



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

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS INDUZIDAS PELA TOXINA A
DO *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* EM CÉLULAS EPITELIAIS INTESTINAIS E DO
EFEITO PROTETOR DA GLUTAMINA E ALANIL-GLUTAMINA**

ANA ANGÉLICA QUEIROZ ASSUNÇÃO SANTOS

FORTALEZA- CEARÁ

2011

ANA ANGÉLICA QUEIROZ ASSUNÇÃO SANTOS

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS INDUZIDAS PELA TOXINA A
DO *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* EM CÉLULAS EPITELIAIS INTESTINAIS E DO
EFEITO PROTETOR DA GLUTAMINA E ALANIL-GLUTAMINA**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós – graduação em Ciências Médicas, da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre em Ciências Médicas.

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

**FORTALEZA - CEARÁ
2011**

A DEUS e Aos Meus Pais, meus verdadeiros mestres, modelos reais de parceria, perseverança, dedicação, ética, paciência e amor

AGRADECIMENTOS

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

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

Ao meu namorado, que sempre me apoiou, me deu força, entendeu as minhas ausências em vários momentos importantes e compreendeu que em vários finais de semanas a única forma de está ao meu lado era-me ver pesquisar ou escrever a dissertação.

À Dra. Gerly Anne, a quem admiro muito por seu profissionalismo e amor a pesquisar. Sem esquecer-me da oportunidade e disponibilidade em acolher-me e orientar-me neste projeto.

Ao Dr. Aldo Lima, pela colaboração no cultivo das células.

Ao Dr. Eduardo Bedê, pela colaboração nos experimentos de microscopia de força atômica e microscopia eletrônica de varredura.

À Dra. Cláudia Mermelstein, pela colaboração e incentivo nos experimentos de imunofluorescência e imunoblotting.

Aos amigos do Laboratório, Rosinha, Dani, Karol, Ana Paula, Vinícius, Eunice, Marcelo, Luciana, Thiago, Neto, Bruno, Ana Carla, Isabel, Larissa entre vários, que sempre me apoiaram, escutaram e incentivaram na conquista deste sonho.

À Vandinha, Carol, Karine, José e Josy, pela constante ajuda.

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

Ao CNPq, CAPES e Funcap, pelo suporte financeiro.

RESUMO

Clostridium difficile é a maior causa de colite associada ao uso de antibióticos, com significativa morbidade e mortalidade. Glutamina (Gln), um aminoácido não-essencial, é a maior fonte combustível para a dinâmica das células intestinais. Alanil-glutamina (Ala-Gln) é um dipeptídeo, altamente solúvel e bem tolerado. O objetivo deste estudo foi analisar as alterações induzidas pela toxina A (TcdA) do *Clostridium difficile* na morfologia e elementos do citoesqueleto das células epiteliais intestinais e o efeito do tratamento com Gln e Ala-Gln, utilizando técnicas avançadas de microscopia. Placas de cultura de células com doze poços, previamente crescidas de lamínulas de vidro, com diâmetro de 13mm, IEC-6, 5×10^5 foram semeadas e cultivadas por 24 horas em meio DMEM. Depois, as células foram incubadas por 24h de acordo com os seguintes grupos: Controle, TcdA (10 ng / mL), TcdA + Gln (10 mM) e TcdA + Ala-Gln (10 mM). As células foram fixados em formol a 4% por 14h, depois foram examinados na microscopia de força atômica (AFM), microscopia eletrônica de varredura (SEM), microscopia confocal e fluorescente. Para o SEM as amostras foram fixadas em porta amostras fita adesiva de carbono e cobertos com uma película de ouro 15 mm para adquirir condutividade por pulverização catódica. Para microscopia de fluorescência e o confocal, as células foram permeabilizadas com PBS/Triton depois foram marcados com RhoA- FITC, Faloidina –Rodamina e DAPI e as imagens capturadas através de um microscópio invertido de fluorescência ou confocal. Um immunoblotting foi realizado com os mesmos grupos. A membrana PVDF foi incubada com o anticorpo RhoA overnight, em seguida ativado pelo kit Amershan. O controle protéico foi feito por α -tubulina. Também realizamos experimentos de proliferação celular e estresse oxidativo. Observou-se que a TcdA causa intenso encolhimento celular restando múltiplas extensões filamentosas. Esta alteração na forma foi associada ao colapso do citoesqueleto de F-actina demonstrada na microscopia de fluorescência. Um aumento da produção RhoA foi detectada no grupo tratado com Gln e Ala-Gln. Demonstramos que a morfologia das células intestinais e organização do citoesqueleto foram dramaticamente alteradas pela TcdA e que a suplementação com Ala-Gln e Gln impediu o dano celular epitelial intestinal induzida pela TcdA provavelmente por aumentar a expressão RhoA. A TcdA induziu uma redução de 8,4% na proliferação celular, enquanto o Ala-Gln e Gln aumentou 13,2% e 12,7%, respectivamente. A TcdA induziu as células ao dano oxidativo, que foi revertido com o uso de Gln e Ala-Gln. Nossos resultados fornecem justificativa para o uso potencial de Ala-Gln e Gln como terapia adjuvante na doença causada pelo *Clostridium difficile*. Investigação de alterações morfológicas e citoesqueleto usando avançadas técnicas de microscopia pode auxiliar na avaliação da atividade de proteção ou terapêutica de drogas contra os efeitos TcdA.

Palavras- Chaves: *Clostridium difficile*, Glutamina, Alanil-glutamina, Toxina A e RhoA.

ABSTRACT

Clostridium difficile is the major cause of antibiotic-associated colitis, a disease with significant morbidity and mortality. Glutamine (Gln), a non-essential amino acid, is a major fuel for the dynamic intestinal cell population. Alanyl-glutamine (Ala-Gln) is a dipeptide that is highly soluble and well tolerated. The aim of this study was to analyze the changes induced by *Clostridium difficile* toxin A (TcdA) in intestinal epithelial cell morphology and cytoskeletal element and the effect of Gln and Ala-Gln treatment, using advanced microscopic techniques. Twelve well cell culture plates, with 13 mm diameter glass coverlids, were seeded with 5×10^5 IEC-6 cells and grown for 24h in DMEM media. Afterwards, the wells were incubated for 24h as follow: control, TcdA (10 ng/mL), TcdA + Gln (10 mM) and TcdA + Ala-Gln (10 mM). The cells were then fixed in 4% formaldehyde for 14 h and afterwards they were examined by atomic force microscopy (AFM), scanning electronic microscopy (SEM) and Fluorescent microscopy. For the SEM the samples were fixed to samples holders with carbon adhesive tape and covered with a 15 nm gold film for conductivity by sputter. To fluorescent microscopy the cells were permeabilized with PBS/Triton after that they were marked with stained with FITC-RhoA, Rhodamine-phalloidin and DAPI performed using an inverted fluorescence microscope. An immunoblotting was realized with the same groups. The PVDF membrane was incubated with RhoA antibody overnight and afterwards activated by Amersham kit. The proteic control was made by α -tubulin. Also performed experiments of cellular proliferation and oxidative stress. As observed by AFM, SEM and Fluorescent microscopy TcdA caused intense cell shrinkage with multiple extensions. This change in shape was associated with collapse of the F-actin cytoskeleton demonstrated by fluorescent microscopy. An increase of RhoA production was detected in the groups treated with Gln e Ala-Gln. We demonstrated that TcdA dramatically altered the intestinal cell morphology and cytoskeleton organization and that Ala-Gln and Gln supplementation consistently prevented the intestinal epithelial cell damage induced by TcdA probably by increasing RhoA expression. The TcdA induced a reduction of 8.4% in cell proliferation while the Ala-Gln and Gln increased by 13.2% and 12.7%, respectively. The TcdA induced cells to oxidative damage, which was reversed by the use of Gln and Ala-Gln. Our findings provide rationale for the potential use of Ala-Gln and Gln as adjuvant therapy in *Clostridium difficile* disease. Investigation of morphological and cytoskeleton changes using advanced microscopic techniques may aid in the evaluation of the protective or therapeutic activity of drugs against TcdA effects.

Key- Words: *Clostridium difficile*, Glutamine, Alanyl-glutamine, Toxin A and RhoA

LISTA DE FIGURAS

Figura- 1	Micrografia eletrônica dos bacilos do <i>Clostridium difficile</i>	015
Figura- 2	O efeito do uso de antibióticos sobre a flora intestinal e a sua relação com a infecção pelo <i>C. difficile</i>	019
Figura- 3	Aspecto do cólon normal e do cólon de indivíduo com DACD.....	020
Figura- 4	Esquema de tratamento com metronidazol e vancomicina par a infecção causada pelo <i>Clostridium difficile</i>	021
Figura- 5	Locus de patogenicidade das toxinas produzidas pelo <i>Clostridium difficile</i>	024
Figura- 6	Domínio das toxinas do <i>Clostridium difficile</i>	025
Figura- 7	Mecanismo de absorção das toxinas do <i>C.difficile</i>	026
Figura- 8	Regulação de Rho GTPases.....	030
Figura- 9	Análise das alterações morfológicas causadas pela TcdA do <i>C.difficile</i> em células epiteliais intestinais de rato (IEC-6) através do AFM.....	058
Figura-10	Análise das alterações morfológicas causadas pela TcdA do <i>C.difficile</i> em células epiteliais intestinais de rato (IEC-6) ao nível de celular através do AFM.....	059
Figura-11	Análise macroscópica do efeito da glutamina e da alanil-glutamina na lesão induzida pela TcdA do <i>C.difficile</i>	061
Figura-12	Efeito da TcdA do <i>C. difficile</i> sozinha ou associada a glutamina ou alanil-glutamina sobre a altura celular.....	062
Figura-13	Efeito da TcdA do <i>C. difficile</i> sozinha ou associada a glutamina ou alanil-glutamina sobre a área celular.....	062
Figura-14	Efeito da TcdA do <i>C. difficile</i> sozinha ou associada a glutamina ou alanil-glutamina sobre volume celular.....	063
Figura-15	Efeito da glutamina e da alanil-glutamina na lesão induzida pela TcdA do <i>C.difficile</i> em células epiteliais intestinais através do MEV.....	064
Figura-16	Efeito da TcdA do <i>C. difficile</i> , da glutamina e da alanil-glutamina na proliferação celular.....	065
Figura-17	Efeito da TcdA do <i>C. difficile</i> na distribuição das fibras de F-actina através da microscopia confocal.....	067

Figura-18	Efeito da TcdA do <i>C. difficile</i> , da glutamina e da alanil-glutamina no processo de lipoperoxidação lipídica.....	068
Figura-19	Efeito da TcdA do <i>C. difficile</i> , da glutamina e da alanil-glutamina nos níveis de GSH.....	069
Figura-20	Efeito da TcdA do <i>C. glutamina</i> e da alanil-glutamina na distribuição da proteína RhoA através da microscopia de imunofluorescência.....	071
Figura-21	Efeito da TcdA do <i>C. difficile</i> , da glutamina e da alanil-glutamina na distribuição das fibras de F-actina através da microscopia de imunofluorescência.....	072
Figura-22	Efeito da TcdA do <i>C. difficile</i> na distribuição das fibras de F-actina e proteína RhoA através da microscopia de imunofluorescência.....	073
Figura-23	Efeito da TcdA do <i>C. difficile</i> , da glutamina e da alanil-glutamina na concentração de proteína RhoA através de imunoblotting.....	074

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µL	Microlitros
5-FU	5-fluoracil
ADA	Adenosina deaminase
ADP	Adenosina difosfato
AFM	Microscopia de força atômica
Akt	Proteína fosforilada quinase B
Ala-Gln	Alanil-glutamina
AP-1	Proteína ativadora-1
ATP	Adenosina trifosfato
CDT	Toxina binária do <i>Clostridium difficile</i>
c-Jun	Fator de transcrição nuclear
cm	Centímetros
CO	Monóxido de carbono
DACD	Doença associada ao <i>Clostridium difficile</i>
DAPI	4'6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	<u>Dulbecco's Modified Eagle Medium</u>
EHNA	Eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)adenina
Elk-1	Fator de transcrição nuclear
ERK	Extracellular signal- related kinase
<i>et al</i>	E colaboradores
FBS	Soro fetal bovino
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GAP	GTPase accelerating protein
GDI	GDP dissociation inhibitor
GDP	Guanina difosfato
GEF	Fatores de troca de guanina
Gln	Glutamina
GSH	Glutathiona

GTP	Guanina trifosfato
h	Hora
HO-1	Hemi oxigenase-1
HSEs	Elementos do Heat Shock Protein
HSF-1	Fator transcricional do Heat Shock Protein
HSP	Heat shock proteins
HTC-8	Linhagem de células epiteliais de adenocarcinoma colorretal humano
IEC-6	Linhagem de células epiteliais intestinais de rato
IGF	Fator de crescimento
IL-1 β	Interleucina 1 beta
kDa	Kilodalton
LCTs	Grupo de toxinas clostridiais
M	Molar
MAPKs	Mitogen- activated protein kinase
MDA	Malonildialdeído
MEK	MAPK kinase
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mL	Minilitros
mM	Milimolar
MSO	l-methionine-sulphoximine
NAD	Dinucleótido de nicotinamida-adenina
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
p	Significância
PaLoc	Locus patogenicidade
PBS	Tampão fosfato-salino
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3K	Fosfatidilinositol quinase 3
PMNL	Leucócitos polimorfonucleares
Rb	Rubídio
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro

rpm	Rotações por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SEM	Scanning Eletrocnic Microscopy
SlpA	Proteína A da camada superficial
TcdA	Toxina A do <i>Clostridium difficile</i>
TcdB	Toxina B do <i>Clostridium difficile</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
U	Unidade
UDP	5' difosfato de uracila
WST-1	4-[3-(4-iodophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1-3-benzene disulfonate
x	Vezes
ZnPP	Zinco protoporfirina

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	015
1.1	<i>Clostridium difficile</i>	
1.1.1	O <i>Clostridium difficile</i> e seus aspectos históricos e epidemiológicos.....	015
1.1.2	Doença associada ao <i>Clostridium difficile</i>	018
1.1.3	Toxinas do <i>Clostridium difficile</i>	022
1.1.3.1	Toxina A do <i>Clostridium difficile</i>	027
1.1.4	Proteína Rho.....	028
1.2	GLUTAMINA	032
1.2.1	Aspectos históricos.....	032
1.2.2	Considerações sobre o metabolismo e a bioquímica da glutamina.....	034
1.2.3	Aspectos moleculares da ação da glutamina.....	036
1.2.4	Alanil-glutamina	041
1.2.5	Suplementação.....	042
1.3.	JUSTIFICATIVA.....	044
2.	OBJETIVO.....	046
2.1	Objetivo Geral.....	046
2.2	Objetivos Específicos.....	046
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	047
3.1	Drogas e reagentes.....	047
3.2	Cultura de células.....	047
3.3	Tripsinização das células.....	048
3.4	Microscopia de força atômica (AFM)	049
3.5	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	050
3.6	Proliferação celular.....	051
3.7	Imunoblotting.....	051
3.8	Dosagem de Malonildialdeído (MDA).....	053
3.9	Dosagem de Grupos Sulfrídilas (GSH).....	053
3.10	Microscopia confocal.....	054
3.11	Imunofluorescência.....	055
3.12	Análise Estatística.....	056
4.	RESULTADOS.....	057

4.1	Análise do efeito da TcdA do <i>C. difficile</i> em células epiteliais intestinais de ratos (IEC-6) através do AFM.....	057
4.2	Análise do efeito da TcdA do <i>C. difficile</i> associada ou não à Gln ou Ala-Gln em células epiteliais intestinais de ratos (IEC-6) através do AFM.....	060
4.3	Efeito da Gln e da Ala-Gln em células epiteliais intestinais de rato (IEC-6) infectadas pelo TcdA do <i>C. difficile</i> através da MEV.....	063
4.4	Efeito da TcdA do <i>C. difficile</i> , da Gln e da Ala-Gln na proliferação celular	065
4.5	Efeito da TcdA do <i>C. difficile</i> , da Gln e da Ala-Gln sobre a F-actina analisado da perspectiva da microscopia confocal.....	066
4.6	Efeito da TcdA do <i>C. difficile</i> , da Gln e da Ala-Gln analisado sobre a perspectiva do estresse oxidativo.....	068
4.7	Efeito da TcdA do <i>C. difficile</i> , da Gln e da Ala-Gln sobre F-actina e proteína Rho.....	069
5.	DISCUSSÃO.....	075
6.	CONCLUSÕES.....	081
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	082
	ANEXO	097

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Clostridium difficile*

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

O *Clostridium difficile* é um bacilo gram positivo, anaeróbio e formador de esporos, considerado a maior causa de diarreia nosocomial (figura1). A infecção pelo *C. difficile* ocorre principalmente em indivíduos em uso de antibióticos de largo espectro como fluoroquinonas e cefalosporinas (BLOSSOM; MACDONALD, 2007; DIAL *et al.*, 2005). O *C. difficile* se encontra com frequência no ambiente e como parte da flora intestinal normal em 3% da população adulta (ARTEAGA *et al.*, 2009).

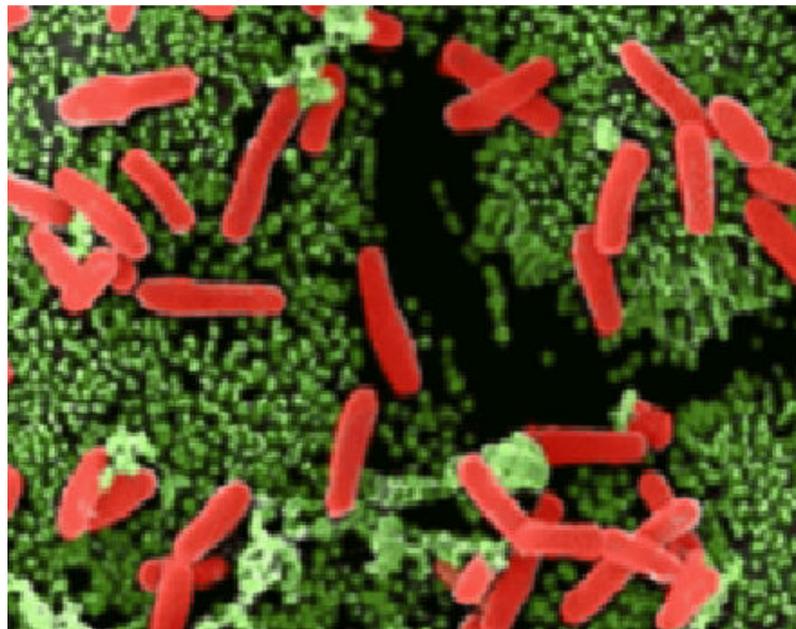


Figura 1- Micrografia eletrônica dos bacilos do *Clostridium difficile*. Fonte: Universidade de Hobot University of Wales College of Medicine UK. Acessado em 29 de setembro de 2011. Disponível em: http://www.health.qld.gov.au/EndoscopeReprocessing/module_1/1_3d.asp#Cdiff.

O *C. difficile* está associado com diarreia tanto em humanos como em animais (KEEL *et al.*, 2007). As mesmas cepas encontradas em humanos podem ser encontradas em alimentos e em animais com o ribotipo 027 e outro ribotipo altamente virulento 078, que é predominante e está relacionado com surgimento de doença associada ao *C. difficile* (DACD) em comunidades (RUPNIK, 2007; SONGER *et al.* 2009). Metcalf *et al.* (2011) mostrou que a contaminação pelo *C. difficile* de frutos do mar e peixes em pontos de comercialização pode ocorrer da mesma forma que acontece com carnes cruas, carnes processadas, saladas e legumes. Alguns cuidados como cozimento dos alimentos, além de evitar a contaminação cruzada entre cru e cozida deve ser tomados, no entanto é importante salientar que não foi comprovado nenhum caso de DACD de origem alimentar.

As primeiras pesquisas envolvendo o *C.difficile* datam de 1935 quando Hall e Toole, pesquisando microbiota intestinal de neonatos saudáveis, descreveram um microorganismo até então desconhecido, que originalmente recebeu a denominação de *Bacillus difficilis* e depois de *Clostridium difficile* refletindo a enorme dificuldade encontrada para isolar e manter este microorganismo em cultura pura. Estes autores também revelaram que o *C.difficile* é toxicogênico, devido a achados de lesões, parada respiratória e morte em animais de laboratórios quando submetidos à injeção de sobrenadante de cultura ou filtrado do meio que continha esse microorganismo (HALL; TOOLE, 1935; LYERLY *et al.*, 1988).

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

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

A epidemiologia da DACD está marcada pelo aumento no número de casos e aumento da gravidade nos últimos dez anos, o que tem sido relacionado ao surgimento de uma cepa hipervirulenta caracterizada como tipo toxicogênico III, ribotipo por PCR 027, denominada NAP1/BI/027, esta cepa produz uma maior quantidade de toxina A (TcdA) e B (TcdB), bem como uma toxina binária (CDT) por isso esta cepa tem alta patogenicidade, além de ter maior capacidade de esporular e que lhe dá um grande potencial epidêmico no âmbito hospitalar e da comunidade (ARTEAGA *et al.*, 2009; POPOFF *et al.*, 1988).

Em 2002, a Universidade de Pittsburgh nos Estados Unidos relatou um aumento nos casos graves de colite causada pelo *C.difficile*. Em seguida, foi relatado também um aumento contínuo da incidência de pacientes com DACD no Canadá, nos Estados Unidos e na Europa (KUIJPER; COIGNARD; TULL, 2006; LOO *et al.*, 2005; PEPIN *et al.* 2004). Por volta de 15.000 a 20.000 pacientes morrem por ano com DACD nos Estados Unidos. Segundo dados anuais do estado de Ohio em 2006 se estima que há aproximadamente 500.000 casos de DACD por ano em hospitais nos EUA e casas de cuidados de longa duração (RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009). Na América do Sul, principalmente no Brasil e alguns países da Europa ainda não tem sistema de notificação para medir a incidência e os óbitos associados ao DACD (BALASSIANO *et al.*, 2009; RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009).

Na Saxônia, Alemanha, a incidência de DACD cresceu do intervalo de 1,7-3,8 casos por 100.000 pessoas em 2002 para 14,8 casos por 100.000 pessoas em 2006 (BURCKHARDT *et al.*, 2008). Na Inglaterra e em Gales houve 975 óbitos associados à DACD em 1999, 6480 em 2006, e 8324 em 2007, um aumento de 750% em sete anos (UK NATIONAL STATISTICS, 2007).

