., 2017.
- CHENG, S.; ZHU, L; FADEN, H.S. Interactions of bile acids and the gut microbiota: learning from the differences in *Clostridium difficile* infection between children and adults. **Physiol Genomics**, v. 51, n. 6, p. 218-223. 1 Jun 2019.
- CHEKANI, F. *et al.* Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis. **Nature**, v. 467, n. 7317, p. 863–867, 14 Out 2010.
- CISNEROS-MEJORADO, A. *et al.* ATP Signaling in Brain: Release, Excitotoxicity and Potential Therapeutic Targets. **Cell Mol Neurobiol**, v. 35, p. 1–6, Jan 2015.
- 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. S. *et al.* IL-17-producing  $\gamma\delta$  T cells protect against *Clostridium difficile* infection. **The Journal of clinical investigation**, v. 130, n. 5, p. 2377-2390, 1 Mai 2020.
- CRESPO, Y. *et al.* Pannexin1 as mediator of inflammation and cell death. **Biochim Biophys Acta Mol Cell Res**, v. 1854, n. 1, p. 51-61, Jan 2017.
- CHUMBLER, N. M., *et al.* Crystal structure of *Clostridium difficile* toxin A. **Nat. Microbiol**, v. 1, n. 15002, 2016.
- COSTA, C., *et al.* A MLST Clade 2 *Clostridium difficile* strain with a variant TcdB induces severe inflammatory and oxidative response associated with mucosal disruption. **Anaerobe**. v. 40, p.76-84, 2016.
- COSTA, C. *et al.* Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* infection in a Brazilian cancer hospital. **Anaerobe**, v. 48, p. 232-236, 2017.

COSTA, D. Papel da via de sinalização S100B/RAGE na apoptose e gliose reativa induzida pelas toxinas A e B do *Clostridioides difficile* em células gliais entéricas. 2019. Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

CZEPIEL, J. *et al.* *Clostridium difficile* infection: review. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 38, p.1211-1221, 2019.

DAHL, G. *et al.* The bizarre pharmacology of the ATP release channel pannexin1. **Neuropharmacology**, v. 75, p. 583-93, Dez 2013.

DÍAZ, E. F. *et al.* Connexin 43 hemichannels and panexin - 1 channels contribute to  $\alpha$  - synuclein-induced dysfunction and astrocyte death. **Glia**, v. 67, n. 8, p. 1598-1619, Ago 2019.

DIEZMOS, E. *et al.* Expression and localization of pannexin-1 hemichannels in human colon in health and disease. **Neurogastroenterol Motil.** v.25, p.e395-e405, 2013.

DIEZMOS, E. F.; BERTRAND, P. P; LIU, L. Purinergic Signaling in Gut Inflammation: The Role of Connexins and Pannexins. **Front Neurosci**, v. 10, p. 311, 29 jun 2016.

DIEZMOS, E. *et al.* Blockade of Pannexin-1 Channels and Purinergic P2X7 Receptors Shows Protective Effects Against Cytokines-Induced Colitis of Human Colonic Mucosa. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 865, Aug. 2018.

DOUANNE, T. *et al.* Pannexin-1 limits the production of proinflammatory cytokines during necroptosis. **EMBO reports**, v. 20, n. 10, p. e47840, 4 Out 2019.

EL FEGHALY, R. *et al.* Intestinal inflammatory biomarkers and outcome in pediatric *Clostridium difficile* infections. **The Journal of Pediatrics**, v. 163, p. 1697–1704, 2013.

ENGELHARDT, K. *et al.* Effects on channel properties and induction of cell death induced by c-terminal truncations of pannexin1 depend on domain length. **J Membrane Biol**, v. 248, n. 2, p. 285–294, Abr 2015.

ERDMANN, J. *et al.* Glucosyltransferase-dependent and independent effects of TcdB on the proteome of HEp-2 cells. **Proteomics**, v. 17, p. 15-16, Ago 2017.