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

Gerding (2009), não há evidências significativas que alimentos contaminados por *C. difficile* possam gerar DACD em humanos.

Em relação ao Brasil temos poucos dados de detecção do *C. difficile*, pois não temos um sistema de notificação. O estudo realizado por Ferreira *et al.* (2003) mostrou que o *C. difficile* foi isolado em 5,5% das crianças internadas com diarreia aguda em São Paulo e que as crianças saudáveis não eram hospedeiras deste bacilo. Pinto *et al.* (2003) investigou a presença de cepas de *C. difficile* em crianças que estavam internadas ou em tratamento ambulatorial com diarreia ou não, e isolou *C. difficile* em 6,7% das amostras de fezes. Em estudo realizado por Balassiano *et al.* (2009) durante o período de um ano, 28,5% dos pacientes internados em um hospital do Rio de Janeiro apresentaram DACD ativa, tiveram bactérias isoladas de 66,7% de suas amostras de fezes. A análise através de PCR revelou que os isolados foram distribuídos entre dois ribotipos respectivamente, 014 (cepas 1575 e 1598) e 106 (cepas 1599 e 1602). A análise também revelou que as cepas encontradas neste estudo não estavam relacionadas com a cepa hipervirulenta NAP1/027.

No Ceará, Lima *et al.* (1993) mostrou em estudo realizado no Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará, que o *C. difficile* é o principal agente causador de diarreia hospitalar neste estabelecimento. Desta forma, numerosas pesquisas laboratoriais e clínicas indicam que o *C. difficile* é o principal agente causador de doenças intestinais associado ao uso de antimicrobianos, que, além do mais, tem contribuído para o aumento dos índices de mortalidade por doenças diarreicas causadas por esse microrganismo (POTHOULAKIS; LAMONT, 2001).

1.1.2 Doença associada ao *Clostridium difficile* (DACD)

Segundo González- Garcia, Gómez- Pavón e Martínez- Porras (2005), a seqüência para o aparecimento da diarreia causada pelo *C. difficile* ocorre da seguinte forma: uso de antibiótico de amplo espectro, alteração da flora intestinal (Figura 2), exposição e colonização pelo *C. difficile* e por fim a produção de toxinas que induzem a resposta inflamatória aguda, podendo variar de uma simples diarreia até uma colite pseudomembranosa (Figura 3). A infecção causada pelo *C. difficile* pode causar na sua forma mais grave uma colite necrosante no qual por vezes se torna necessário tratamento radical

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

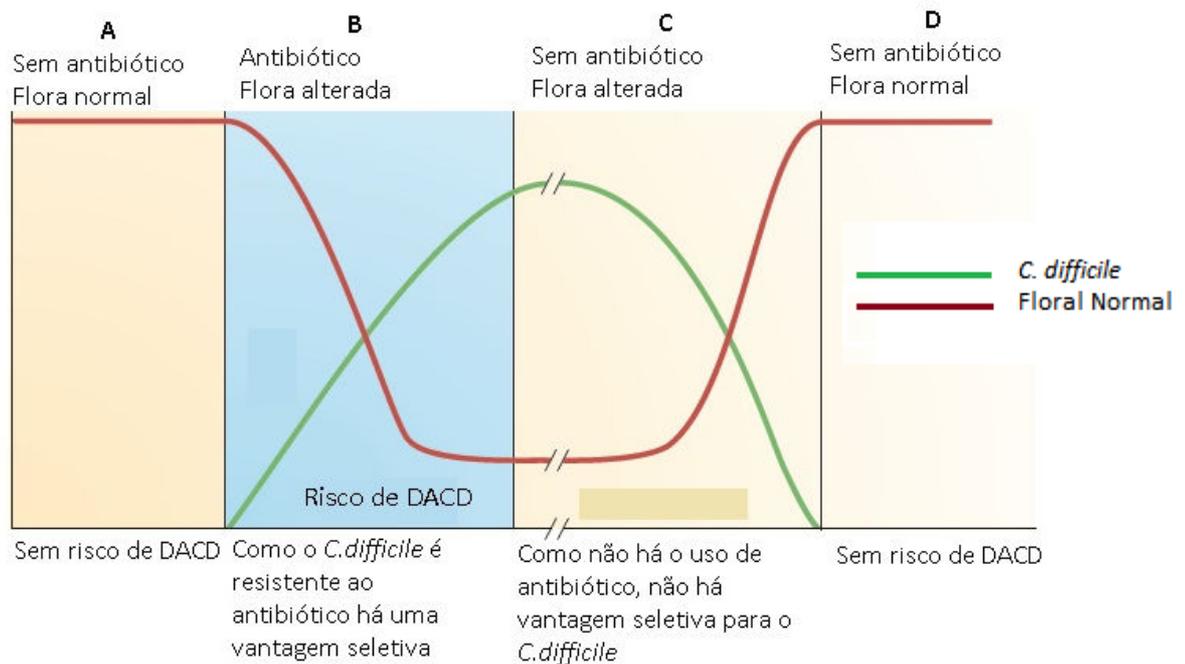


Figura 2 - O efeito do uso de antibióticos sobre a flora intestinal e a sua relação com a infecção pelo *C. difficile*. A. Pacientes resistentes à Doença Associada ao *Clostridium difficile* (DACD), pois sua flora intestinal está normal, sem uso de antibióticos B. O início no uso de antibiótico altera a flora intestinal e pode levar a uma provável infecção pelo *C. difficile* C. Apesar da suspensão do antibiótico a flora intestinal continua alterada por um período de tempo variável que depende do antibiótico utilizado D. neste período o paciente pode estar infectado pelo *C. difficile*, mas com a recuperação da microflora a resistência à colonização pelo *C. difficile* é restaurada. Adaptada de Rupnix, Wilcox e Gerding (2009).

O diagnóstico definitivo da DACD é obtido através da detecção das toxinas em amostras de fezes, sendo considerado o padrão ouro o teste de citotoxicidade e crescimento de *C. difficile* em cultivo de fezes, pois tem alta sensibilidade e especificidade (KELLY; LAMONT, 1998). Outros testes também são utilizados enzimoimunoanálises para detecção de TcdA e TcdB, resultado por volta de 4h e teste de citotoxicidade, porém este detecta principalmente a presença de TcdB (POUNTANEN; SIMOR, 2004). O grupo europeu de estudo sobre o *C. difficile* propôs alguns critérios para ser considerado positivo o diagnóstico

de DACD, o paciente deve apresentar de forma combinada algumas das seguintes situações: (a) fezes diarréicas ou megacolon tóxico e uma técnica de laboratório positiva para toxina A (TcdA) e/ou toxina B (TcdB) nas fezes, (b) colite pseudomembranosa observada através da endoscopia gastrointestinal baixa, (c) amostra colônica com características histopatológicas de DACD obtida por endoscopia, colectomia ou autopsia associada a dois episódios de DACD no mesmo paciente que se consideraram eventos distintos entre si por ocorrerem com diferença mínima de dois meses entre um e outro (ARTEAGA *et al.*, 2009). Segundo este mesmo autor não será considerado caso de DACD pacientes que apresentarem testes positivos para TcdA e/ou TcdB do *C. difficile*, mas que sejam assintomáticos.

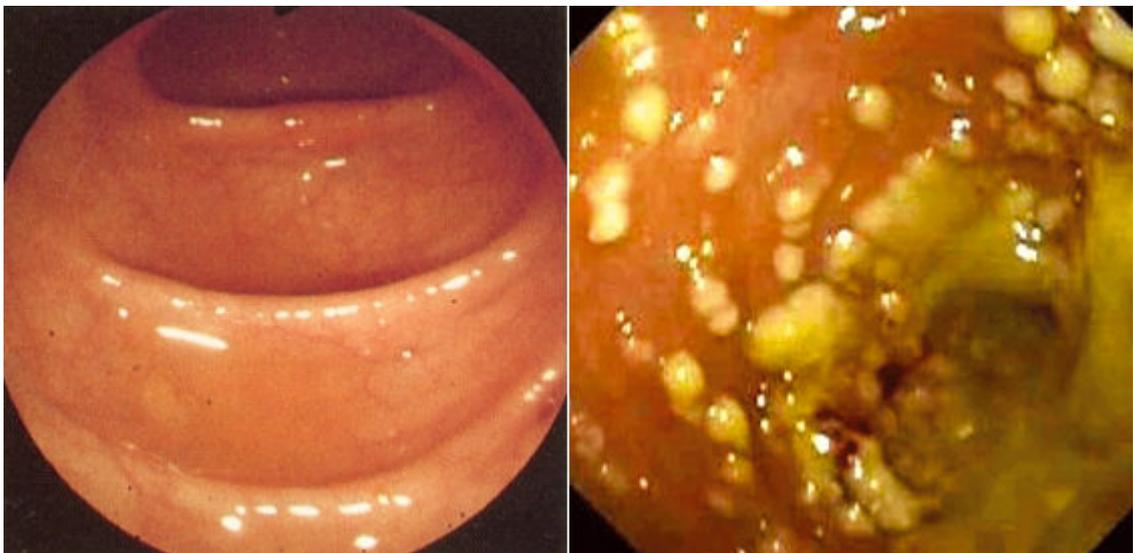


Figura 3 - Aspecto do cólon normal (esquerda) e do cólon de indivíduo com doença associada ao *Clostridium difficile* (DACD)(direita). Colonoscopia do intestino normal e em seguida a imagem das pseudomembranas formadas por placas amareladas e confluentes Adaptada de Rupnik; Wilcox e Gerding, 2009.

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

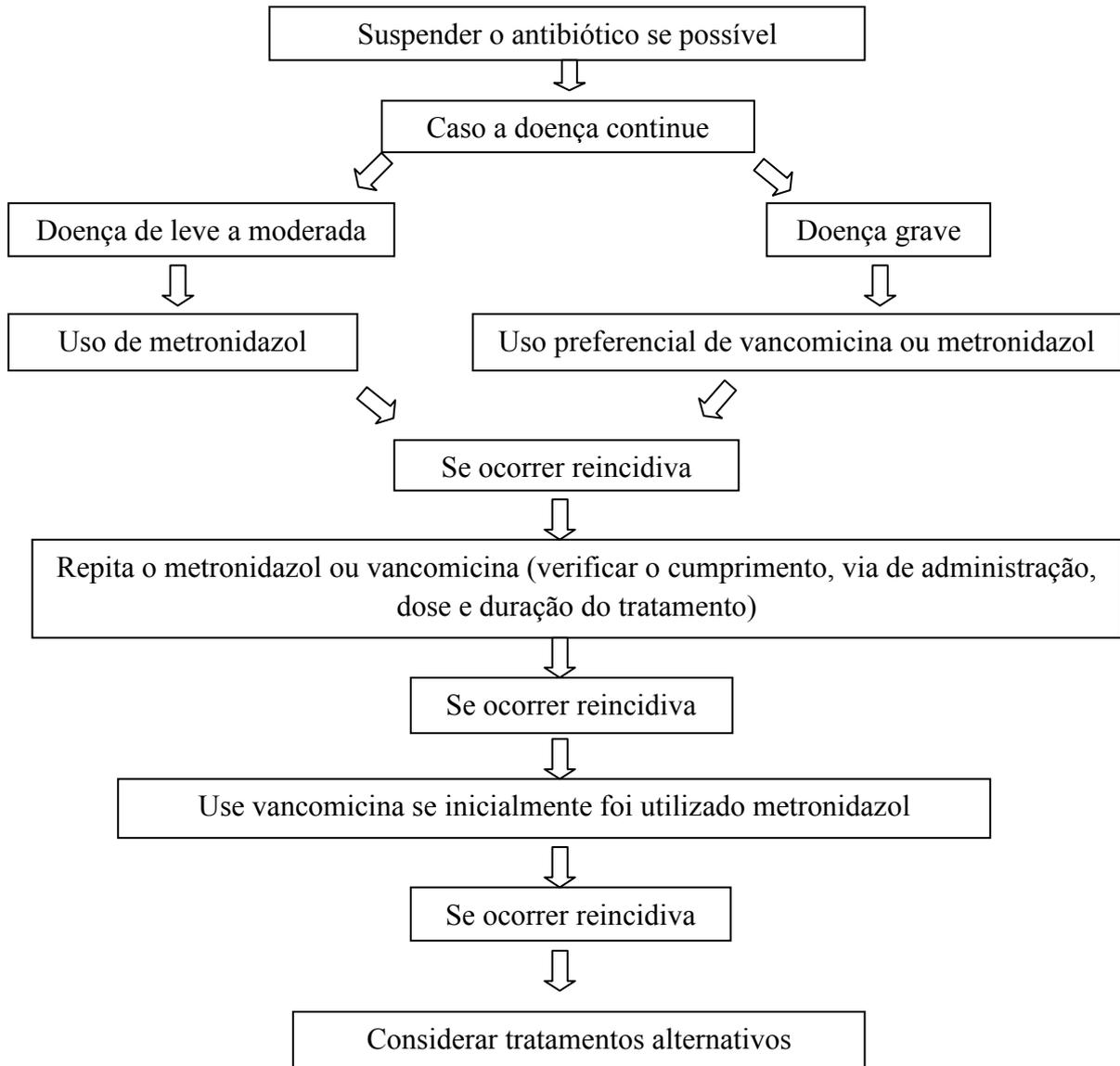


Figura 4- Esquema de tratamento com metronidazol e vancomicina para infecção causada pelo *Clostridium difficile*. Adaptado de LaMont, 2008, Johnson 2009 e Kelly e Cimolai 2011.

Segundo Cimolai (2011) a terapia com metronidazol é utilizada por causa do seu baixo custo, tem taxa de eficiência de 90% em caso de DACD leve e moderada além de não promover o aumento da resistência bacteriana, no entanto as taxas de resposta ao metronidazol podem estar mudando sugerindo uma eficácia reduzida. A vancomina tem seu uso preferencial em casos mais graves onde sua eficiência é 10-15% maior que o metronidazol, porém tem custo elevado e pode ocasionar reações de aumento de resistência bacteriana (CIMOLAI, 2011; GONZÁLEZ- GARCIA; GÓMEZ- PAVÓN; MARTÍNEZ-PORRAS, 2005; GERDING, 2009). Algumas terapias alternativas estão sendo estudadas segundo Gerding (2009) para o tratamento do DACD como o uso de probióticos, produção de vacinas e nosso grupo de pesquisa têm estudado o papel de micronutrientes como a glutamina

e alanil-glutamina na lesão induzida pela toxina A do *C. difficile* (NASCIMENTO *et al.*, 2005; BRITO *et al.*, 2005; CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2006).

Na transmissão do DACD, o esporo bacteriano é o agente contaminante. Esses esporos são resistentes à dessecação, produtos químicos e temperaturas extremas, também freqüentemente contaminam o meio ambiente em torno dos pacientes com DACD (VISWANATHAN; MALLOZZI; VEDANTAM, 2010). Segundo Fawley *et al.* (2007) a cepa epidêmica do *C. difficile* tem maior capacidade de esporulação *in vitro* que as outras cepas. Conforme pesquisa realizada por Baines *et al.* (2008) em modelo intestinal *in vitro*, a vancomicina não teve uma resposta positiva em relação ao crescimento de esporos de *C. difficile*, porém um lipoglicopeptídeo denominado Oritavancin impediu este processo. Estudos aprofundados sobre a esporulação e germinação do *C. difficile* podem gerar novos conhecimentos sobre fatores de risco e opções de tratamento (RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009).

A habilidade de formação de esporos faz com que o *C. difficile* seja resistente ao ambiente hospitalar (BAINES *et al.*; 2008). Estes bacilos possuem proteínas superficiais que estão associadas à virulência, sendo estas proteínas de grande relevância para aderência do mesmo à mucosa intestinal, além de poderem induzir a resposta de anticorpos e inflamatória no hospedeiro (AUSIELLO *et al.*, 2006; DRUDY *et al.*, 2004; WRIGHT *et al.*, 2005). Conforme Merrigan, Gerding e Vedantam (2006) existem uma variabilidade considerável entre as proteínas de superfície de diferentes cepas, principalmente nas proteínas A da camada superficial (SlpA) e as cepas consideradas mais virulentas como BI/NAP1/027 apresentam uma SlpA alterada que é responsável pelo aumento da aderência nas células epiteliais humanas de acordo com a indicação de estudos preliminares. No entanto, os principais fatores de virulência do *C. difficile* são as toxinas A e B.

1.1.3 Toxinas do *Clostridium difficile*

O *C. difficile* produz a enterotoxina toxina A, a citotoxina toxina B e a toxina binária (CDT), isolada de cepa NAP1/B1/027. Grande parte da sintomatologia da DACD, como diarréia secretória e inflamação da mucosa intestinal (figura 3) provavelmente é induzida por essas toxinas (JANK; GIESEMANN; AKTORIES, 2007; RUPNIK; JUST,

2006; THELESTAM; CHAVES-OLARTE, 2000). Essas toxinas são citotóxicas, promovendo alterações no citoesqueleto de F-actina e nas junções oclusivas resultando na diminuição da resistência transepitelial, acúmulo de fluídos e destruição do epitélio intestinal, sendo esta lesão ao epitélio capaz de suscitar a liberação de mediadores inflamatórios: mastócitos e macrófagos (POTHOULAKIS, 2000; RIEGLER *et al.*, 1995; RUPNIK; JUST, 2006; THELESTAM; CHAVES-OLARTE, 2000). Estudo realizado por nosso grupo de pesquisa, Brito *et al.*, (2002a) mostra que a TcdA também altera a forma e a função dos leucócitos polimorfonucleares, o que pode estar relacionado com a formação de pseudomembranas. Além disso, a TcdA modifica o funcionamento dos nervos entéricos e neurônios sensoriais resultando no influxo de células inflamatórias, aumentando a secreção de fluidos, inflamação intestinal e a transmigração de neutrófilos (POTHOULAKIS, 2000).

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

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

As cepas toxicogênicas abrigam uma ilha genômica 19,6 Kb chamado Locus patogenicidade (PaLoc) (figura 5), contendo cinco genes; alguns raros isolados abrigam seis

genes (RUPNIK, 2009), dois genes do PaLoc codificam a toxinas TcdA (309 kDa) e TcdB (267 kDa), que são glicosiltransferases, que têm como alvo as proteínas Rho, Rac e Cdc42 da célula hospedeira (POTHOULAKIS, 2000).

PaLoc traz também genes para outras proteínas TcdC, TcdR e TcdE, com as seguintes características/função respectivamente, ser um regulador negativo além de modular a expressão gênica da toxina, a segunda é um ativador, fator sigma, necessário para expressão de TcdA e TcdB e a terceira é uma proteína lítica, semelhante à proteína “holins”, que pode facilitar a liberação da TcdA e TcdB ao ambiente extracelular. (DUPUY *et al.*, 2008; MATAMOUROS; ENGLAND; DUPUY, 2007; TAN; WEE; SONG, 2001). A toxina binária (CDT) é codificada fora do PaLoc pelos genes *cdtA* e *cdtB* (O’CONNOR; JOHNSON; GERDING, 2009). Em cepas não toxicogênicas o PaLoc é substituído em 115bp de sequência não codificante.

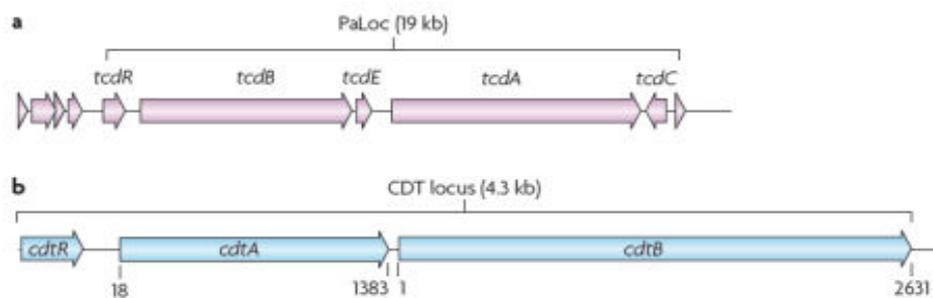


Figura 5- Locus de patogenicidade das toxinas produzidas pelo *Clostridium difficile*. a. A toxina A do *Clostridium difficile* (TcdA) e a toxina B do *Clostridium difficile* (TcdB) são codificadas no locus de patogenicidade (PaLoc), que é composta de cinco genes. Cepas não toxicogênicas, esta região é substituída por uma curta sequência de 115bp. Ambas as toxinas são proteínas de cadeia simples. b. A toxina binária do *Clostridium difficile* (CDT) compreende três genes, codificado em uma região separada do cromossomo (CdtLoc), é composta de duas proteínas desvinculadas, sendo *cdtB* que tem uma função de ligação e o *cdtA* é o componente enzimático. Adaptada de Rupnik, Wilcox e Gerding (2009).

TcdA e TcdB são produzidos durante o final da fase de crescimento logarítmico e a fase estacionária. Sua produção depende de fatores como os níveis de nutrientes, temperatura e presença de antibióticos em níveis subinibitórios (DUPUY *et al.*, 2008; SAXTON *et al.*, 2009). A síntese das toxinas são reguladas pelas TcdC, TcdR e agentes externos ao PaLoc, incluindo CodY (DINEEN *et al.*, 2007). A CDT é composta por duas proteínas *cdtA* e *cdtB* (figura 4), a *cdtB* se liga as células hospedeiras e transloca *cdtA* no citosol, que é o componente catalítico (RUPNIK; WILCOX; GERDING, 2009). Os genes que

codificam *cdtA* e *cdtB* estão localizados no lócus da toxina binária (*Cdtloc*), juntamente com outro gene regulador *cdtR* (CARTER *et al.*, 2007). Mesmo com essas informações o papel do CDT na DACD não é bem esclarecido. Geric *et al.* (2006) mostrou que tipos selvagens de cepas que produzem CDT mas não produzem TcdA e TcdB podem colonizar hamsters, mas não matar. Torna-se portanto necessários mais estudos a fim de esclarecer o papel da CDT na doença associada ao *C.difficile*

Jank e Aktories (2008) mostraram que a TcdA e a TcdB tem uma estrutura de domínio multi-modular (figura 6), como o modelo ABCD, que compreende: (A) domínio N-terminal biologicamente ativo, sendo este responsável pela glicosilação da proteína Rho (DAVIES *et al.* 2011); (B) domínio C-terminal, que interage com estruturas de carboidratos como o Gal- α (1,3)-Gal β - (1,4)-GlcNAc sobre as células epiteliais do hospedeiro, embora ainda precise ser identificado o receptor de carboidratos em humanos (JANK; GIESEMAN; AKTORIES, 2007; NA *et al.*, 2008); (C) domínio cisteína protease, faz parte da região hidrofóbica e desempenha um papel na clivagem proteolítica da toxina, pois TcdA e TcdB sofrem um processo auto-catalítico de clivagem, na presença de InsP₆; (D) domínio hidrofóbico, que é pensando está envolvido na formação de poros antes da translocação do domínio (A) para o citosol (BARTH *et al.*, 2001; QA'DAN *et al.* 2000).