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.

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

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

FURLOW, P. W. *et al.* Mechanosensitive pannexin-1 channels mediate microvascular metastatic cell survival. **Nat Cell Biol.** v. 17, n. 7, p. 943-52, Jul 2015.

GALLUZZI, L. *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death Differ.** v. 25, p. 486–541, 23 Jan 2018.

GARRÉ, J. *et al.* FGF-1 induces ATP release from spinal astrocytes in culture and opens pannexin and connexin hemichannels. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 107, n. 52, p. 22659-64. 28 Dez 2010.

GIRÃO, E. *et al.* Prevalence of *Clostridioides difficile* associated diarrhea in hospitalized patients in five Brazilian centers: A multicenter, prospective study. **Anaerobe.** v. 66, p. 102-267, 2020.

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.

GUERRERO-ARAYA, E. *et al.* Origin, genomic diversity and microevolution of the *Clostridium difficile* B1/NAP1/RT027/ST01 strain in Costa Rica, Chile, Honduras and Mexico. **Microbial genomics.** v. 6, 2020.

GULBRANSEN, B. D., SHARKEY, K. A. Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol.** v. 9, p. 625-632, 2012.

GULBRANSEN, B. D.; CHRISTOFI, F. L. Are We Close to Targeting Enteric Glia in Gastrointestinal Diseases and Motility Disorders? **Gastroenterology.** v. 155, n. 2, p. 245-251, Ago 2018.

GUTTMAN, J. A., *et al.* Gap junction hemichannels contribute to the generation of diarrhoea during infectious enteric disease. **Gut.** v.59, p. 218-226, 2010.

GRUBISIC, V., GULBRANSEN, B. Enteric glia: the most alimentary of all glia. **J Physiol.** v. 595, p. 557-570, 2017.

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

GRUBISIC, V. *et al.* Enteric Glia Modulate Macrophage Phenotype and Visceral Sensitivity following Inflammation. **Cell reports.** v. 32, n. 10, p. 108100, 8 Sep 2020.

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.

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

HENKEL, D. *et al.* Receptor Binding Domains of TcdB from *Clostridioides difficile* for Chondroitin Sulfate Proteoglycan-4 and Frizzled Proteins Are Functionally Independent and Additive. **Toxins**, v. 12, n. 12, p. 736, 24 Nov 2020.

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.

JULIEN, O., WELLS, J. Caspases and their substrates. **Cell Death Differ.** v.24, p.1380–1389, 2017.

KAMERITSCH, P., POGODA, K. Cx43 increases serum induced filopodia formation via activation of p21-activated protein kinase 1. **Frontiers in fysiologia**, v. 11, p. 2907-2917, 2020.

KAMPAN, N. *et al.* Immunotherapeutic Interleukin-6 or Interleukin-6 Receptor Blockade in Cancer: Challenges and Opportunities. **Current medicinal chemistry**, v. 25, n. 36, p. 4785-4806, 2018.

KANEKO, Y. *et al.* Contribution of pannexin 1 and connexin 43 hemichannels to extracellular calcium-dependent transport dynamics in human blood-brain barrier endothelial cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 353, n. 1, p. 192–200, Abr 2015.

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

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.

LAZZERENI, P. *et al.* Systemic Inflammation Rapidly Induces Reversible Atrial Electrical Remodeling: The Role of Interleukin-6-Mediated Changes in Connexin Expression. **Journal of the American Heart Association**, v. 8, n. 16, p. e011006, 20 Ago 2019.

LEFFLER, D; LAMINT, J. *Clostridium difficile* infection. **The New England Journal of medicine**, 372: 1539-1548, 2015.

LESSA, F. C.; GOULD, C. V.; MCDONALD, L. C. Current status of *Clostridium difficile* infection epidemiology. **Clin. Infect. Dis**, v. 55, p. 65-70, Aug., 2012.