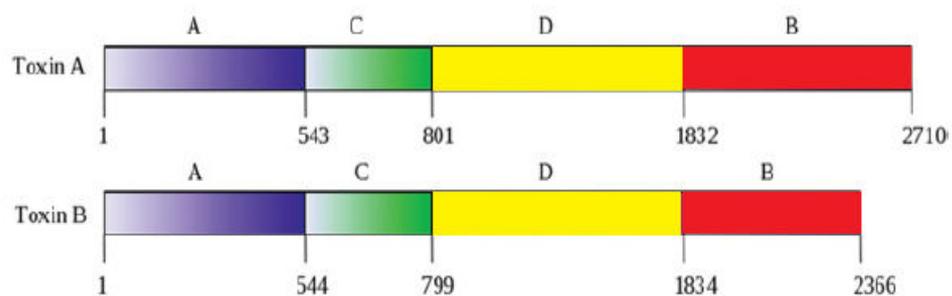


Figura 6 – Domínio das toxinas do *Clostridium difficile*. A toxina A do *Clostridium difficile* (TcdA) e a toxina B do *Clostridium difficile* (TcdB) são compostas por quatro domínios respectivamente: A. domínio N-terminal (azul escuro); C. domínio cisteína protease (verde); D. domínio hidrofóbico (amarelo) e B. domínio C-terminal (vermelho). Adaptada de Davies *et al.*, (2011).

Segundo Davies *et al.* (2011) o mecanismo de absorção das toxinas (figura 7) não é claro, porém existem evidências que mostram um procedimento em quatro etapas. Sendo a primeira etapa: a ligação do domínio C-terminal aos receptores na superfície celular seguida da endocitose da toxina para o compartimento endossomal. A segunda etapa consiste na

diminuição do pH no compartimento endossomal, causando uma mudança conformacional nas proteínas da toxina, permitindo a formação de poros e a translocação de parte da toxina para o citosol, que foi demonstrado através do uso de íons de Rb^{86} (BARTH *et al.*, 2001; QA'DAN *et al.* 2000). A terceira fase é caracterizada pela autoproteólise das toxinas fazendo com que somente o domínio N-terminal seja lançado no citosol. Acredita-se que o domínio cisteína protease esteja envolvido neste processo que requer a presença de $InsP_6$. A última etapa mostra que as proteínas da família Rho são glicosiladas pelo domínio N-terminal no citosol (DAVIES *et al.*, 2011; GENTH *et al.*, 2008).

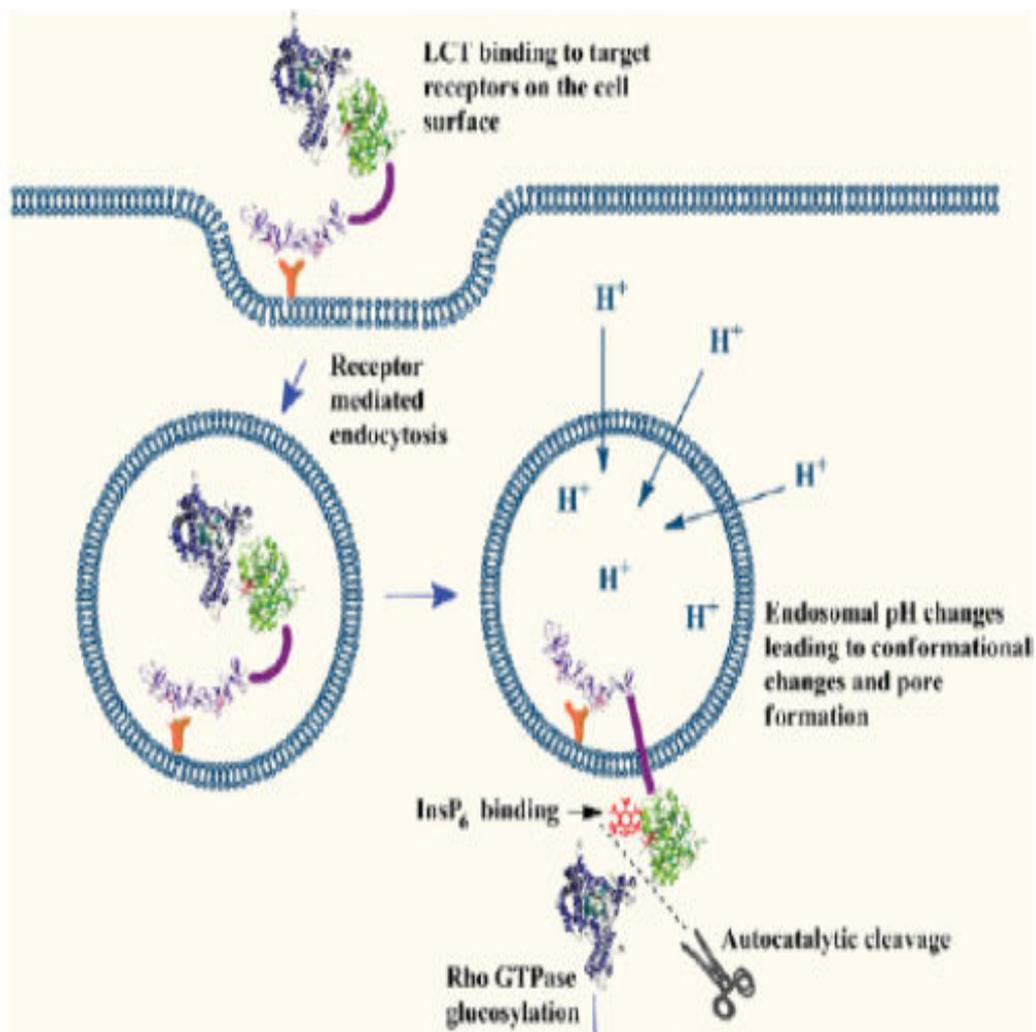


Figura 7 – Mecanismo de absorção das toxinas do *Clostridium difficile*. As toxinas se ligam a célula-alvo através do domínio B sendo captados por endocitose mediada pelo receptor, após uma mudança no pH endossomal ocasionando mudanças conformacionais da toxina, o domínio D forma um poro na membrana endossomal permitindo translocação do domínio A para o citosol. Este sofre então a clivagem autocatalítica através do domínio C na ligação $InsP_6$, sendo o domínio A liberado para o citosol onde glicosila Rho GTPases. Adaptada de Davies *et al.*, (2011).

1.1.3.1 Toxina A do *Clostridium difficile*

O nosso grupo de pesquisa tem se dedicado ao estudo da toxina A do *Clostridium difficile*. A TcdA é uma proteína de alto peso molecular (308 kDa) e o seu uso purificado no lúmen intestinal *in vivo* causa alterações no epitélio intestinal, secreção intestinal, intensa inflamação da mucosa e colite hemorrágica (LYERLY *et al.*, 1988). A monoglicosilação da proteína Rho é considerado o principal efeito da TcdA e esta modificação está relacionada com as alterações no citoesqueleto de F-actina, retração celular, perda de adesão celular e o arredondamento das células em cultura (JUST *et al.*, 1995; HALL, 1998). A TcdA estimula a liberação de mediadores endógenos da inflamação como: fator de necrose tumoral α , interleucina 1, 6 e 8, leucotrieno B₄ e fator ativador plaquetário (FANG *et al.* 1994).

Através de um modelo de alça intestinal isoladas de coelho, Lima e colaboradores (1989) mostraram que após 2h de inoculação dessas alças com TcdA havia infiltrado neutrofílico na lâmina própria e na superfície epitelial juntamente com a destruição da mucosa. O nosso grupo utilizou a fucoidina, que é um inibidor de moléculas de adesão essenciais para migração leucocitária, em um modelo de alça isolada de camundongo injetada com TcdA tendo como resultado uma redução na secreção e infiltração celular inflamatória e do dano de mucosa (BARRETO *et al.* 2008). Nas alças ileais de camundongos injetadas com TcdA também observamos um aumento nos níveis de adenosina deaminase (ADA), que é uma enzima responsável pela degradação da adenosina e desempenha um importante papel nas reações inflamatórias. A utilização de um agonista do receptor A_{2A} de adenosina observou-se uma redução na secreção, lesão tecidual e infiltração de células inflamatórias induzidas pela TcdA, revelando outra via relevante para a fisiopatologia da colite causada pela TcdA (CAVALCANTE *et al.*, 2006). Ao ser utilizado o EHNA, o inibidor da enzima adenosina desaminase, neste mesmo modelo, observou-se que ocorre uma redução da destruição da mucosa intestinal, infiltração neutrofílica e secreção (JUNQUEIRA, 2011).

Conforme Lyerly e colaboradores (1988) a lesão causada pela TcdA do *C. difficile* está associada ao influxo de neutrófilos para dentro da mucosa colônica, inclusive polimorfonucleares característicos da colite pseudomembranosa. O nosso grupo de pesquisa publicou em 2002, um estudo sobre o efeito da TcdA purificada *in vitro* na forma e na função de leucócitos polimorfonucleares (PMNL). A TcdA induziu mudanças na forma, que foi acompanhada pelo rearranjo do citoesqueleto de F-actina. PMNL que receberam

TcdA mostraram maior aderência a componentes de matriz extracelular e expressaram menos L-selectina e mais Mac-1, em comparação ao grupo não tratados, sendo este efeitos ocasionados possivelmente pela a capacidade da TcdA glicosilar Rho GTPases em neutrófilos humanos (BRITO *et al.*, 2002b). Neste mesmo ano o grupo também mostrou alguns mecanismos através dos quais a TcdA pode induzir a apoptose em células epiteliais intestinais colônicas humanas (T-84), verificamos que o processo de apoptose era dependente do tempo de incubação e da dose de TcdA utilizada, que o processo de apoptose era completamente inibido pelo bloqueio da atividade enzimática da toxina na Rho GTPases com uridina-5-difosfato-2,3- dialdeído e parcialmente inibida quando se utilizava inibidores de caspases 1, 3, 6,8 e 9. Portanto, a TcdA induzia a apoptose pelo mecanismo dependente da inativação de Rho, ativação das caspases 3, 6, 8 e 9, Bid e por lesão mitocondrial (BRITO *et al.*, 2002a). Estudo realizado por Kim e colaboradores (2007) mostrou que a TcdA também induz a liberação de prostaglandina E₂ que promove a ativação do fator NF-κB e do sistema Fas/FasL causando apoptose e inflamação de forma conjunta com os outros fatores anteriormente mostrados.

Outros estudos do nosso grupo (BRITO *et al.*, 2005; CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2006; NASCIMENTO *et al.*, 2005) mostram o efeito de micronutrientes como: glutamina e alanil-glutamina na lesão induzida pela TcdA, como veremos adiante.

1.1.4 Proteínas Rho

Segundo Etienne-Manneville e Hall (2002) e Jaffe e Hall (2005), as proteínas Rho, pertencem a um subgrupo de superfamília das proteínas Ras que se caracterizam por serem proteínas de 20-30kDa e se apresentarem ligadas à guanina trifosfato (GTP), são sinalizadores moleculares envolvidos em diversos processos de sinalização, incluindo a regulação da actina no citoesqueleto, o ciclo celular, transcrição de genes, controle de atividade enzimática de lipídeos quinases, fosfolipases e dinucleotídeo adenina nicotanimida oxidase. A proteína Rho participa também de funções barreira epitelial e contato célula-célula, na migração de células imunes, fagocitose, produção de citocinas, o reparo de feridas, a sinalização das células imunológicas e produção de ânion superóxido (Figura 8) (JANK; GIESEMANN; AKTORIES, 2007).

As proteínas Rho agem como interruptores moleculares alternando entre o estado inativo ligado a guanidifosfato (GDP) e ativo ligado a guaninotri-fosfato (GTP), na forma ativa as Rho GTPases interagem com cascatas de ativação específicas iniciando o processo de ativação, sendo esse processo regulado pelos fatores de troca de guanina (GEFs), que catalisam o estado inativo do Rho ao estado ativo e proteínas ativadores de GTPases (GAPs), que aumentam a taxa intrínseca de hidrólise de GTP para GDP (JAFTE; HALL, 2005; JANK; GIESEMANN; AKTORIES, 2007). Os mesmos autores relataram que também participam dessa regulação o GDIs, que são inibidores de dissociação de GDP, e GAP, os quais regulam a ativação de Rho GTPases por meio do processo de captura do ligante do Rho em ambos estados ligado a GTP e GDP permitindo o processo de transporte entre membrana e o citosol dessa proteína (Figura 8).

O alvo das toxinas do *C.difficile* no citosol são as proteínas Rho, sendo os substratos preferenciais RhoA, C, Rac1-3, RhoG, Cdc42 e TC10 (JANK; GIESEMANN; AKTORIES, 2007). Dentro das células as toxinas utilizam a glicose-uridina difosfato (UDP-glicose) como substrato e a transfere para um receptor do aminoácido treonina (Thr) em quase todas as subfamílias das GTPases (Rho, Rac e Cdc42), inativando-as. O resíduo aceptor da treonina está na posição 37 da Rho e na posição equivalente (Thr – 35) da Rac e da Cdc42 (JUST *et al.* 1995; SELZER *et al.*, 1996; POPORFF *et al.*, 1996). Thr37/35 são altamente conservadas dentro da pequena família GTPases, essenciais para a ligação de nucleotídeos e coordenação do cátion bivalente de magnésio, além de estar na região que é responsável pelas principais mudanças conformacionais que ocorrem após a ativação do GDP/GTP (VETTER; WITTINGHOFER, 2001). As mudanças ocasionadas pela toxina na proteínas Rho e Ras produz várias conseqüências funcionais (Figura 8).

Após a glicosilação das proteínas Rho / Ras, as mesmas não são capazes de interagir com seus efetores. Além da glicosilação, ocorre a inibição de GTPases pequenas por GEFs e dificultar o transporte membrana citosol, pois a Rho glicosilada está associada à membrana celular (GENTH; AKTORIES; JUST, 1999; HENEWER *et al.*, 2005; HERRMANN *et al.*, 1998; SEHR *et al.*, 1998). Outra conseqüência estrutural relevante que foi mostrada por Vetter *et al.*(2000) e Geyer *et al.*(2003), em proteínas Ras glicosilada é, provavelmente, a inibição da mudança na conformação ativa da GTPase.

A monoglicosilação da Rho GTPases não é a única atividade enzimática descrita para a toxina A. Na ausência de uma proteína aceptor, a TcdA pode hidrolisar a UDP-glicose em UDP e glicose. Essa atividade é similar aquela de certas ADP-ribosiltransferases

microbianas, tais como a toxina da cólera que ribosila ADP nas proteínas alvo, assim como hidrolisa NAD em nicotinamida e ADP-ribose na ausência da proteína aceptora (VAUGHAN; MOSS, 1997).

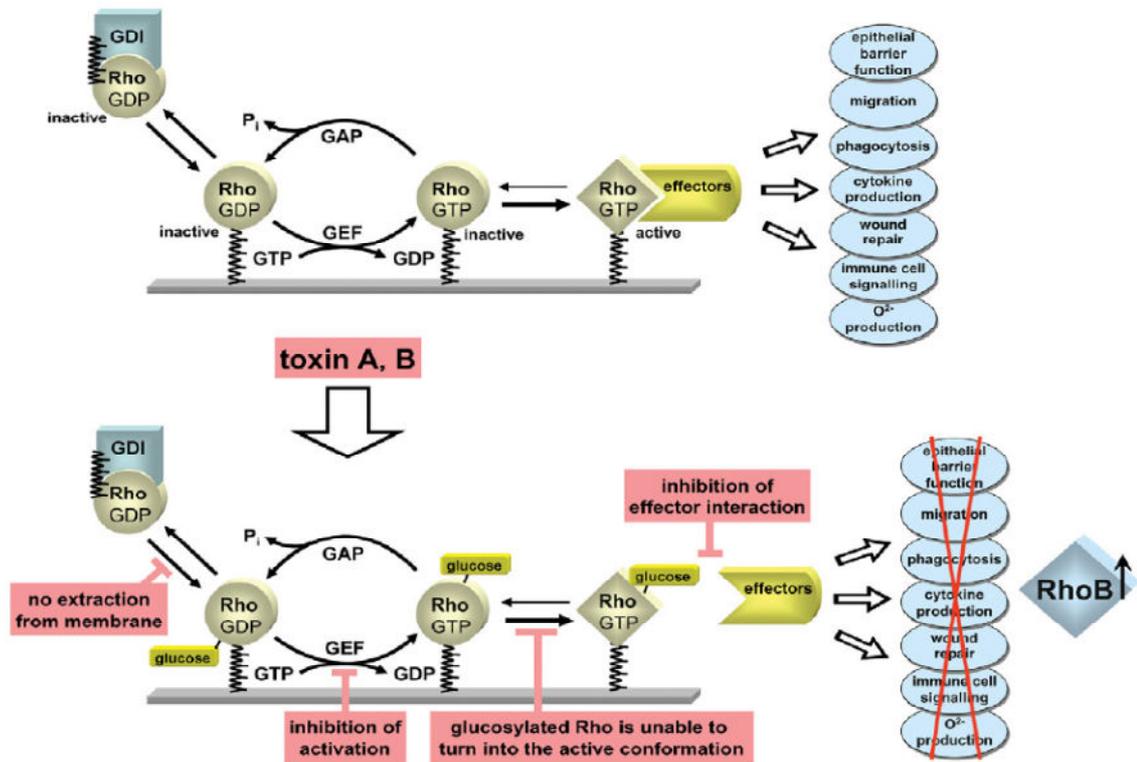


Figura 8- Regulação de Rho GTPases. Rho GTPases são regulados por um ciclo de GTPase. Estão inativos na forma de Rho-GDP e ativos Rho-GTP. Fatores de nucleotídeo guanina (GEFs) causam a ativação de Rho GTPases. GAPs facilita a inativação de proteínas Rho, estimulando sua atividade GTP hidrólise. GDIs mantem a forma inativa de Rho no citoplasma. Rho-GTP interage com múltiplos efetores, incluindo proteínas e lipídeos quinases, fosfolipases, controla funções imunes e de defesa das células-alvo, incluindo função de barreira epitelial, sinalização imunológica, fagocitose e a cicatrização de feridas. TcdA e TcdB do *C. difficile* glicosilam Rho GTPases na Thr35/37 inibindo: as ações interações efetoras, a ativação por GEFs e impede o transporte do Rho da membrana. Rho GTPases glicosilada não são capazes de se transformar em sua conformação ativa. Além disso, as toxinas induzem aumento da expressão de RhoB. Adaptada de Jank, Giesemann e Aktories, 2007.

Em estudo publicado por Gerhard *et al.* (2008) mostrou-se os efeitos citopáticos e citotóxicos da TcdA, sendo considerado o efeito citopático a glicosilação do Rho GTPase induzindo a reorganização do citoesqueleto de actina, além de mostrar que a glicosilação da Rho também resultando na ativação da Caspase-3 que leva a apoptose como efeito citotóxico.

Conforme Gerhard *et al.* (2005) as toxinas aumentam a expressão de Rho B em células-alvo, esse efeito depende da atividade das glicosiltransferases das toxinas, portanto essa descoberta pode explicar alguns efeitos inflamatórios das toxinas. Rho B que não é

glicosilada pela TcdA e/ou TcdB está relacionada com a morte celular programada (HUELSSENBECK *et al.*, 2007).

A TcdA e a TcdB induzem apoptose (ativação de caspases, condensação de cromatina ou exposição de fosfatidilserina) ou necrose (definida pela depleção de ATP, geração de espécies reativas de oxigênio, perda da integridade da membrana, ou ativação calpaína / catepsina) (VOTH; BALLARD, 2005; KIM *et al.*, 2007; HUELSSENBECK *et al.*, 2007). Em relação à patologia de DACD, deve-se assumir que a necrose pode ser mais importante do que a apoptose, já que esta é acompanhada por uma liberação do conteúdo citoplasmático, que alerta o sistema imunológico, levando a inflamação local (GENTH *et al.*, 2008).

1.2 GLUTAMINA

A glutamina é um aminoácido livre, sendo classificado nutricionalmente como um aminoácido condicionalmente essencial já que pode ser sintetizado pelo organismo a partir de outros aminoácidos, mas em situações de desequilíbrio seu aporte na dieta pode ser requerido. A glutamina está envolvida em diversas funções do organismo como: proliferação e desenvolvimento celular, participação do sistema antioxidante, transporte de amônia entre tecidos, fonte de energia para enterócitos e sistema imune entre outras (CRUZAT; PETRY; TIRAPEGUI, 2009; FRANCISCO *et al.* 2002; HISCOCK; PEDERSEN, 2002).

A concentração plasmática de glutamina, em humanos, varia entre 0,5 a 0,9 mM, sendo que isto representa aproximadamente 20% do total de aminoácidos livres do plasma. Como a glutamina é um dos aminoácidos constituintes das proteínas, está presente em maior nível no plasma, nos tecidos e principalmente no tecido muscular (FRANCISCO *et al.*, 2002; HISCOCK; PEDERSEN, 2002). A concentração intracelular deste aminoácido varia de acordo com o tipo de célula, entre 2 e 20 mM e extracelular em torno de 0,7mM (CURI *et al.*, 2005).

Alguns estudos mostram que em situações de elevado catabolismo, a concentração de glutamina pode ficar reduzida levando a possível diminuição da resistência das células às lesões, podendo ocorrer processos de apoptose, além de ativar as vias de estresse. Por esses motivos, a suplementação com glutamina e seus derivados estáveis vem

sendo pesquisada (CRUZAT; PETRY; TIRAPEGUI, 2009; CURI *et al.*, 2005; FRANCISCO *et al.*, 2002; LARSON *et al.* 2007; RHOADS; WU, 2009).

1.2.1 Aspectos históricos

Segundo Hiscock e Pedersen (2002), Hlasiwetz e Haberman em 1873 foram os primeiros a observar a glutamina como sendo uma molécula com propriedades biológicas importantes, por fazerem parte de componentes estruturais das proteínas. Em 1935, Krebs mostrou que as células possuem capacidade de sintetizar e degradar a glutamina. Já em Eagle (1955) mostrou que a glutamina era essencial para o crescimento e manutenção das células em cultura.

O desenvolvimento de novas técnicas científicas possibilitou a observação de diversos mecanismos e efeitos moleculares nos quais a glutamina está envolvida. Os processos metabólicos dependentes deste aminoácido são conhecidos como vias glutaminolíticas (CRUZAT; PETRY; TIRAPEGUI, 2009; CURI *et al.*, 2005)

Na década de 70 estudos desenvolvidos por Windmueller e Spaeth mostraram que glutamina é o principal combustível metabólico das células intestinais superando glicose e ácidos graxos (CURI *et al.*, 2005; RHOADS; WU, 2009).

Em trabalhos realizados nos últimos trinta anos, observou-se que a glutamina não possui apenas a função de síntese protéica, mas atua como um relevante intermediário em diferentes processos metabólicos em diferentes tipos celulares. Este aminoácido atua como precursor de peptídeos, purinas e pirimidinas, além de participar da síntese de nucleotídeos e ácidos nucléicos (CRUZAT; PETRY; TIRAPEGUI, 2009; CURI *et al.*, 2005; FRANCISCO *et al.*, 2002).

Nos anos 90 foi muito questionado o papel da glutamina em relação a doenças nutricionais como: doença inflamatória intestinal, síndrome do intestino curto, diarreia crônica e falência múltipla dos órgãos (WANG; QIAO; LI, 2008). Este aminoácido foi ideal para estudar o tratamento de doenças diarreicas, pois o transporte foi acoplado ao sódio e o seu efeito sobre a absorção de sódio foi aditivo ao de glicose, mesmo em condições associadas com lesão intestinal, como no caso da enterite causada por rotavírus (RHOADS *et al.* 1991).

Estudos com tipo celulares como: linfócitos, macrófagos, enterócitos, adipócitos, neutrófilos, células β - pancreática demonstram que nos meios de cultura que contem glutamina a proliferação celular pode ser aumentada e as estruturas e funções celulares podem ser mantidas (CRUZAT; PETRY; TIRAPEGUI, 2009; CURI *et al.*, 2005; HISCOCK; PEDERSEN, 2002).

Em trabalho realizado por Rhoads *et al.*(1997), o mesmo encontrou que glutamina na concentração de 10 mM sinaliza para o núcleo o início do processo mitogênese das células intestinais. Este aminoácido também foi o primeiro descoberto que tem capacidade de ativar a sinalização celular relacionado à quinases. Os processos de sinalização melhores pesquisados para glutamina foram: o sinal para proliferação intestinal através dos mitogen-activated protein kinase (MAPKs), a melhora da sobrevivência das células intestinais e de outros órgãos vitais pelas heat shock proteins (HSP), e o sinal para bloquear a apoptose do enterócito (RHOADS; WU, 2009).

Os artigos científicos relacionados à glutamina publicados nos últimos 20 anos são por vezes controversos em relação aos efeitos em seres humanos. Os estudos que mostraram eficácia deste aminoácido foram realizados com: modelos de estresse, incluindo falência múltipla de órgão, endotoxemia, queimaduras na pele e câncer (RHODS; WU, 2009). Alguns médicos e nutricionistas em sua prática clínica utilizam a glutamina em pacientes com diarreia, quimioterapia, queimaduras cutâneas extensas e atletas. Talvez a falta de eficácia em alguns ensaios clínicos de tratamento humano e para a suplementação de atletas diz respeito á dose estudada ou á heterogeneidade das condições clínicas (CRUZAT; PETRY; TIRAPEGUI; 2009, RHOADS; WU, 2009).

A importância da glutamina para função celular foi reconhecida primeiramente por Krebs, entretanto o pressuposto inicial de que este aminoácido era uma fonte de combustível respiratório e de nitrogênio para reações de biossíntese foi redimensionado para uma percepção na qual a glutamina desempenha uma variedade de funções regulatórias em diversas células do organismo, inclusive através dos mecanismos de sinalização celular (CURI *et al.*, 2005; RHOADS; WU, 2009). Sendo que os seus mecanismos de ação ainda estão sendo elucidados.

1.2.2 Considerações sobre o metabolismo e a bioquímica da glutamina

A glutamina ($C_5H_{10}N_2O_3$) é um L- α - aminoácido sintetizado por todos os tecidos do organismo, com peso molecular de 146,15 kDa e é uma molécula polar, portanto possui uma característica hidrofílica, sendo facilmente hidrolisada por ácidos ou bases (CRUZAT; PETRY; TIRAPEGUI, 2009; ROGERO; TIRAPEGUI, 2003). Apesar de a glutamina ser classificada como um aminoácido não essencial, esta classificação tem sido questionada, pois em situações críticas, a sua síntese não atende a demanda do organismo (WRAY; MAMMEN; HASSELGREN, 2002).

As enzimas responsáveis diretamente pela síntese da glutamina a partir de glutamato ou por sua degradação são: a glutamina sintetase e a glutaminase (FRANCISCO *et al.*, 2002; NEWSHOLME *et al.*, 2003). A glutamina sintetase é uma aminotransferase, sendo considerada uma enzima chave para síntese de glutamina e regulação do metabolismo celular de nitrogênio. Faz sua ação na forma de catálise que converte glutamato em glutamina, consumindo amônia com fonte de nitrogênio e consome trifosfato de adenosina (ATP) (FRANCISCO *et al.*, 2002). Glicocorticóides, hormônios tireoidianos, hormônios do crescimento e insulina regulam a atividade da glutamina sintetase (ARDAWI, 1990; SANTOS; CAPERUTO; COSTA ROSA, 2007). Diversas funções são atribuídas à glutamina sintetase: no cérebro atua na redução da amônia e na síntese de glutamina (ROWBOTTON; KEAST; MORTON, 1996), nos rins age na manutenção do pH e regulação do metabolismo de nitrogênio (LABOW; SOUBA; ABCOUWER, 2001), no pulmão e no músculo esquelético é responsável pelo controle dos níveis plasmáticos de glutamina (PINEL *et al.*, 2006), sendo todos estes órgãos considerados tecidos sintetizadores de glutamina (NEWSHOLME *et al.*, 2003; CRUZAT *et al.*, 2007).

Segundo Francisco *et al.* (2002), o primeiro a descrever uma enzima capaz de hidrolisar a glutamina em glutamato e amônio foi Krebs em 1935, essa enzima é chamada de glutaminase. Sendo essa hidrólise o primeiro passo na sua utilização a partir da síntese de glutamato, permitindo que ocorram outras reações como o consumo deste aminoácido no ciclo do ácido tricarboxílico (RENNIE *et al.*, 2001). Existem duas isoformas desta enzima, sendo que a sua forma mais ativa se encontra nas mitocôndrias (LABOW; SOUBA; ABCOUWER, 2001). Os tecidos que apresentam elevada atividade de glutaminase são

considerados consumidores de glutamina e esses tecidos são: rins, intestino e células do sistema imune.

O músculo esquelético é o local onde ocorre a maior síntese, estoque e liberação de glutamina, porém em situações de estresse o consumo de glutamina excede a capacidade de síntese corporal. Fibras musculares oxidativas ou tipo 1 apresentam maior estoque de glutamina por causa da quantidade de ATP disponível (ROWBOTTON; KEAST; MORTON, 1996). No período pós-absortivo a captação de glutamato, disponível na corrente sanguínea, pelo músculo esquelético promove a síntese de glutamina (NEWSHOLME *et al.*, 2003).

A glutamina necessita de transporte ativo para dentro célula, por um sistema dependente de sódio (Na^+), para qual se faz necessário o gasto de ATP. Ao ser absorvido este aminoácido promove simultaneamente a absorção de água e a liberação de potássio (K^+), o que aumenta o estado de hidratação e influencia no volume celular (CRUZAT *et al.*, 2007). O aumento do volume celular é considerado um sinal anabólico, pois pode estimular a síntese protéica (MEIJER, 2003).

A regulação da quantidade de glutamina na corrente sanguínea se realiza através dos glicocorticóides que estimulam a liberação de glutamina para o meio extracelular e a insulina e os fatores de crescimento (IGF) favorecem a captação de glutamina pelo meio intracelular (ROGERO; TIRAPEGUI, 2003).

Segundo Curi *et al.* (2005) e Francisco *et al.* (2002), a glutamina pode ser oxidada completamente até formar gás carbônico ou ser convertida em numerosos intermediários metabólicos, doando um grupo amina em uma variedade de reações de transaminação. Portanto, é principal substrato energético para células de divisão rápida como enterócitos e linfócitos.

Em situações de jejum prolongado há um aumento na liberação de glutamina, a fim de prevenir o efeito tóxico da amônia originada da proteólise muscular. Este aminoácido serve como sistema de transporte de amônia até o fígado para formar uréia e o seu esqueleto carbono é utilizado no processo de neoglicogênese, contribuindo desta forma para manutenção da glicemia (ARDAWI, 1990; FRANCISCO *et al.*, 2002; SANTOS; APERUTO; COSTA ROSA, 2007).

No processo infeccioso existem alterações relevantes no metabolismo dos leucócitos, isso acarreta um aumento no consumo de glutamina por essas células, gerando uma maior demanda de produção deste aminoácido pelos músculos esqueléticos. Quando esta condição se prolonga, a proteólise reduz os estoques e massa muscular provocando perda de

peso, caquexia, diminuição no metabolismo de gorduras e por fim há uma redução significativa na disponibilidade de glutamina, alterando o metabolismo de vários órgãos (CURI *et al.*, 2005; FRANCISCO *et al.*, 2002).

1.2.3 Aspectos moleculares da ação da glutamina

A modulação da expressão de genes relacionados com a síntese e degradação de proteínas, a proliferação celular e a modulação de vias envolvidas com apoptose celular estão entre os papéis exercidos pela glutamina (NEWSHOLME *et al.*, 2003; ROGERO; TIRAPÉGUI, 2003; SINGLETON; BECKEY; WISCHMEYER, 2005; SINGLETON; WISCHMEYER, 2007). Uma das principais vias de sinalização que contribui para a sobrevivência da célula e para as alterações na sua homeostasia é a ativação da HSP, que tem sua ação modulada pela glutamina (GABAI; SHERMAN, 2002).

Segundo Wischmeyer (2002), durante o ciclo celular, as HSPs são encontradas em baixas concentrações e em diferentes compartimentos celulares, quando estas células são submetidas a situações de injúria ocorre o desencadeamento de respostas intracelulares com o objetivo de proteger a célula de uma possível lesão. O início dessa resposta acontece com a redução temporária da síntese de proteínas consideradas não vitais, seguida por um aumento na transcrição, tradução e expressão de genes específicos que levam ao aumento da concentração das HSPs. Esses polipeptídeos contribuem para o reparo de estruturas na molécula protéica, na identificação e remodelamento das proteínas danificadas durante períodos de estresse e na síntese de novas proteínas a fim de manter a sua forma estrutural (BURG; FERRARIS; DMITRIEVA, 2007). Sandres e Kon (1991) mostram que em evidências experimentais quando ocorre o aumento da disponibilidade de glutamina, as células podem aumentar a expressão de HSPs e por conseqüência a capacidade da célula resistir a lesões.

Estudos investigaram os mecanismos pelos quais glutamina induz HSP expressão em linhagens de células intestinais, eles descobriram que doses fisiológicas lúminais de glutamina (1-5 mM) quando aplicada a células, que estavam sem a presença deste aminoácido, ocorre o aumento da sua resistência a oxidação que leva a morte celular sendo

que esta citoproteção foi associada com a indução da HSP 70 (PHANVIJHITSIRI *et al.*, 2006; ROPELESKI *et al.*, 2005; WISCHMEYER *et al.* 1997).

Naka *et al.* (1996) mostrou o efeito de uma administração intravenosa de dipeptídeo de glutamina em ratos sépticos e constatou que a mortalidade foi significativamente menor no grupo tratado com glutamina através de nutrição parenteral do que no grupo controle que recebeu dieta convencional. Estudos em humanos relataram que pacientes tratados com glutamina apresentaram menos infecções clínicas e menor tempo de internação (HOUDIJK *et al.*, 1998; MORLION *et al.*, 1998). Portanto, alguns pesquisadores têm sugerido que a glutamina pode ser útil no tratamento de infecções estabelecidas ou inflamação (WILMORE; SHABERT, 1998). Estudo publicado pelo nosso grupo de pesquisa mostrou que ratos tratados com l-methionine-sulphoximine (MSO), com o objetivo de inibir a síntese endógena de glutamina, ao serem submetidos há um processo inflamatório causado por carragenina ou pela toxina A do *C.difficile* tiveram um aumento no edema de pata, aumento da atividade da mieloperoxidase no tecido, aumento do fator de necrose tumoral α e da interleucina - 1β , alterações que não ocorreram no grupo no qual os ratos foram tratados simultaneamente com MSO e glutamina, portanto concluiu-se que a depleção de glutamina potencializa a inflamação aguda, possivelmente pelo aumento da migração de neutrófilos através da ativação de células residentes e produção de IL- 1β e TNF- α e a suplementação deste micronutriente inverte estes efeitos e pode ser útil durante o estresse catabólico inflamatório (NASCIMENTO *et al.*, 2005).

O efeito da glutamina no aumento da expressão das HSPs ocorre de maneira dose dependente, pois maiores concentrações são necessárias de acordo com a intensidade do processo (SINGLETON; WISCHMEYER, 2007). As pesquisas *in vitro* e *in vivo* revelam a importância metabólica da glutamina na expressão das HSPs, principalmente no aumento da proteção da integridade celular, porém o mecanismo deste processo de modulação ainda precisa de maiores esclarecimentos (BURG; FERRARIS; DMITRIEVA, 2007).

Um dos mecanismos reguladores da capacidade da célula em ativar os HSPs é a expressão do fator transcricional de choque térmico -1 (HSF-1) encontrado na forma inativa, a sua ativação se dá através de vários estímulos de estresse que desencadeiam a fosforilação de monômeros latentes inativos deste composto encontrado no citoplasma (AHN; THIELE, 2003; ATALAY *et al.*, 2004; GABAI; SHERMAN, 2002). Ao serem fosforilados esses monômeros se combinam e se convertem em um oligômero homotrímico do HSF-1, no qual ativado se transloca para o núcleo da célula e se liga a locais específicos da região promotora

de genes das HSPs, denominados elementos de choque térmico (HSEs) permitindo o início do processo de síntese, transcrição e tradução do RNAm das HSPs (AHN; THIELE, 2003; ATALAY *et al.*, 2004).

Segundo Rhoads e Wu (2009) resultados mostrados por Ropeleski *et al.* (2005) indicam que glutamina não afeta a via clássica de ativação do HSF-1, mas que a ligação do transfator dependente de glutamina pode estar em outro lugar no promotor HSP 72 ou um coativador pode aumentar a transcrição de HSP 72. Segundo o mesmo autor o tratamento de células epiteliais intestinais e outros epitélios com glutamina aumentam os níveis de proteínas HSP 72 e HSP 27.

Em vários modelos de doenças, o efeito protetor da glutamina requer a indução de um fator de proteção heme oxigenase-1 (HO-1) regulador da resposta hipóxica (BILBAN *et al.* 2008). Giris *et al.* (2006) através de um modelo de radiação induzida que causava dano intestinal mostrou que inibição da HO-1 com zinco protoporfirina bloqueou o efeito protetor da glutamina. Achados semelhantes foram observados em ratos injetados com endotoxina, sugerindo que a HO-1 medeia a citoproteção (UEHARA *et al.*, 2005).

O nosso grupo de pesquisa investigou o papel da HO-1 e da via do monóxido de carbono (CO) na enterite induzida pela TcdA do *C. difficile* em camundongos. O tratamento de camundongos infectados pela TcdA com substrato para HO (haemin) ou com um doador de carbono (DMDC) impediu edema, a ruptura da mucosa e a infiltração de neutrófilos, observados através da análise histológica. E também diminuiu a atividade de mieloperoxidase e a produção de fator de necrose tumoral α e interleucina-1 β . Em contraste, ao ser utilizado o ZnPP IX, inibidor específico de HO-1, exacerbou todos esses parâmetros avaliados. O experimento de imunohistoquímica mostrou que a TcdA promove o aumento da expressão de HO-1. Portanto, a via HO-1/CO exerce um efeito protetor quando há a enterite causada pela TcdA do *C.difficile* (MEDEIROS *et al.* 2011).

A glutamina também está relacionada com a inibição da apoptose em células intestinais. Ko *et al.* (1993) mostraram que células de linhagem intestinal de ratos (RIE-1) quando semeadas sem qualquer fornecimento de glutamina por 24 h ocorreu a apoptose. Estes resultados sugerem que a glutamina atua como um fator de sobrevivência para enterócitos. Evans *et al.* (2003), demonstram que o fator de necrose tumoral α está relacionado com o ligante indutor de apoptose (TRAIL), que em células colônicas epiteliais, HT-29 a indução da apoptose foi caracterizada pela condensação nuclear e ativação de caspase-8 e caspase-3. O

pré-tratamento com glutamina inibiu a apoptose induzida pela TRAIL, mas outros aminoácidos como a glutatona (GSH) não teve esta capacidade. O nosso grupo de pesquisa em 2006 estudou a apoptose *in vivo* e *in vitro* induzida pela TcdA do *C. difficile* e o efeito da glutamina e do seu derivado estável alanil-glutamina, sendo demonstrado que em células epiteliais intestinais T-84 e em alças ileais de coelho a TcdA induziu caspases 6, 8 e 9 antes de ativar a caspase 3 em células T84 e induziu também a clivagem Bid por um mecanismo de caspase-independente. Gln ou alanil-glutamina reduziu significativamente a apoptose induzida pela TcdA e inibiu a ativação da caspase 8, além de reduzir a secreção e a ruptura do epitélio intestinal (CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2006).

Larson e colaboradores (2007) pesquisaram a apoptose e sua relação com a via de sinalização extracelular relacionada a quinase (ERK). É proposto que a ativação da fosfatidilinositol quinase 3 (PI3K) / proteína fosforilada quinase B (Akt) durante os períodos de privação de glutamina acontece provavelmente como forma de mecanismo de proteção para limitar a apoptose relacionada ao estresse celular (RHOADS; WU, 2009).

Em um estudo relacionado às junções oclusivas, Li *et al.* (2004) demonstrou que a privação de glutamina em monocamadas de células Caco-2 através da utilização de um inibidor de glutamina sintetase leva à dissolução de componentes da junção oclusiva, incluindo claudina-1 e proteínas de zônula de oclusão-1, este efeito pode ser revertido com a adição de 0,6 mM de glutamina ao meio anteriormente livre deste aminoácido.

A glutamina também atua com sinal de proliferação para células intestinais. Segundo estudos publicados por Rhoads *et al.* (1997 e 2000) células que estavam sem glutamina e depois foram submetidas à concentração de 2,5mM deste aminoácido, apresentaram um aumento de 20 vezes na incorporação de timidina ao DNA, o que caracteriza uma resposta proliferativa. Os aumentos foram associados com a ativação do ERKs 1 e 2 via MAPK quinase (MEK) (Rhoads *et al.* 2000) e fosforilação de fatores de transcrição nuclear Elk-1 e c-Jun, concomitante com a ativação da proteína ativadora-1 (AP-1) de transcrição gene dependente (Rhoads *et al.* 1997).

Larson *et al.* (2007) nesse estudo da RIE-1, fez a inibição da ERK com UO126 ou PD98059 bloqueando sua capacidade de prevenir apoptose, sendo que a ativação da ERK pela glutamina é essencial para a sobrevivência das células intestinais. Contrariamente, os achados de Rhoads *et al.* (2000) mostrou que a inibição de ERK na presença de glutamina não bloqueou o estímulo deste aminoácido no aumento do número de células. Esta discrepância pode estar relacionada ao uso da glutamina em níveis séricos de 1 mM como foi utilizado por

Larson *et al.* (2007) em contraste com a dose farmacológica de 10 mM utilizada por Rhoads *et al.* (2000). Outras explicações possíveis incluem o uso de diferentes linhagens celulares e um índice diferente de proliferação (RHOADS; WU, 2009).

Nosso grupo de pesquisa publicou em 2005 um estudo que teve por objetivo investigar o efeito da toxina A do *C. difficile* na migração de células epiteliais intestinais, apoptose e resistência transepitelial além de avaliar o efeito da glutamina e alanil-glutamina. TcdA reduziu de forma dose-dependente a migração e também causou a apoptose em células epiteliais intestinais. Gln e Gln-Aln reforçaram significativamente a migração e proliferação celular. Gln e Ala-Gln também previniram a inibição da migração, apoptose, e a queda inicial na resistência transepitelial induzida pela TcdA (BRITO *et al.*, 2005).

Esses efeitos mitogênicos e anti-apoptótico da glutamina também são observados em animais. Em estudos realizados em ratos com ressecção intestinal maciça são os que mostram melhores evidências que a glutamina pode promover o crescimento da vilosidade intestinal. Segundo Ziegler *et al.* (1996) ratos com síndrome do intestino curto resultantes de uma ressecção intestinal de 80%, a suplementação de Gln (2,2 g/kg em dieta enteral, em comparação a 0,4 g/kg na dieta controle) gerando um aumento de 40% do conteúdo de DNA da mucosa intestinal. Nosso grupo demonstrou em um estudo realizado em ratos que a glutamina modula o processo inflamatório e a sua depleção *in vivo* pode aumentar a produção de citocinas e a migração de neutrófilos em resposta da TcdA do *C. difficile* (NASCIMENTO *et al.*, 2005).