LESSA, F. C., WINSTON, L. G., MCDONALD, L. C. Burden of *Clostridium difficile* infection in the United States. **The New England Journal of Medicine**, v. 372, p. 2369–2370, 2015.

LIAO, C. K. *et al.* Lipopolysaccharide-induced inhibition of connexin43 gap junction communication in astrocytes is mediated by downregulation of caveolin-3. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 42, n. 5, p. 762-70, Mai 2010.

LIMA, B. B. Efeitos das toxinas A e B do *Clostridium difficile* sobre a via de WNT/Beta-catenina em células epiteliais intestinais. 2014. 79 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

JALALEDDINE, N. *et al.* Pannexin1 is Associated with Enhanced Epithelial-To-Mesenchymal Transition in Human Patient Breast Cancer Tissues and in Breast Cancer Cell Lines. **Cancers**, v. 11, p. 1967. Dec 2019.

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

JENIOR, M. L. *et al.* *Clostridium difficile* Alters the Structure and Metabolism of Distinct Cecal Microbiomes during Initial Infection To Promote Sustained Colonization. **mSphere**, v. 3, n. 3, p. e00261-18, 27 Jun 2018.

KAMERITSCH, P.; POGODA, K. The Role of Connexin 43 and Pannexin 1 During Acute Inflammation. **Front Physiol**, v. 11, p. 594097, 29 out 2020.

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.

MARTINS, C. *et al.* *Clostridioides difficile* Toxin A-Induced Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway Inhibition Is Mediated by Rac1 Glucosylation. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 1998, Aug. 2020.

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

MAES, M. *et al.* Connexin and pannexin signaling in gastrointestinal and liver disease. **Transl Res**, v. 166, p. 332-343, 2015.

MAES, M. *et al.* Roles of connexins and pannexins in digestive homeostasis **Célula. Mol. Life Sci**, v. 72, p. 2809-2821, 2015.

MAESTRI, A. *et al.* Multicenter study of the epidemiology of *Clostridioides difficile* infection and recurrence in southern Brazil. **Anaerobe**, v. 64, n. 102238, 2020.

MAKARENKOVA, H. *et al.* The two faces of pannexins: new roles in inflammation and repair. **Journal of inflammation research**, v. 11, p. 273-288, 21 Jun., 2018.

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.

MANIAS, J. L. *et al.* Fate of connexin43 in cardiac tissue harbouring a disease-linked connexin43 mutant. **Cardiovasc Res.** v. 80, p.385-395, 2008.

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. *et al.* Ca<sup>2+</sup> Responses in Enteric Glia are Mediated by Connexin-43 Hemichannels and Modulate Colonic Transit in Mice. **Gastroenterology**, v. 146, p. 497-507, 2014.

MORIOKA, N. *et al.* Downregulation of spinal astrocytic connexin43 leads to upregulation of interleukin-6 and cyclooxygenase-2 and mechanical hypersensitivity in mice. **Glia**, v. 66, n. 2, p. 428-444, Fev 2018.

MOURA NETO, L. Papel do receptor P2X7 na resposta inflamatória, gliose reativa e apoptose induzida pelas toxinas A e B do *Clostridioides difficile* em células gliais entéricas. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

MURAKAMI, M.; KAIMURA, D.; HIRANO, T. Pleiotropy and Specificity: Insights from the Interleukin 6 Family of Cytokines. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 812-831, Abr 2019.

NAGATA, S; SUZUKI, J.; SEGAWA, K, Fujii T. Exposure of phosphatidylserine on the cell surface. **Cell Death Differ**, v. 23, n. 6, p. 952-6, Jun 2016.

NAGY, N., GOLDSTEIN, A. Enteric nervous system development: A crest cell's journey from neural tube to colon. **Semin Cell Dev Biol.** p. 66:94-106, 2017.

NAGY, E. What do we know about the diagnostics, treatment and epidemiology of *Clostridioides (Clostridium) difficile* infection in Europe? **J Infect Chemother**, v. 24, p. 164-170, 2018.

NAVIS, K. E. *et al.* Pannexin 1 Channels as a Therapeutic Target: Structure, Inhibition, and Outlook. **ACS Chem Neurosci**, v. 11, n. 15, p. 2163-2172, 5 Ago 2020.

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

NEUNLIST, M., *et al.* Enteric Glial Cells: Recent Developments and Future Directions. **Gastroenterology**, 147(6), 1230–1237, 2014.

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

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, p. e17623, 2011.

PANCHIN, Y *et al.* A ubiquitous family of putative gap junction molecules. **Curr. Biol.**, v. 10, p. R473-R47, 2000.

PAPATHEODOROU, P. *et al.* Clostridial glucosylating toxins enter cells via clathrin-mediated endocytosis. **PloS one**, v. 5,5, p. e10673, May., 2010.

PAWLOWSKI, G. *et al.* Murine Model of *Clostridium difficile* Infection with Aged Gnotobiotic C57BL/6 Mice and a BI/NAP1 Strain, **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 11, p. 1708-1712, 1 Dez 2010.

PENUELA, S; GEHI, R; LAIRD, D. The biochemistry and function of pannexin channels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. **Biomembranes**, v. 1828, p. 15–22, 2013.

POTHOULAKIS, C., *et al.* CP-96,345, a substance P antagonist, inhibits rat intestinal responses to *Clostridium difficile* toxin A but not cholera toxin. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 91, p. 947-951, 1994.

PRUITT, R. *et al.* Structural determinants of *Clostridium difficile* toxin A glucosyltransferase activity.” **The Journal of biological chemistry**, v. 287, 2012.

PUZAN, M. *et al.* Enteric Nervous System Regulation of Intestinal Stem Cell Differentiation and Epithelial Monolayer Function. **Sci Rep**, v. 8, p. 6313, 20 Abr 2018.

QU, Y., *et al.* Pannexin-1 is required for ATP release during apoptosis but not for inflammasome activation. **J Immunol.** v.186, p.6553-6561, 2011.

RUHL, A. *et al.* Interleukin-6 expression and regulation in rat enteric glial cells. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 280, n. 6, p. G1163-71, Jun 2001.

RUPNIK, M. How to detect *Clostridium difficile* variant strains in a routine laboratory. **Clin Microbiol Infect.** v. 7, p. 417-420, 2001

RUPNIK, M; WILCOX, M; GERDING, D. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. **Nature.** v. 7, p. 526-536, jul., 2009.

RUSSO, H. M., *et al.* Active Caspase-1 Induces Plasma Membrane Pores That Precede Pyroptotic Lysis and Are Blocked by Lanthanides. **J Immunol.** v.197, p.1353-1367, 2016.

SANTOS, AA. Papel do receptor P2X7 no efeito da toxina A do *Clostridium difficile* em modelo de alça ileal em camundongos. 2017. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

SEGUELLA, L., GULBRANSEN, B. Enteric glial biology, intercellular signalling and roles in gastrointestinal disease. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 10, p. 1038, 2021.

SHALINI, S., *et al.* Old, new and emerging functions of caspases. **Cell Death Differ.** v. 22, p.526-539, 2015.

SHARKEY, K. Emerging roles for enteric glia in gastrointestinal disorders. **The Journal of clinical investigation**, v. 125, p. 918-25, 2015.

SHESTOPALOV, V. I.; SLEPAK, V. Z. Molecular pathways of pannexin1-mediated neurotoxicity. **Frontiers in physiology**, v. 5, p. 23, 11 Feb 2014.

SHLOMOVITZ, I., SPEIS, M., GERLIC, M. Flipping the dogma - phosphatidylserine in non-apoptotic cell death. **Cell Commun Signal.** v.17, p.139. Out 2019.