1.2.4 Alanil-glutamina

Segundo Rhoads e Wu (2009) a glutamina é atualmente disponível para uso parenteral, mas raramente é adicionado às soluções de nutrição parenteral, em grande parte devido à preocupação com a estabilidade deste aminoácido em temperatura ambiente. As características da glutamina que dificultam seu uso rotineiro na prática clínica são: a instabilidade ao calor de esterilização e ao armazenamento prolongado, solubilidade limitada (aproximadamente 3g/100mL a 20°C), velocidade de hidrólise e decomposição gerando ácido piroglutâmico e amônia (LIMA, 2006).

Essas limitações ao uso da glutamina favoreceram o desenvolvimento de dipeptídeos com resíduos de glutamina, nas posições N- ou C- terminal sendo estes: a L-alanil-L-glutamina e o Glicil-L-glutamina, que dispõe das seguintes características: altamente solúveis em água, estáveis a altas temperaturas, capacidade de armazenamento por até 2 anos o que permite o seu uso em soluções nutricionais enterais e parenterais (FURST; POGAN; STHELE, 1997).

Estudos do nosso grupo mostram que a alanil-glutamina tem o mesmo efeito que a glutamina na reparação da mucosa intestinal *in vitro* (BRITO *et al.*, 2005; CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2006) e *in vivo* (CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2006), quando o agente causador da lesão intestinal é a TcdA do *C. difficile*. Já em outro trabalho publicado pelo nosso grupo em 2004 no qual foi utilizado como modelo experimental a mucosite induzida por 5-fluorouacil (5-FU) em camundongos e administração da glutamina e alanil-glutamina foi realizada via oral, tivemos como resultado que somente a alanil-glutamina acelerou a recuperação intestinal, caracterizada predominantemente pela atividade mitótica aumentando o comprimento da cripta (CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2004).

1.2.5 Suplementação

Wischmeyer *et al.* (2001) e Ziegler *et al.* (2005) demonstraram que a suplementação nutricional de glutamina reduz as complicações clínicas dos pacientes. Estudos nos quais a L- glutamina foi administrada de forma parenteral revelaram que a maior oferta desse aminoácido as células pode atenuar a sua depleção no plasma e no meio intracelular na presença de situações de estresse (HISCOCK; PEDERSEN, 2002).

Flaring *et al.* (2003) mostrou que indivíduos submetidos à cirurgia na região abdominal que foram suplementados de forma parenteral, durante três dias com L-glutamina apresentaram uma atenuação da depleção muscular da GSH e com isso houve melhora a recuperação dos pacientes.

Em uma meta-análise sobre a suplementação de glutamina para lactentes se chegou à conclusão que a eficiência do tratamento é modesta, com amplos intervalos de confiança por causa da heterogenicidade dos estudos (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Já Grover *et*

al. (2007) mostrou que a suplementação de glutamina não tem efeito significativo em bebês com doença gastrointestinal severa.

Conforme Rogero *et al.* (2002) a suplementação oral com L-alanil-L-glutamina em ratos sedentários foi mais eficiente em promover o aumento da concentração plasmática de glutamina, após 30 minutos da intervenção, do que quando este aminoácido foi utilizado na forma livre. Outro estudo também realizado por Rogero *et al.* (2004) mostrou que a suplementação crônica em ratos com L-glutamina livre ou dipeptídeo não provocou mudanças na glutaminemia, entretanto o grupo suplementado com o dipeptídeo melhorou as concentrações de glutamina muscular e hepática. Por isso a utilização da alanil-glutamina surge como uma alternativa para aumentar a disponibilidade de glutamina as células.

Estudos controlados mostram que a suplementação com glutamina tem efeitos benéficos na condição clínica de pacientes críticos. E esse resultado é explicado pela influência da glutamina na resposta inflamatória, na regulação do processo de apoptose, na sinalização da proliferação intestinal, na manutenção das junções oclusivas e estresse oxidativo. O uso da glutamina em altas doses ($> 0,5\text{g/kg/dia}$) e por via parenteral se mostrou benéfica em pacientes gravemente enfermos (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Porém ainda são necessários maiores esclarecimentos sob a forma de administração se enteral ou parenteral e na forma de utilização da glutamina se aminoácido livre ou dipeptídeo alanil-glutamina bem como os mecanismos de ação protetores da glutamina.

1.3 JUSTIFICATIVA

O *Clostridium difficile*, um bacilo gram positivo, é considerado a causa mais importante de diarreia nasocomial, especialmente após o uso de antibióticos de largo espectro (BLOSSOM; MCDONALD, 2007). A doença induzida por esta bactéria pode variar desde uma leve diarreia até a colite pseudomembranosa com risco de morte. A mudança da epidemiologia da DACD está marcada pelo aumento no número de casos e aumento da gravidade nos últimos dez anos, que tem sido atribuído ao surgimento de uma cepa hipervirulenta NAP1/BI/027 que produz quantidades aumentadas das toxinas A e B, bem como uma toxina chamada toxina binária (POPOFF *et al.*, 1988; ARTEAGA *et al.*, 2009).

Recentemente tem sido também relatado um aumento do número de casos críticos nos quais tratamentos radicais como colectomia foram utilizados para evitar a morte (MUTO *et al.*, 2005; LOO *et al.*, 2005). O surgimento dessa nova cepa tem coincidido com o uso aumentado de fluoroquinolonas (MUTO *et al.*, 2005). Nos anos 1990s, estudos mostravam um índice de mortalidade relativamente baixo, em torno de 2%, para a doença induzida pelo *C. difficile*. Entretanto, dados mais recentes apontam para um aumento de mais de três vezes neste índice, que hoje chega a 6,9% (LOO *et al.*, 2005). Na Inglaterra e em Gales houve 975 óbitos associados à infecção causada pela TcdA do *C. difficile* em 1999, 6480 em 2006, e 8324 em 2007, um aumento de 750% em sete anos (UK NATIONAL STATISTICS, 2007). Estudo de Dial *et al.*, 2005 que demonstra o surgimento de casos na comunidade sem está relacionado ao uso prévio de antibióticos. Sugere-se sobre esses casos que alimentos possam estar envolvidos na transmissão do *Clostridium difficile* de animais para humanos.

Apesar da escassez de informações sobre a incidência da doença no Brasil, trabalho realizado na cidade do Rio de Janeiro revelou que espécies de *C. difficile* foram detectadas em 6,7% de amostras de fezes de crianças hospitalizadas ou não (PINTO *et al.*, 2003), sugerindo que investigação para *C. difficile* deve ser considerada na diarreia pediátrica em pacientes hospitalizados ou não nos países em desenvolvimento. O estudo realizado por Ferreira *et al.*, (2003) mostrou que o *C. difficile* foi isolado em 5,5% das crianças internadas com diarreia aguda em São Paulo e que as crianças saudáveis não eram hospedeiras deste bacilo. Em estudo realizado por Balassiano *et al.*, (2009) durante o período de um ano, 28,5% dos pacientes internados em um hospital do Rio de Janeiro apresentaram DACD ativa, tiveram bactérias isoladas de 66,7% de suas amostras de fezes.

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

Tendo em vista alguns estudos anteriores desenvolvidos por: Brito *et al.* (2005) e Carneiro *et al.* (2006) e as características do metabolismo da glutamina, despertou-nos o interesse de estudar o papel da glutamina e do seu derivado mais estável a alanil-glutamina no restabelecimento das alterações morfológicas pela toxina A do *Clostridium difficile* usando técnicas avançadas de microscopia. Este projeto, portanto, dá continuidade a nossa pesquisa

na área citada e espera contribuir para o esclarecimento da patogênese e controle dessa condição de importância epidemiológica crescente mundialmente e em particular no nordeste do Brasil onde existe uma incidência elevada de doenças diarreicas.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Estudar as alterações morfológicas induzidas pela TcdA do *Clostridium difficile* e o efeito protetor da glutamina e alanil-glutamina através de técnicas avançadas de microscopia, proliferação celular e estresse oxidativo.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar as alterações morfológicas induzidas pela TcdA do *C.difficile*, incluindo as alterações do citoesqueleto em células epiteliais intestinais através da microscopia de força atômica, microscopia eletrônica de varredura, microscopia confocal e imunofluorescência.
- Investigar o efeito da glutamina e da alanil-glutamina nas alterações morfológicas induzidas pela TcdA do *C.difficile*.
- Estudar o efeito da TcdA do *C.difficile* e da glutamina e alanil-glutamina na expressão de proteína RhoA e na organização do citoesqueleto.
- Avaliar a proliferação celular mediante o tratamento com a TcdA do *C.difficile* e quando houver a associação da toxina com glutamina e alanil-glutamina.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Drogas e reagentes

Tripsina 0,05% na concentração de 10x, meio DMEM com glutamina, meio DMEM sem glutamina, soro fetal bovino (FBS), meio RPMI, penicilina-estreptomicina (100 U/100µg), piruvato de sódio (100 mM–100x) e solução antibiótica antimicótica foram adquiridas da Gibco BRL (Grand Island, NY) ou Invitrogen (Carlsbad, CA). Glutamina, Alanil-Glutamina, TcdA do *C. difficile* (c3977), WST-1 (4-[3-(4-iodophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1-3-benzene disulfonate) e insulina bovina foram obtidas da Sigma (St. Louis, MO). Os anticorpos utilizados foram: monoclonal RhoA feito em camundongo (SC-418), FITC- faloidina, DAPI, Rhodamine – faloidina e anticorpo secundário anti-camundongo FITC.

3.2 Cultura de células

Foram utilizadas células epiteliais intestinais de rato (IEC-6) e células epiteliais de adenocarcinoma colorretal humano (HTC-8) adquiridas de American Type Culture Collection (Rockville, MD), mantidas em estufa a 37°C e 5% CO₂ respectivamente. As células HCT-8 foram utilizadas nos experimentos realizados nos Estados Unidos. E as células IEC-6 foram utilizadas nos demais experimentos por conveniência e facilidade de manutenção.

O meio de cultura para a manutenção da IEC-6 é composto de DMEM com glutamina acrescido de FBS 5%, insulina bovina 0,1U/mL, piruvato de sódio com concentração final de 1mM e penicilina/estreptomicina 50µg/mL. As células foram cultivadas em frascos de 75cm², sendo o meio de cultura trocado 3x/ semana e/ou sempre que necessário.

O meio de cultura para a manutenção da HCT-8 é composto por RPMI com glutamina acrescido de FBS 10%, piruvato de sódio com concentração final de 1mM e

penicilina/estreptomicina 50µg/mL. As células também foram cultivadas em frascos de 75cm², sendo o meio de cultura trocado 2 a 3x/ semana e/ou sempre que necessário.

3.3 Tripsinização das células

Este processo foi utilizado para as duas linhagens celulares utilizadas nos experimentos. Para iniciar o processo de tripsinização, verifica-se inicialmente se as células estão confluentes com a utilização do Microscópio Invertido. Em seguida, o frasco é devolvido à incubadora até o momento do uso. É feito, então, o processo de limpeza no fluxo laminar, colocando-se no fluxo todo o material a ser utilizado com exceção das células, dos meios de cultura, tripsina e toxina e ligando-se a luz ultravioleta por 30 minutos. Após esse período coloca-se o restante do material no fluxo.

Adicionou-se 1mL de tripsina ao frasco com as células a fim de desprendê-las e levou-se de volta a estufa, por mais 5 minutos. Após esse tempo, observou-se o total deslocamento das células. As células já tripsinizadas foram adicionadas 3mL de meio com a finalidade de removê-las para um tubo Falcon de 15mL, que foi para centrifugação à 1500rpm por 5 minutos sob refrigeração a 4°C. No fluxo removeu-se cuidadosamente o sobrenadante do tubo Falcon e adicionou-se ao pellet 5mL de meio com glutamina, seguido pela homogeneização. Depois 100µL desta solução foi colocada em um eppendorf e 900µL de meio foi adicionado, fazendo uma diluição das células de 1:10 para ser contada na câmara de Neubauer.

A leitura foi realizada ao microscópio óptico na objetiva de 10x, sendo contados os quatro quadrantes e feito a média para obtenção do resultado. As células sobre as linhas inferiores e da direita ou superiores e da esquerda era excluídas para haver padronização. A concentração total de células na suspensão original era calculada da seguinte forma:

$$A = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ total de células contadas} \times 10^4 \times \text{fator de diluição (10)}}{\text{N}^{\circ} \text{ de quadrados contados}}$$

Sendo a seguinte fórmula utilizada para o plaqueamento das células:

$$A \times 10^5 \times V1 = C \times V2$$

A- concentração contada na câmara de Neubauer

V1- volume a ser retirado das células

C - concentração de células desejadas para o experimento

V2- volume total para preenchimento das placas

Após o preparo da nova solução, os poços foram plaqueados para o experimento. Foi verificada ao microscópio invertido a quantidade de células adicionadas aos poços e em seguida levados a incubadora de CO₂.

3.4 Microscopia de força atômica (AFM)

As células IEC-6 foram cultivadas na concentração de $6,25 \times 10^4$ células/orifício dentro dos orifícios de placas de 12 furos com meios de cultura DMEM com glutamina à temperatura de 37°C e na concentração de 5% de CO₂. Antes de ser acrescentado o meio de cultura contendo as células IEC-6 foi adicionado previamente aos poços da placa de cultura, lamínulas redondas de vidro com diâmetro de 13mm. Essas serviram como superfície para a fixação das células.

Vinte quatro horas após a semeadura das células nas placas, o meio de cultura foi trocado e as células foram incubadas de acordo com os grupos: Controle (DMEM sem glutamina); TcdA (DMEM sem glutamina e TcdA na concentração de 100ng/mL) por 1h. Em um segundo experimento, os seguintes grupos foram feitos: Controle; TcdA e para testar os micronutrientes: glutamina e alanil-glutamina, que em estudos anteriores mostraram proteger parcialmente os efeitos danosos da TcdA: TcdA+Ala-Gln (DMEM sem glutamina, TcdA (10ng/mL) e Ala-Gln na concentração de 10mM); TcdA+Gln (DMEM sem glutamina, TcdA (10ng/mL) e Gln na concentração de 10mM). A concentração 10 mM de Gln e da Ala-Gln foi baseada em resultados de um trabalho publicado por Brito *et al.*, 2005. O tempo em que as células permaneceram incubadas com ou sem a TcdA foi de 24h (JANK *et al.*, 2007; McDONALD *et al.*, 2005; RHOADS; WU, 2009). Após o período de incubação, o meio foi descartado, as lamínulas contendo as células foram coletadas e lavadas com PBS. Em seguida,

as células foram fixadas por meio de uma solução de formaldeído 4% por um período de 14 horas.

As imagens foram realizadas no ar e todas as imagens topográficas foram adquiridas usando modo tapping e cantilevers de silício cristalino (Veeco) com uma força constante de aproximadamente 40 N/m. As imagens foram capturadas com um número finito de pixels (512 x 512 scan size) (FUNG *et al.*, 2010). Para o cálculo aproximado do volume das células foi utilizado como ferramenta o software nanoscope 5.30 R3.SR3 (copyright 2005). Este mesmo software foi utilizado para determinação da altura e área celular. Os dados foram calculados de 50 células diferentes em cada situação. (JANDT, 1998; QUIRINO *et al.*, 2009).

3.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As células IEC-6 foram cultivadas na concentração de $6,25 \times 10^4$ células/poço, em placa de 12 poços com meios de cultura DMEM com glutamina à temperatura de 37°C e na concentração de 5% de CO₂. Antes de ser acrescentado o meio de cultura contendo as células IEC-6 foi adicionado previamente aos poços da placa de cultura, lamínulas redondas de vidro com diâmetro de 13mm. Essas serviram como superfície para a fixação das células.

Após 24h da semeadura das células nas placas, o meio de cultura foi trocado e as células foram incubadas de acordo com os grupos: Controle (DMEM sem glutamina); TcdA (DMEM sem glutamina e TcdA na concentração de 10ng/mL); TcdA+Ala-Gln (DMEM sem glutamina, TcdA na concentração de 10ng/mL e Ala-Gln na concentração de 10mM) e TcdA+Gln (DMEM sem glutamina, TcdA na concentração de 10ng/mL e Gln na concentração de 10mM). O tempo em que as células permaneceram incubadas com a TcdA e os micronutrientes foi de 24h (BRITO *et al.*, 2005; JANK *et al.*, 2007; McDONALD *et al.*, 2005; RHOADS; WU, 2009). Após o período de incubação, o meio foi descartado, as lamínulas contendo as células foram coletadas e lavadas com PBS. Em seguida, as células foram fixadas por meio de uma solução de formaldeído 4% por um período de 14 h.

Em seguida para que as imagens pudessem ser geradas pelo MEV foi necessário fixar as amostras em porta-amostra com fitas de carbono e recobrir as mesmas com uma camada de ouro de 15nm (sistema de revestimento BALTEC MED 020), processo conhecido

por metalização da amostra a fim de que houvesse a passagem de elétrons. Após este processo as amostras foram levadas para o MEV (TESCAN VEGA-XMU), onde as imagens foram confeccionadas.

3.6 Proliferação celular

A proliferação celular foi medida indiretamente usando o kit de proliferação celular, sal tetrazólio WST -1 adquirido da ROCHE (Mannheim, Germany) de acordo com as instruções do fabricante. As células HCT-8 foram cultivadas em placa contendo 96 poços em uma concentração de 4×10^3 células/mL em 100uL de meio padrão (meio com glutamina) na incubadora a 37°C em 5% de CO₂. Após 48h as células foram lavadas e incubadas com meio RPMI sem glutamina de acordo com os seguintes grupos: Controle (só o RPMI); TcdA (RPMI e TcdA na concentração de 10ng/mL); TcdA+Ala-Gln (RPMI, TcdA (10ng/mL) e Ala-Gln na concentração de 10mM); TcdA+Gln (RPMI, TcdA (10ng/mL) e Gln na concentração de 10mM); Ala-Gln (RPMI e Ala-Gln na concentração de 10mM); Gln (RPMI e Gln na concentração de 10mM). O tempo em que as células permaneceram incubadas com a TcdA e os micronutrientes: glutamina e alanil-glutamina foi de 24h ou 48h.

Após 24h ou 48h, as células foram incubadas a 37°C em CO₂ a 5% por 4h com 10μL do sal tetrazólio WST-1. A absorbância foi medida pelo ELISA com filtro de 450nm. O WST-1 é reduzido a formazan, que é um marcador solúvel para água, por células metabolicamente ativas sob ação de uma desidrogenase. A produção de formazan é proporcional ao número de células viáveis na cultura, portanto é uma medida indireta da proliferação celular, sendo observada 4h após a adição dos reagentes com o auxílio do ELISA (CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2006; MACIEL *et al.*, 2007).

3.7 Imunoblotting

As células IEC-6 foram cultivadas na concentração de 6×10^5 células/poço, em placa de 6 poços com meios de cultura DMEM com glutamina à temperatura de 37°C e na

concentração de 5% de CO₂. Após 48h da semeadura das células nas placas, o meio de cultura foi trocado e as células foram incubadas de acordo com os grupos: Controle (DMEM sem glutamina); TcdA (DMEM sem glutamina e TcdA na concentração de 10ng/mL); TcdA+Ala-Gln (DMEM sem glutamina, TcdA na concentração de 10ng/mL e Ala-Gln na concentração de 10mM); TcdA+Gln (DMEM sem glutamina, TcdA na concentração de 10ng/mL e Gln na concentração de 10mM); Ala-Gln (DMEM sem glutamina e Ala-Gln na concentração de 10mM); Gln (DMEM sem glutamina e Gln na concentração de 10mM). Para cada grupo foram utilizados 3 poços. O tempo em que as células permaneceram incubadas com a TcdA e os micronutrientes foi de 24h (BRITO *et al.*, 2005; JANK *et al.*, 2007; McDONALD *et al.*, 2005; RHOADS; WU, 2009). Depois o meio de cultura foi descartado e realizou-se 3 lavagens com PBS concentrado 1x sob agitação.

Colocou-se 100 µl do tampão de amostras concentrado 2x (Tris-HCl, SDS, Glicerol, 2-mercaptoetanol e azul de bromofenol) em cada poço da placa de cultura e com um raspador de células se raspou o fundo procurando atingir toda a sua extensão, então as células foram recolhidas misturadas com o tampão para eppendorfs devidamente identificados. E em seguida, as amostras foram levadas para aquecimento em banho-maria por 5min.

E as amostras foram aplicadas no gel de poliacrilamida a 12%, já na cuba de eletroforese, que estava ajustada com a corrente inicial de 10mA e a voltagem em torno de 110V. Após o início da corrida a corrente foi aumentada para 25 a 30 mA. Após a eletroforese gel foi posto em um pote contendo tampão de transferência.

A membrana de PVDF foi cortada do mesmo tamanho do gel em seguida, sendo colocada em um recipiente contendo metanol por 10 minutos em agitação para ativá-la. Em seguida lavou-se a membrana com água destilada por 5 minutos e, por último, lavou-se novamente a membrana com o tampão de transferência. Então se montou o sanduíche, que foi colocado na cuba de transferência à 50V overnight.

Foi feita a coloração na solução de vermelho de ponceau por 10 segundos e em seguida a membrana foi lavada em água destilada. Incubou-se a membrana com anticorpo primário anti-Rho A na diluição de 1:1000 overnight. Na manhã seguinte, foram feitas 3 lavagens com TBS-T por 10 minutos e depois a membrana foi incubada com o anticorpo secundário por 1h. Por fim, a membrana foi ativada com o kit de revelação de Amershan e revelada em câmara escura (POSSIDONIO *et al.*, 2011).

3.8 Dosagem de Malonildialdeído (MDA)

As células IEC-6 foram cultivadas na concentração de 5×10^4 células/poços em placas de 12 poços com meios de cultura DMEM com glutamina à temperatura de 37°C e na concentração de 5% de CO_2 . Após 48h da semeadura das células nas placas, o meio de cultura foi trocado e as células foram incubadas de acordo com os grupos: Controle (DMEM sem glutamina); TcdA (DMEM sem glutamina e TcdA na concentração de 10ng/mL); TcdA+Ala-Gln (DMEM sem glutamina, TcdA na concentração de 10ng/mL e Ala-Gln na concentração de 10mM); TcdA+Gln (DMEM sem glutamina, TcdA na concentração de 10ng/mL e Gln na concentração de 10mM); Ala-Gln (DMEM sem glutamina e Ala-Gln na concentração de 10mM); Gln (DMEM sem glutamina e Gln na concentração de 10mM) (BRITO *et al.*, 2005; JANK *et al.*, 2007; McDONALD *et al.*, 2005; RHOADS; WU, 2009). O tempo em que as células permaneceram incubadas com a TcdA e os micronutrientes foi de 24h. Para cada grupo foram utilizados 3 poços. Depois o meio de cultura foi descartado e realizou-se, então, uma raspagem dos poços com rodos apropriados e as amostras foram coletadas com 200 μL de meio.

Homogenato a 10% foi feito com 150 μL do concentrado de células de cada amostra e o foi completado para 250 μL com KCl a 15M, colocado em um tubo de ensaio. Foi adicionado 1,5mL do H_3PO_4 à 1% e 500 μL de solução do ácido tiobarbitúrico à 0,6%. Os tubos com essa mistura foram colocados em banho-maria a 100°C por 45 minutos e em seguida resfriados em água corrente. A essa mistura foi adicionado 2mL de N-butanol e em seguida agitada no vortex por 1min cada tubo. Depois esses tubos foram centrifugados a 1200rpm durante 15 min e o sobrenadante, que corresponde à fase butanólica, foi retirado e levado para fazer a leitura no espectrofotômetro nos seguintes comprimentos de onda 520nm e 535nm. A dosagem de MDA é calculada através da diferença entre as duas medidas (LOWRY *et al.*, 1951).

3.9 Dosagem de Glutathione (GSH)

As células IEC-6 foram cultivadas na concentração de 5×10^4 células/poços em placas de 12 poços com meios de cultura DMEM com glutamina à temperatura de 37°C e na

concentração de 5% de CO₂. Após 48h da semeadura das células nas placas, o meio de cultura foi trocado e as células foram incubadas de acordo com os grupos: Controle (DMEM sem glutamina); TcdA (DMEM sem glutamina e TcdA na concentração de 10ng/mL); TcdA+Ala-Gln (DMEM sem glutamina, TcdA na concentração de 10ng/mL e Ala-Gln na concentração de 10mM); TcdA+Gln (DMEM sem glutamina, TcdA na concentração de 10ng/mL e Gln na concentração de 10mM); Ala-Gln (DMEM sem glutamina e Ala-Gln na concentração de 10mM); Gln (DMEM sem glutamina e Gln na concentração de 10mM) (BRITO *et al.*, 2005; JANK *et al.*, 2007; McDONALD *et al.*, 2005; RHOADS; WU, 2009). O tempo em que as células permaneceram incubadas com a TcdA e os micronutrientes foi de 24h. Para cada grupo foram utilizados 3 poços. Depois o meio de cultura foi descartado então se realizou uma raspagem dos poços com rodos apropriados e as amostras foram coletadas com 400µL de meio.

O homogenato foi composto por 200µL do concentrado de células e 200µL de EDTA 0,02M. A esse homogenato foi adicionado 320µL de água destilada e 80µL do ácido tricloroacético. Essa mistura foi centrifugada à 3000rpm por 15 min., na temperatura de 4°C. Foram retirados 400µL do sobrenadante, no qual foi acrescentado 800µL de tampão TRIS 0,4M e 20µL de DTNB 0,01M. E em seguida as amostras foram lidas no espectrofotômetro no comprimento de onda de 412nm (SEDLAK; LINDSAY, 1968)

3.10 Microscopia confocal

Quatro câmaras de slides foram semeadas com células HCT-8 na concentração de 4×10^4 células/poço em meio RPMI padrão. Após 48h os poços foram incubados de acordo com os grupos: Controle (DMEM sem glutamina); TcdA (DMEM sem glutamina e TcdA na concentração de 10ng/mL); TcdA+Ala-Gln (DMEM sem glutamina, TcdA na concentração de 10ng/mL e Ala-Gln na concentração de 10mM) e TcdA+Gln (DMEM sem glutamina, na concentração de TcdA 10ng/mL e Gln na concentração de 10mM) (BRITO *et al.*, 2005; JANK *et al.*, 2007; McDONALD *et al.*, 2005; RHOADS; WU, 2009). Após 24h de exposição, HCT-8 monocamadas de células foram cuidadosamente lavados duas vezes em PBS, fixadas por 20 min em paraformaldeído 4,0% e novamente lavados em PBS, então foram permeabilizados com 0,1% Triton X-100 à temperatura ambiente por 10 minutos e em

seguida lavado novamente em PBS. Posteriormente, os poços foram incubados com faloidina – FITC na concentração de 5µg/mL por 30min em câmara escura, lavados em PBS e incubadas com DAPI, 5 mg / ml por 5 min. Monocamadas foram então lavadas novamente em PBS e pós-fixadas com paraformaldeído 4% e montadas. Microscopia de fluorescência foi realizada utilizando um microscópio confocal invertido Zeiss LSM 510 UV com objetiva 40x, disponível na Universidade da Virginia (HENEWEER *et al*, 2005;. SCHWAN *et al*, 2009).

3.11 Imunofluorescência para F-actina e RhoA

As células IEC-6 foram cultivadas na concentração de 6×10^5 células/poços em placas de 6 poços com meios de cultura DMEM com glutamina à temperatura de 37°C e na concentração de 5% de CO₂. Placas de aclar que serviram como superfície para a fixação das células, haviam sido previamente colocados na placa de cultura.

Quarenta e oito horas após a semeadura das células nas placas, o meio de cultura foi trocado e as células foram incubadas de acordo com os grupos: Controle (DMEM sem glutamina); TcdA (DMEM sem glutamina e TcdA na concentração de 10ng/mL); TcdA+Ala-Gln (DMEM sem glutamina, TcdA na concentração de 10ng/mL e Ala-Gln na concentração de 10mM); TcdA+Gln (DMEM sem glutamina, TcdA na concentração de 10ng/mL e Gln na concentração de 10mM); Ala-Gln (DMEM sem glutamina e Ala-Gln na concentração de 10mM); Gln (DMEM sem glutamina e Gln na concentração de 10mM) (BRITO *et al.*, 2005; JANK *et al.*, 2007; McDONALD *et al.*, 2005; RHOADS; WU, 2009). O tempo em que as células permaneceram incubadas com a TcdA e os micronutrientes foi de 24h.

Após esse período as células foram lavadas com PBS na concentração de 1x por 5 minutos, sob leve agitação (com o agitador na velocidade 40), em seguida o mesmo foi retirado e se realizou a fixação com 2 mL de PFA a 4% em cada placa de cultura por 10 minutos, sob leve agitação (com o agitador na velocidade 40). Retirou-se o PFA e foi iniciado o processo de permeabilização utilizando PBS/Triton em três lavagens de 10 minutos cada, também sob agitação. Em seguida se encubou o aclar com o anticorpo primário RhoA na concentração 1:50 por 1h em câmara escura na estufa a 37°C.

Após esse período retirou-se o aclar de cada grupo, que foram lavados três vezes com PBS/Triton durante 10 minutos cada, com leve agitação e em seguidas foram novamente

incubadas em câmara úmida na estufa a 37°C com o anticorpo secundário anti-camundongo marcado com FITC por 1 h na concentração de 1:200. Depois se lavou por 3x com PBS/Triton durante 10 minutos cada com leve agitação, em seguida se incubou as células com faloidina marcada com rodamina na diluição de 1:50, durante 30 minutos em câmara escura na estufa a 37°C.

Então se lavou as células com PBS/Triton por 3x com duração de 10 minutos cada, sob agitação. Em seguida lavaram-se novamente as células com NaCl 0,9% por 5 minutos sob agitação, por fim se corou com DAPI (1µL/2mL de NaCl 0,9%) na diluição de 1:1000 e lavou-se com NaCl 0,9% por 5 minutos. Após esse processo as lamínulas foram montadas com solução de montagem (glicerol, N-propil galato- 5%, DABCO 0,25% e PPD 0,0025% pH 7,5). Os preparados foram observados no microscópio ótico de fluorescência Axiovert 100 (Carl Zeiss, Germany), usando filtros seletivos para cada fluorocromos, as imagens foram capturadas com a câmera integrada C2400i (Hamamatsu, Photonics, Shizuoka, Japan) e processador de imagem Argus 20 (Hamamatsu) (POSSIDONIO *et al.*, 2011).

3.12 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. As médias dos vários procedimentos experimentais foram comparadas utilizando a análise de variância (ANOVA), e a significância entre os grupos estabelecida pelo teste Bonferroni. O número (N) de poços por grupo experimental foi no mínimo 3. A significância mínima aceita foi de $P < 0,05$. O programa utilizado para as análises estatísticas foi Graph Pad Prism 4.

4 RESULTADOS

4.1 Análise do efeito da TcdA do *C. difficile* em células epiteliais intestinais de rato (IEC-6) através da AFM.

As células IEC-6 quando cultivadas em condições normais tiveram a sua morfologia preservada apresentando-se com o citoesqueleto organizado, núcleo e nucléolos bem definidos como pode ser visto nas figuras 9A e 9B com altura máxima de 2000nm. As células tratadas com TcdA do *C.difficile* por 1h mostraram-se com uma morfologia consideravelmente alterada (figura 9C e 9D) apresentando encolhimento e compactação de material citoplasmático em torno do núcleo e embaçamento da membrana nuclear. São observadas também múltiplas extensões filamentosas vestigiais em torno da célula. Na presença de TcdA, a altura máxima de uma célula representativa teve um aumento para 4000nm (Figura 9C e 9D), comparado a 2000nm no grupo controle (Figura 9A e 9B).

Ao ser visualizado o núcleo das células IEC-6 em maior aumento pode ser percebido com nitidez um bem definido envelope nuclear e nucléolos proeminentes (figura 10A e 10B) já a célula tratada com TcdA se observa interrupção completa do envelope nuclear, além da condensação irregular da cromatina e perda do aparelho nucleolar, portanto a TcdA causou uma total desorganização da estrutura nuclear (Figura 10C e 10D).

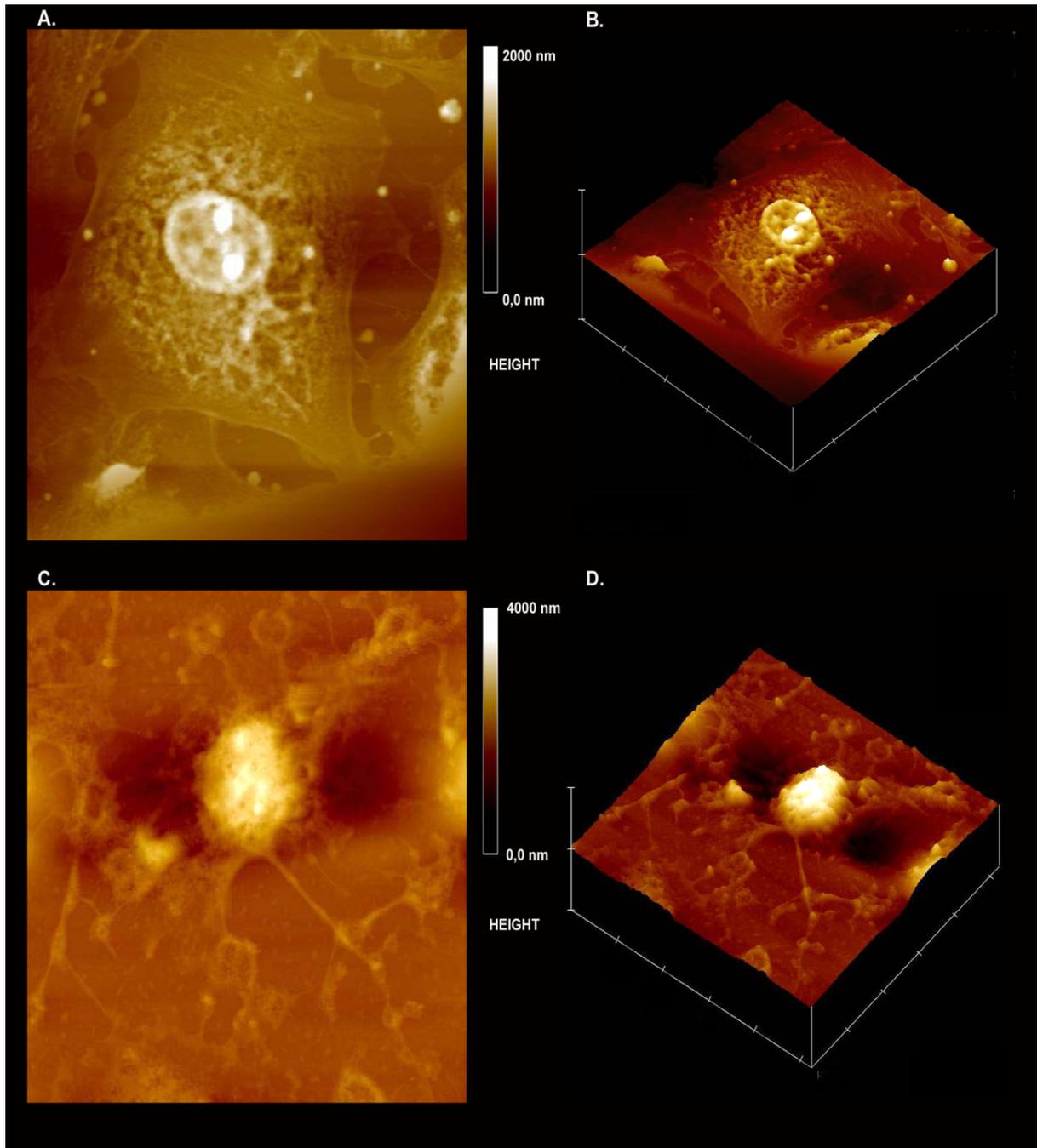


Figura 9: Análise das alterações morfológicas causadas pela TcdA do *C.difficile* em células epiteliais de rato (IEC-6). As células IEC-6 foram tratadas com TcdA (100ng/mL) por 1h. As imagens foram confeccionadas com o AFM no modo tapping. A. Célula controle, esta imagem tem escala de altura medida através de barra de cores: 2000nm. C. Célula tratada com TcdA, esta imagem tem escala de altura medida através de barra de cores: 4000nm. As imagens B e D são as figuras A e C na vista 3D (scan size 50 x 50 μm^2).

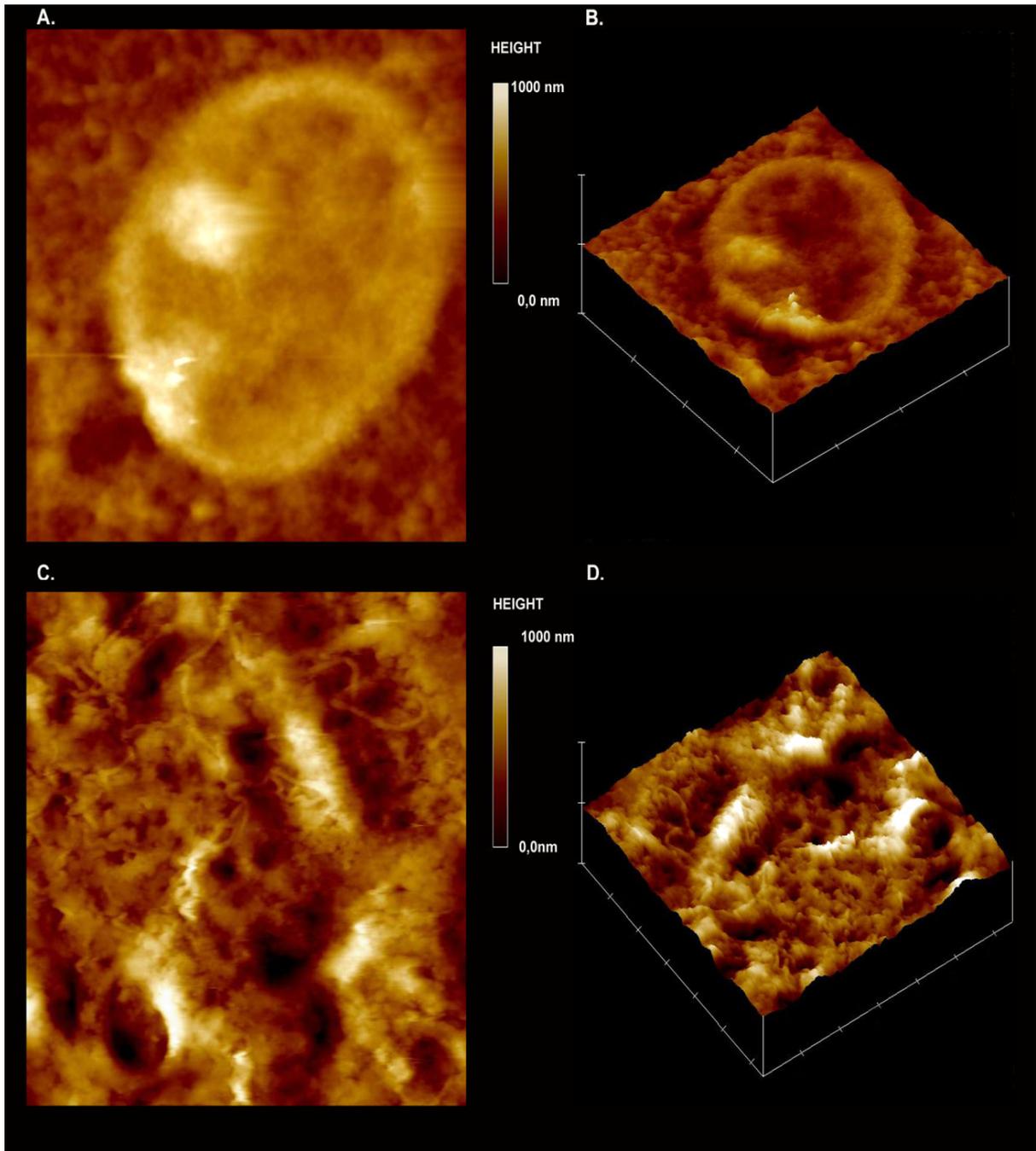


Figura 10: Análise das alterações morfológicas causadas pela TcdA do *C.difficile* ao nível de núcleo celular. As células IEC-6 foram tratadas com TcdA (100ng/mL) por 1h. As imagens foram confeccionadas com o AFM no modo tapping, $15 \times 15 \mu\text{m}^2$ e tem escala de altura medida através de barra de cores: 1000nm. A. Núcleo da célula controle. C. Núcleo da célula tratada com TcdA. As imagens B e D são as figuras A e C na vista 3D.

4.2 Análise do efeito da TcdA do *C. difficile* associada ou não à glutamina ou alanil-glutamina em células epiteliais intestinais de rato (IEC-6) através da AFM.

Como pode ser observado nas imagens anteriores a TcdA causa danos severos à célula. Como a glutamina é principal substrato das células epiteliais intestinais (CRUZAT; PETRY; TIRAPEGUI, 2009; FRANCISCO *et al.*, 2002; HISCOCK; PEDERSEN, 2002) e pelo fato do nosso grupo de pesquisa (BRITO *et al.*, 2005; CARNEIRO *et al.*, 2006; NASCIMENTO *et al.*, 2005) já terem mostrado alguns efeitos benéficos desse nutriente a nível tecidual na enterite induzida pela TcdA, a partir deste momento mostraremos o que ocorre quando utilizamos esse micronutriente e seu derivado estável, alanil-glutamina, a nível celular.

Em uma análise em menor aumento se observa na figura 11, que as células tratadas com TcdA e glutamina (figura 11D) ou TcdA e alanil-glutamina (figura 11C) apresentam morfologia semelhante às células normais (figura 11A) enquanto as células tratadas somente com a TcdA mostram uma retração do citoplasma (figura 11B), sendo este fato reafirmado pelas medidas das dimensões celulares. Estas revelaram que IEC-6 tratadas com TcdA tem um aumento de 58,9% na altura da célula em relação ao controle (figura 12), o que pode indicar deposição de material citoplasmático na região perinuclear. No entanto, quando se analisou a área e volume celular, foi detectado que havia uma diminuição em 66,2% e 79% no grupo TcdA, respectivamente, comparado ao grupo controle (figuras 13 e 14) ($P < 0,05$).

As medidas celulares demonstraram que a suplementação com 10mM de Gln nas células também incubadas com TcdA causou uma redução de 46,3% na altura da célula em relação ao grupo tratado com TcdA e um aumento de 67,6% e 46,3% na área e no volume das células, respectivamente, quando comparado ao grupo infectado com TcdA ($p < 0,05$; figuras 12, 13 e 14). Já o grupo tratado com TcdA e 10mM de Ala-Gln ao ser comparado ao grupo tratado somente com TcdA aumentou significativamente a área e o volume celular de 65,4% e 92,9%, respectivamente, e diminuição da altura da célula de 16,9% ($p < 0,05$) e sem diferença estatística ao ser comparada ao grupo controle. Comparando com a célula epitelial intestinal normal as células incubadas com TcdA na presença de suplementação de Gln e Ala-Gln, respectivamente mostraram em relação à altura celular o aumento foi de 10,3 % e 49,9%,

sendo apenas último significativo e uma redução significativa da área 31,1 % e 31,4% e do volume 50,6% e 34,8%. ($p < 0,05$; figuras 12, 13 e 14).