SMITS, W. K. *et al.* *Clostridium difficile* infection. **Primer**, v. 2, 2016.

SPEIR, I. S.; GERLIC, M. Flipping the dogma – phosphatidylserine in non-apoptotic cell death. **Cell Communication and Signaling**, v. 17, n. 139, 29 Out 2019.

SRINIVAS, M., *et al.* Connexin43 mutations linked to skin disease have augmented hemichannel activity. **Sci Rep.** v.9, p.19, 2019.

TAO, L. *et al.* Frizzled are colonic epithelial receptors for *Clostridium difficile* toxin B. **Nature**, v. 538, n. 7625, p. 350-355, 2016.

TACHIKAWA, M. *et al.* Polarized hemichannel opening of pannexin 1/connexin 43 contributes to dysregulation of transport function in blood-brain barrier endothelial cells. **Neurochemistry international**, v. 132, p. 104600, Jan 2020.

TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 6, n. 10, p. a016295, 4 Set 2014.

TANAKA, T. *et al.* Regulation of IL-6 in Immunity and Diseases. **Adv Exp Med Biol**, v. 941, p. 79-88, 2016.

TINOCO-VERAS, C. M. *et al.* Transforming growth factor  $\beta$ 1/SMAD signaling pathway activation protects the intestinal epithelium from *Clostridium difficile* toxin A-induced damage. *Infection and Immunity*, **Washington**, v. 85, n.10, p. 1-13, oct. 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.

TOTLAND, M. *et al.* Regulation of gap junction intercellular communication by connexin ubiquitination: physiological and pathophysiological implications. **Cell Mol Life Sci**, v. 77, p. 573-591, 2020.

TRINDADE, C; DOMINGUES, R; FERREIRA, E. The epidemiology of *Clostridioides difficile* infection in Brazil: A systematic review covering thirty years. **Anaerobe**, v. 58, p. 13-21, 2019.

TSUCHIDA, S. *et al.* Silencing the expression of connexin 43 decreases inflammation and joint destruction in experimental arthritis. **Journal of orthopaedic research**, v. 31, n. 4, p. 525-30, Abr 2013.

VALDEBENITO, S.; BARRETO, A.; EUGENIN, E. A. The role of connexin and pannexin containing channels in the innate and acquired immune response. **Biochimica et biophysica acta. Biomembranes**, v. 1860, n. 1, p. 154-165, Jan 2018.

VERGONOLLE, N., CIRILLO, C. Neurons and Glia in the Enteric Nervous System and Epithelial Barrier Function. **Physiology (Bethesda)**. v. 33, p.269-280, 2018.

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.

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.

WONG, J. *et al.* The Role of Connexins in Gastrointestinal Diseases. **Journal of molecular biology**, v. 431, p. 643-652, 2019.

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.

YANG, R. *et al.* NaHS inhibits the release of TNF- $\alpha$  and IL-6 from peripheral blood lymphocytes in rats and down-regulates the expression of connexin 40 and connexin 43. **Chinese journal of cellular and molecular immunology**, v. 34, p. 684-689, 2018.

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.

YU, H. *et al.* Assessing risk factors, mortality, and healthcare utilization associated with *Clostridioides difficile* infection in four Latin American countries. **The Brazilian journal of infectious diseases**, v. 25, n. 101040, 2021.

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, 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.

ZHANG, Y. *et al.* The role of purified *Clostridium difficile* glucosylating toxins in disease pathogenesis utilizing a murine cecum injection model. **Anaerobe**, v. 48, p. 249-256, Dez 2017.

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.

## APÊNDICE

## Fármacos

<b>Fármacos e proteínas</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Código do produto</b>
Gap19 <i>trifluoroacetate</i>	Sigma-Aldrich	SML1426
10Panx <i>trifluoroacetate</i>	Sigma-Aldrich	SALTSML2152
Anti-caspase 3	Sigma-Aldrich	AB3623