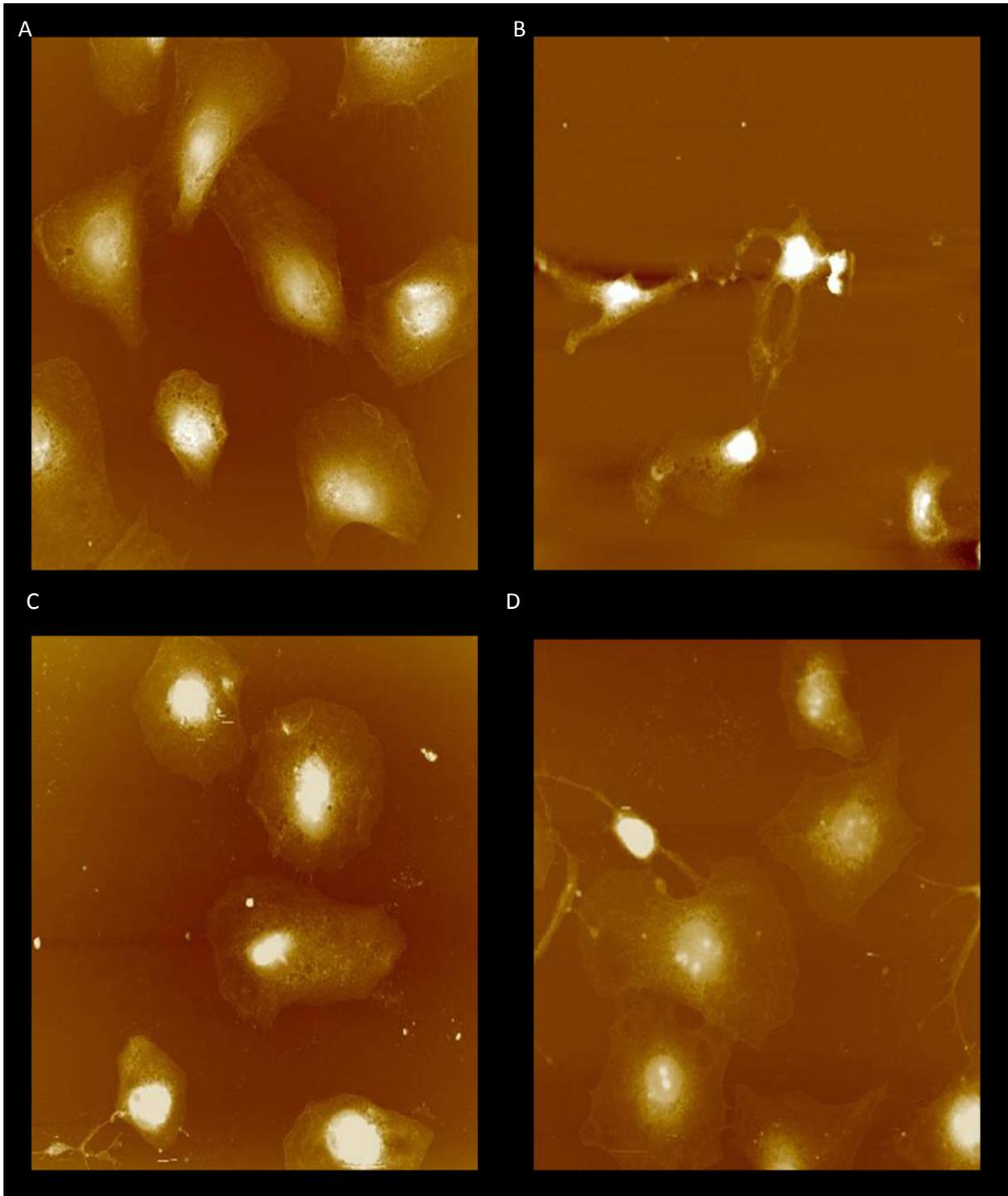


Figura 11: Análise macroscópica do efeito da glutamina e da alanil-glutamina na lesão induzida pela TcdA do *C.difficile*. As células IEC-6 foram divididas em quatro grupos: Controle; TcdA- células tratadas com TcdA (10ng/mL) por 24h; TcdA+ Gln- células tratadas com TcdA (10ng/mL) e glutamina (10mM) por 24h e TcdA + Ala-Gln – células tratadas com TcdA (10ng/mL) e alanil-glutamina (10mM) por 24h. As imagens foram confeccionadas através do AFM, no modo tapping e com área de $150 \times 150 \mu\text{m}^2$. A. Controle; B. TcdA; C. TcdA + Ala-Gln e D. TcdA + Gln.

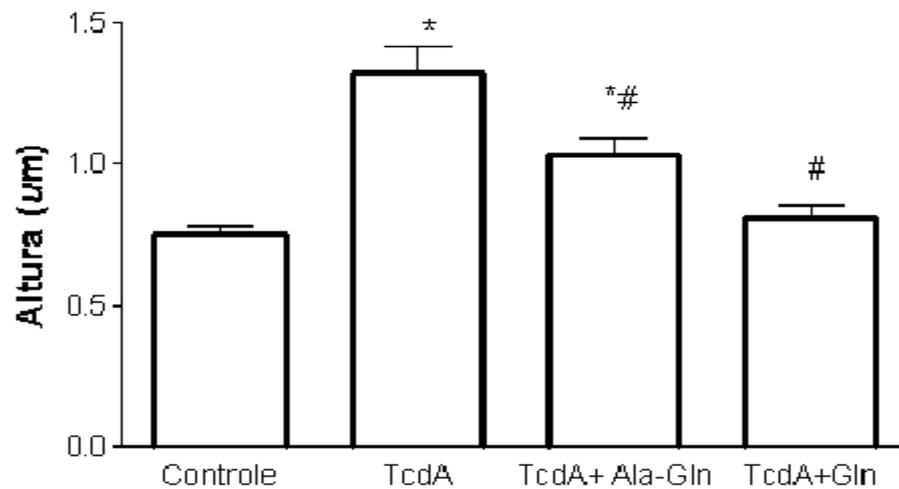


Figura 12: Efeito da TcdA do *C. difficile* sozinha ou associada à glutamina ou alanil-glutamina sobre a altura celular. As células IEC-6 foram divididas em quatro grupos: Controle; TcdA- células tratadas com TcdA (10ng/mL) por 24h; TcdA+ Gln- células tratadas com TcdA (10ng/mL) e glutamina (10mM) por 24 h e TcdA + Ala-Gln – células tratadas com TcdA (10ng/mL) e alanil-glutamina (10mM) por 24h. A altura foi calculada através do software nanoscope 5.30R3. SR3. * P<0,05 comparada com controle. # P<0,05 comparada com TcdA.

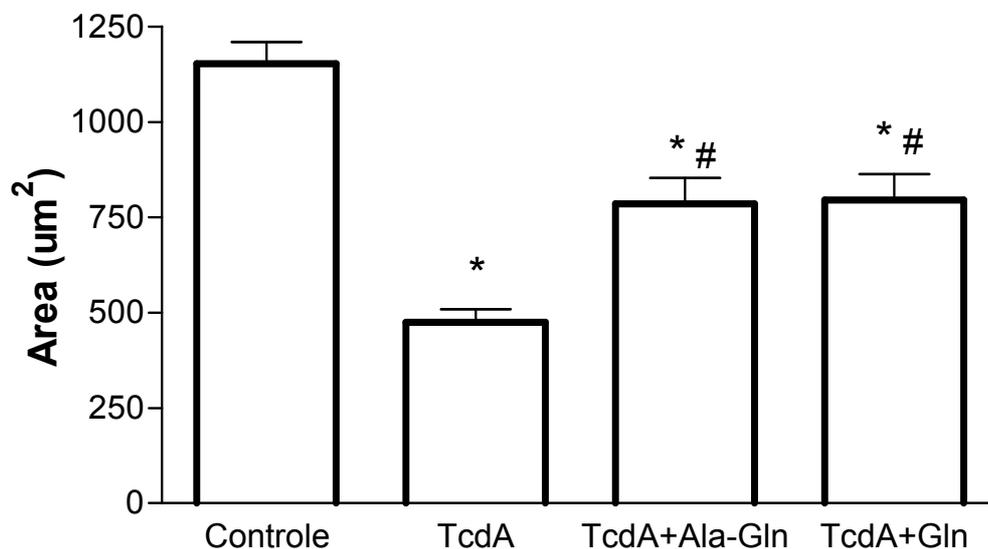


Figura 13: Efeito da TcdA do *C. difficile* sozinha ou associada à glutamina ou alanil-glutamina sobre a área celular. As células IEC-6 foram divididas em quatro grupos: Controle; TcdA- células tratadas com TcdA (10ng/mL) por 24h; TcdA+ Gln- células tratadas com TcdA (10ng/mL) e glutamina (10mM) por 24h e TcdA + Ala-Gln – células tratadas com TcdA (10ng/mL) e alanil-glutamina (10mM) por 24h. A área foi calculada através do software nanoscope 5.30R3. SR3. * P<0,05 comparada com controle. # P<0,05 comparada com TcdA.

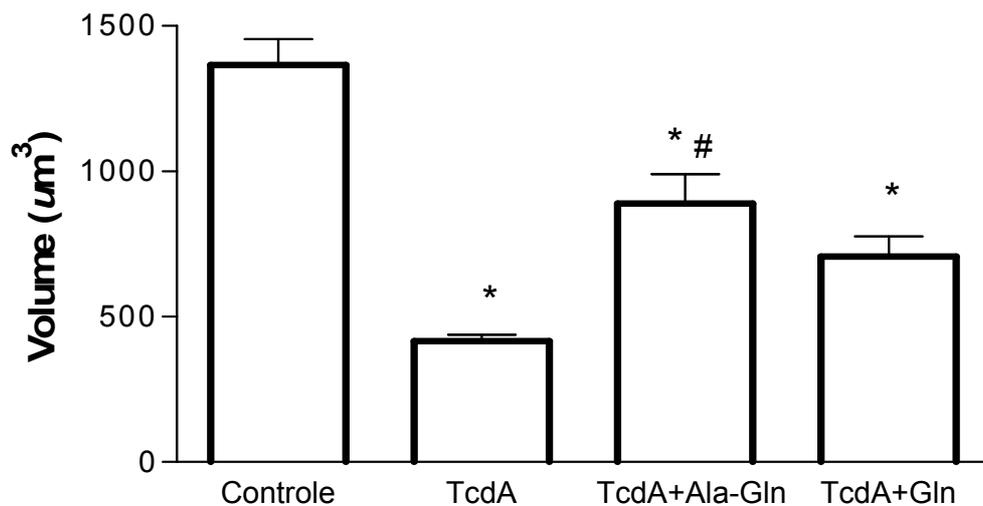


Figura 14: Efeito da TcdA do *C. difficile* sozinha ou associada à glutamina ou alanil-glutamina sobre volume celular. As células IEC-6 foram divididas em quatro grupos: Controle; TcdA- células tratadas com TcdA (10ng/mL) por 24h; TcdA+ Gln- células tratadas com TcdA (10ng/mL) e glutamina (10mM) por 24h e TcdA + Ala-Gln – células tratadas com TcdA (10ng/mL) e alanil-glutamina (10mM) por 24h. O volume foi calculado através do software nanoscope 5.30R3. SR3. * P<0,05 comparada com controle. # P<0,05 comparada com TcdA.

4.3 Efeito da Gln e da Ala-Gln em células epiteliais intestinais de ratos (IEC-6) incubadas com TcdA do *C. difficile* através da MEV.

Em corroboração com dados encontrados através da microscopia de força atômica, a microscopia eletrônica de varredura (figura 15) também demonstrou a retração citoplasmática das células IEC-6 na presença da TcdA do *C. difficile*. A figura 15B pode ser observada de forma detalhada finas extensões do citoplasma, como se fossem uma rede de ramificações, ou projeções em torno do corpo picnótico em comparação com a aparência estendida, uniforme e circular das células saudáveis sem tratamento com TcdA (figura 15A). Enquanto as células tratadas com Ala-Gln e TcdA (figura 15D) foi observado uma morfologia intermediária, sendo que o formato da célula está mais alongado e uniforme, porém, ainda apresenta de forma leve algumas estreitas extensões citoplasmáticas. Já as células suplementadas com Gln e TcdA (figura 15C) apresentam características morfológicas semelhantes à forma de “panqueca”, sendo similar a forma das células controle, principalmente em relação às medidas de altura celular (figura 12) além de se tornar

praticamente imperceptível as ramificações citoplasmáticas características das lesões causadas pela TcdA.

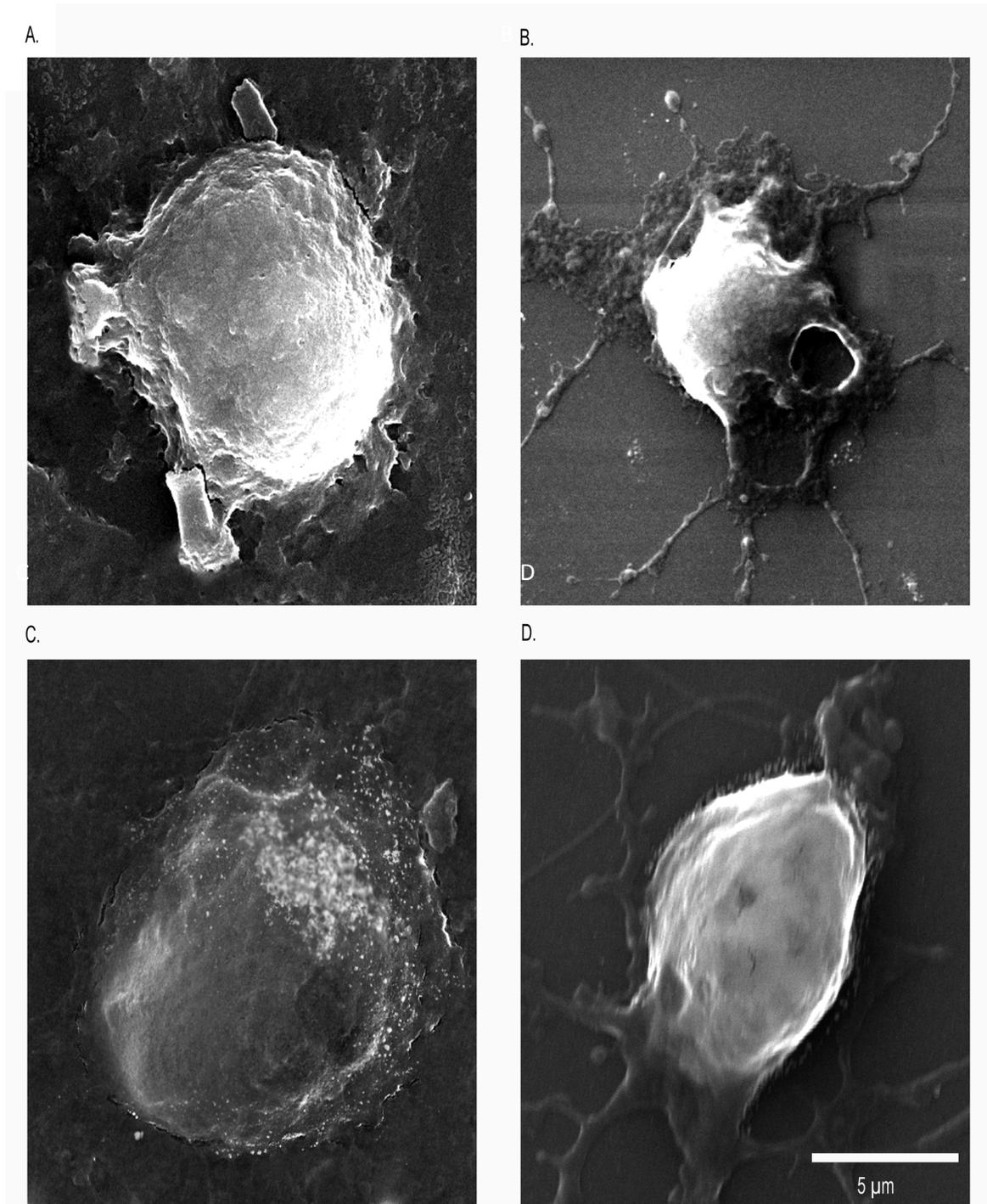


Figura 15: Análise do efeito da glutamina e da alanil-glutamina na alteração morfológica induzida pela TcdA do *C.difficile* em células epiteliais intestinais através do MEV. As células IEC-6 foram divididas em quatro grupos: A. Controle; B. TcdA (células tratadas com TcdA na concentração de 10ng/mL); C. TcdA+ Gln (células tratadas com TcdA na concentração de 10ng/mL e glutamina na concentração de 10mM) e D. TcdA + Ala-Gln (células tratadas com TcdA na concentração de 10ng/mL e alanil-glutamina na concentração de 10mM). Todos os tratamentos foram realizados por 24h. As imagens foram confeccionadas através do MEV, com magnificação de 9,45x e barra de escala de 5 µm.

4.4 Efeito da TcdA do *C. difficile*, da Gln e da Ala-Gln na proliferação celular.

Nesse experimento a reação que converte o sal tetrazólico WST-1 em formazan mediu diretamente a viabilidade celular, portanto uma medida indireta da proliferação celular. Ao tratar as células com TcdA na concentração de 10ng/mL por 24h foi observado que houve uma possível redução da proliferação celular em 6,8% ($p = 0,06$). Quando se faz o tratamento mais prolongado por 48h observa-se um maior efeito da TcdA e por consequência uma redução significativa de 8,4% ($p = 0,01$, comparado ao grupo controle) (figura 16). A Gln na presença de TcdA mostra uma tendência ao aumento da proliferação celular em 24h, aumento de 9,3% ($p = 0,07$), porém o tratamento foi mais efetivo em 48h, aumento de 12,7% em relação ao grupo TcdA ($p < 0,05$) enquanto no grupo TcdA+Ala-Gln o aumento da viabilidade celular foi significativo nos dois períodos de incubação às 24h e 48h, aumento de 14,4% e 13,2%, respectivamente, quando comparado ao grupo TcdA ($p < 0,05$, figura 16).

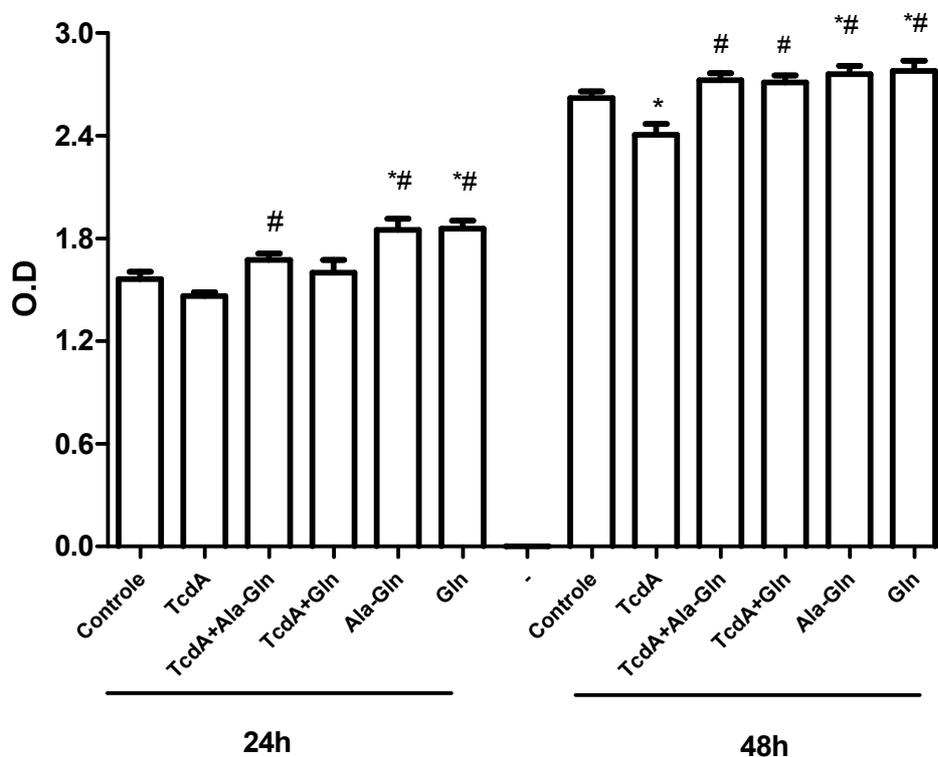


Figura 16: Efeito da TcdA do *C. difficile*, da glutamina e da alanil-glutamina na proliferação celular. As células HCT-8 foram divididas em seis grupos: Controle; TcdA- células tratadas com TcdA (10ng/mL); TcdA+Gln- células tratadas com TcdA (10ng/mL) e glutamina (10mM); TcdA + Ala-Gln – células tratadas com TcdA (10ng/mL) e alanil-glutamina (10mM); Gln – células tratadas com glutamina (10 mM) e Ala-Gln – células tratadas com alanil-glutamina (10 mM). Todos os tratamentos foram realizados por 24h e 48h. A absorbância foi

medida usando uma microplaca de ELISA a 450nm (referência 420-480nm) * P<0,05 comparada com controle.
P<0,05 comparada com TcdA.

Em relação ao experimento de proliferação celular, resolvermos analisar o comportamento da glutamina e do seu derivado estável, a alanil-glutamina, sem a injúria causada pela TcdA. A suplementação das células epiteliais com Gln e Ala-Gln mostraram um crescimento significativo da proliferação nos dois períodos de 24 e 48h, sendo respectivamente um aumento de 18,9% e 18,3% em 24h e de 6,0% e 5,3% em 48h em relação ao controle (p<0,05) (figura 16). Ao analisarmos os resultados de forma comparativa podemos concluir que em situações normais o pico da proliferação celular mediante a suplementação com Gln e Ala-Gln ocorre em 24h, já quando as células são incubadas com a TcdA e suplementadas a recuperação da proliferação ocorre por volta das 48h.

4.5 Efeito da TcdA do *C. difficile*, da Gln e da Ala-Gln sobre a F-actina analisado da perspectiva da microscopia confocal.

Conforme demonstrado na Figura 17, a incubação das células HCT-8 com TcdA por 24h causa uma mudança na distribuição do citoesqueleto de F-actina da monocamada de células e mostram também a diminuição da densidade de filamentos de actina. A monocamada de células incubadas em meio sem glutamina apresentou uma distribuição mais homogênea de actina e com feixes ligados à membrana plasmática. A outra coloração utilizada, o DAPI mostrou que a TcdA causou algumas picnose nucleares. Ao se comparar as redes de actina da monocamada normal de HCT-8 e da monocamada de HCT-8 tratadas com TcdA é visto que há diminuição da coloração que marca a actina, existindo ainda a presença de lacunas com ausência de fibras de actina, sugerindo colapso do citoesqueleto celular.

Como mostrado nos dados anteriores à suplementação com Gln e Ala-Gln revertem parcialmente às alterações descritas em células tratadas somente com TcdA, podendo ser observada uma preservação do citoesqueleto de actina, além de uma rede intracelular de actina mais organizada. Além disso, em ambas as situações TcdA+Gln e TcdA+Ala-Gln mostram células em mitose que estão em concordância com os dados da proliferação celular.

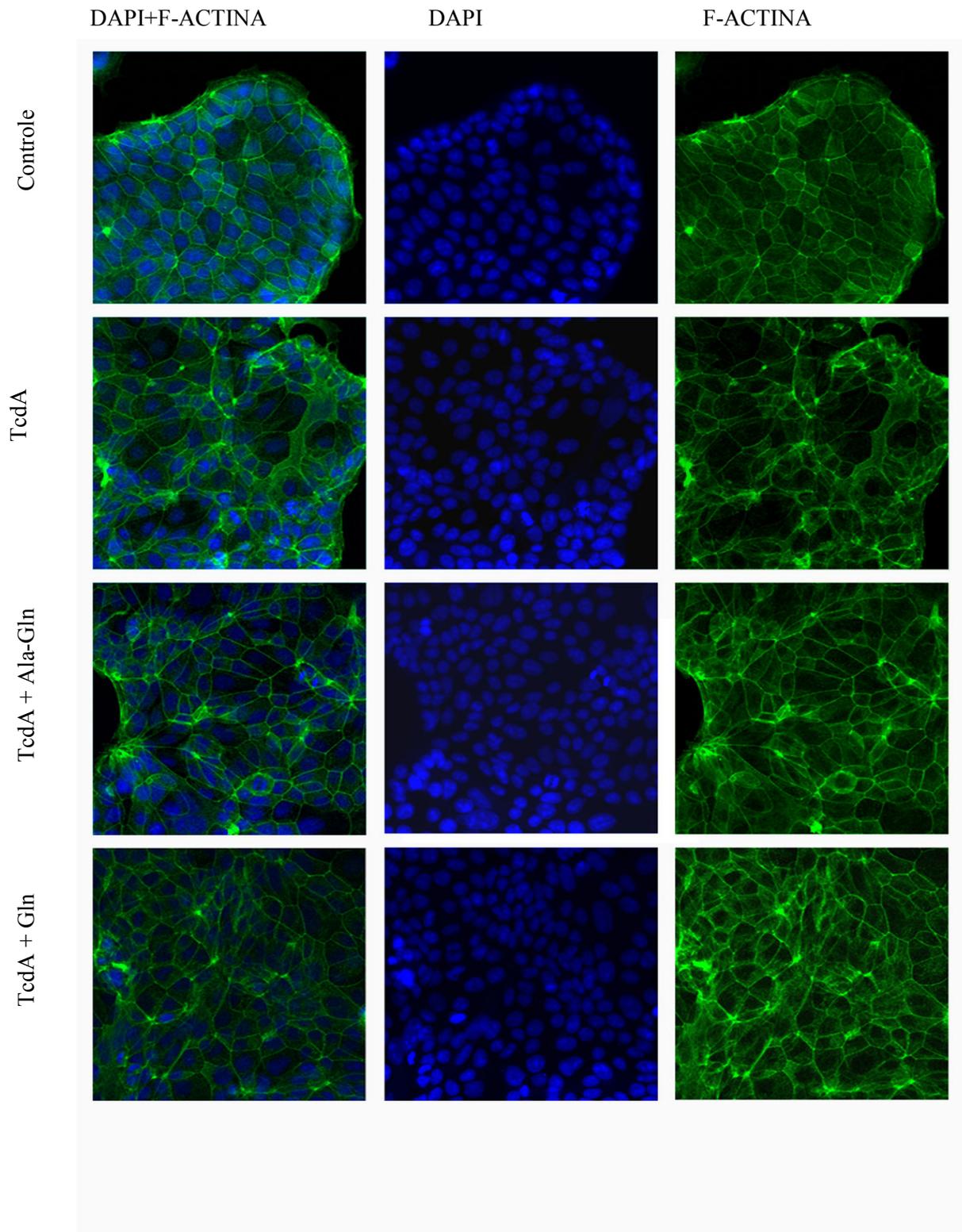


Figura 17: Efeito da TcdA do *C. difficile* na distribuição das fibras de F-actina através da microscopia confocal. As células HCT-8 foram divididas em quatro grupos: Controle; TcdA- células tratadas com TcdA (10ng/mL); TcdA+ Gln- células tratadas com TcdA (10ng/mL) e glutamina (10mM) e TcdA + Ala-Gln – células tratadas com TcdA (10ng/mL) e alanil-glutamina (10mM). Todos os tratamentos foram realizados por 24h. As células foram incubadas com FITC- faloidina e DAPI.

4.6 Efeito da TcdA do *C. difficile* e da Gln e da Ala-Gln analisado sobre a perspectiva do estresse oxidativo.

A dosagem de malonildialdeído (MDA) foi utilizada para avaliar o processo de lipoperoxidação da membrana plasmática, sendo percebido que essa peroxidação está significativamente aumentada apenas nas células que foram incubadas com TcdA sem nenhum tipo de suplementação. Já nos grupos tratados com TcdA e suplementados com Gln e Ala-Gln foi observado concentrações intermediárias entre o grupo controle e o grupo TcdA, mas sem diferenças significativas, conforme indica a figura 18.

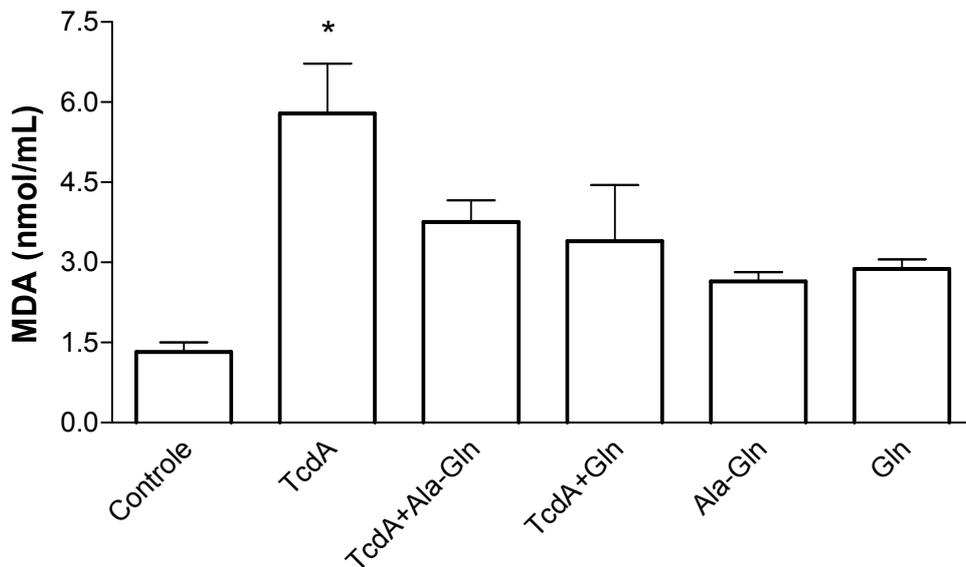


Figura 18: Efeito da TcdA do *C. difficile*, da glutamina e da alanil-glutamina no processo de lipoperoxidação lipídica. As células IEC-6 foram divididas em seis grupos: Controle; TcdA- células tratadas com TcdA (10ng/mL) por 24h; TcdA+ Gln- células tratadas com TcdA (10ng/mL) e glutamina (10 mM) por 24h; TcdA + Ala-Gln – células tratadas com TcdA (10ng/mL) e alanil-glutamina (10mM) por 24h; Gln – células tratadas com glutamina (10 mM) por 24h e Ala-Gln – células tratadas com alanil-glutamina (10 mM) por 24h. A avaliação do processo lipoperoxidação foi realizada através da dosagem de MDA. * P<0,05 comparada com controle.

A dosagem de glutatona (GSH) mostrada na figura 19, demonstrou que as células tratadas com TcdA apresentam níveis reduzidos de GSH, enquanto os grupos TcdA+Gln e TcdA+Ala-Gln indicam um aumento desses níveis, tendo um crescimento significativo em relação ao grupo TcdA porém ainda se encontram significativamente abaixo das células epiteliais não lesionadas. Por último, ao serem comparadas as células suplementadas apenas

com glutamina e alanil-glutamina com o grupo controle não foi vista diferença significativa entre os níveis de glutatona, portanto a TcdA induz as células ao dano oxidativo, revertido pela administração de Gln e Ala-Gln.

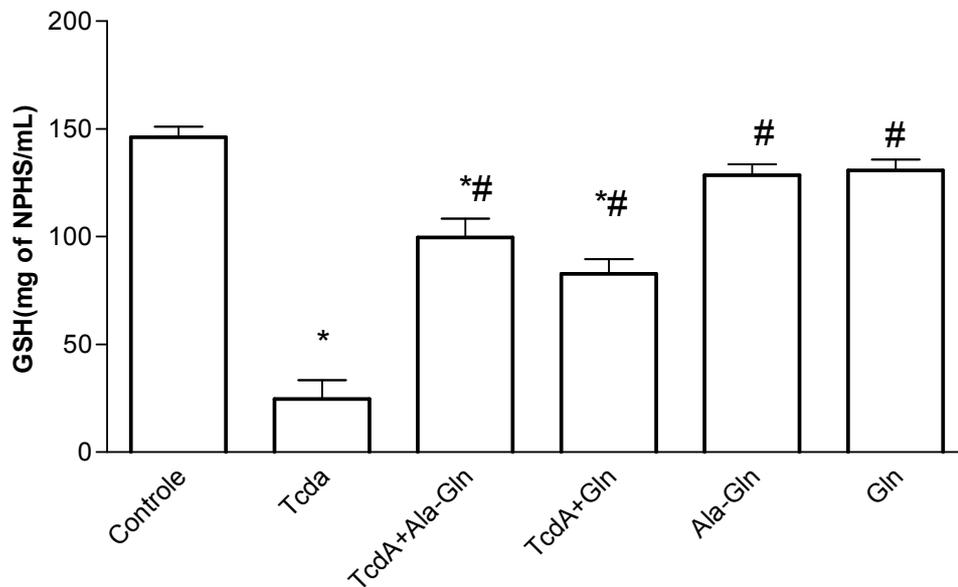


Figura 19: Efeito da TcdA do *C. difficile* e da glutamina e da alanil-glutamina nos níveis de GSH. As células IEC-6 foram divididas em seis grupos: Controle; TcdA- células tratadas com TcdA (10ng/mL) por 24h; TcdA+ Gln- células tratadas com TcdA (10ng/mL) e glutamina (10mM) por 24h; TcdA + Ala-Gln – células tratadas com TcdA (10ng/mL) e alanil-glutamina (10mM) por 24h; Gln – células tratadas com glutamina (10 mM) por 24h e Ala-Gln – células tratadas com alanil-glutamina (10 mM) por 24h. A avaliação do processo oxidativo foi realizada através da dosagem de GSH. * P<0,05 comparada com controle. # P<0,05 comparada com TcdA.

4.7 Efeito da TcdA do *C. difficile*, da Gln e da Ala-Gln sobre F-actina e proteína RhoA.

Nas figuras 20, 21 e 22 analisaremos de forma conjunta a ação da TcdA do *C. difficile* sobre a F-actina que foi marcada com faloidina- rhodamina, a proteína RhoA que foi marcada com anticorpo secundário FITC e o núcleo que foi marcado com DAPI em azul, através da técnica de imunofluorescência no aumento de 100x. Nas imagens do grupo controle, nos quais as células IEC-6 não receberam nenhum tipo de tratamento, observou-se que a proteína RhoA está localizada principalmente no citoplasma na região periférica ao

núcleo (figuras 20A e 22A), as células apresentam morfologia normal sem fibras de estresse, aderidas em forma de monocamada (figura 21A). Enquanto o grupo incubado somente com TcdA por 24h mostrou uma grande retração citoplasmática, sendo que as células perdem grande parte do contato com as vizinhas, restando formação de finas extensões citoplasmáticas que por vezes mantém este contato (figura 21B e 22B). Observa-se também deposição de material celular em cima do núcleo dificultando sua visualização (figura 22B) e a proteína RhoA marcada em focos sobre o núcleo, suspeita-se de invólucro nuclear, citoplasma e membrana celular (figura 20B).

As células tratadas com TcdA e alanil- glutamina mostraram um formato alongado, com algumas junções preservadas (figura 22D e 21D), sendo que as células se encontram afastadas e também há a presença de lamelipódios (figura 21D) além da proteína RhoA apresentar-se espalhada por toda a extensão da células (figura 20D). E as células suplementadas com alanil-glutamina e sem tratamento com TcdA apresentam a proteína RhoA localizada na periferia do núcleo (figura 20C), enquanto a membrana celular não apresenta nenhuma alteração (figura 21C e 22C), de forma semelhante ao grupo controle.

No grupo TcdA+Gln as células se mostraram com formato arredondado, com preservação parcial das junções, presença de lamelipódios e algumas fibras de estresse (figura 21F e 22F), as células se apresentam menores que as células tratadas com TcdA+ Ala-Gln, além de mostrar também núcleos em mitose (figura 22F) e a proteína RhoA foi marcada na região periférica ao núcleo e também em pontos em cima no núcleo (figura 20F). No grupo Gln se encontram também a proteína Rho A marcada em pontos na região do núcleo e no citoplasma na região periférica ao núcleo (figura 20E).

A quantificação da proteína RhoA foi realizada através de imunoblotting, usando como padrão a α - tubulina. A concentração da proteína RhoA apresentou um aumento de 71 % e 29%, respectivamente nos grupos Ala-Gln e Gln comparado ao controle. Outro dado bastante interessante foi que a concentração de proteína RhoA também ficaram elevados em 10% quando se utilizou somente TcdA ao ser comparada ao controle. As células tratadas com TcdA+Ala-Gln e TcdA+Gln que apresentaram um aumento na concentração de RhoA de 75% e 102% respectivamente em relação ao controle. Entretanto, com essa quantificação aumentada da RhoA, não se sabe se está proteína estava na sua forma ativa ou já teria sido inativada pela toxina A do *C.difficile*.

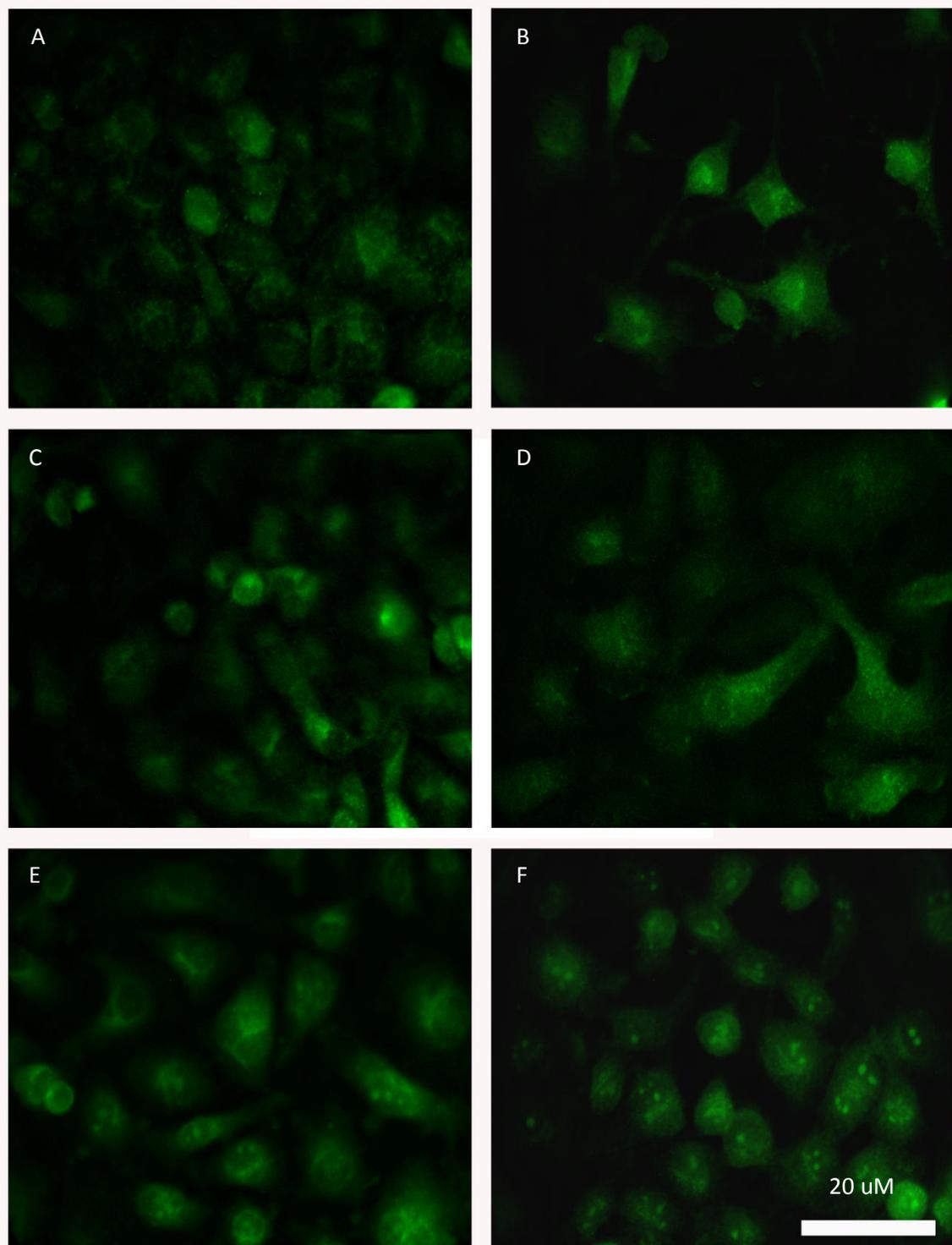


Figura 20: Efeito da TcdA do *C. difficile*, da glutamina e da alanil-glutamina na distribuição da proteína RhoA através da microscopia de imunofluorescência. As células IEC-6 foram divididas em seis grupos: Controle (A); TcdA- células tratadas com TcdA (10ng/mL) (B); Alanil- glutamina – células tratadas com alanil-glutamina (10mM) (C); TcdA + Ala-Gln – células tratadas com TcdA (10ng/mL) e alanil-glutamina (10mM) (D); Glutamina – células tratadas com glutamina (10mM) (E); TcdA+ Gln- células tratadas com TcdA (10ng/mL) e glutamina (10mM) (F). Todos os tratamentos foram de 24h. As células foram incubadas com anticorpo primário para RhoA e anticorpo secundário FITC. Aumento 100x.

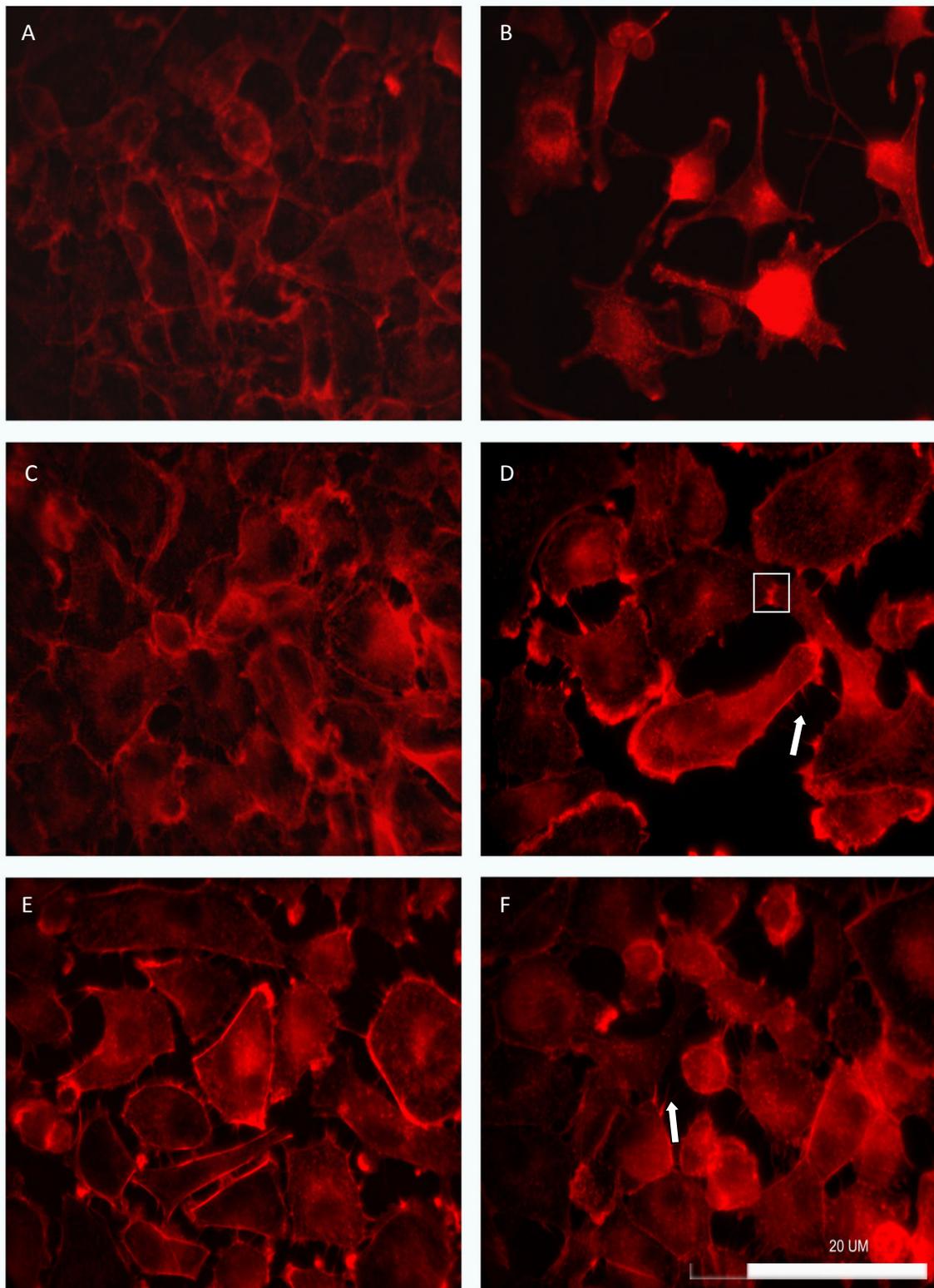


Figura 21: Efeito da TcdA do *C. difficile*, da glutamina e da alanil-glutamina na distribuição das fibras de F-actina através da microscopia de imunofluorescência. As células IEC-6 foram divididas em seis grupos: Controle (A); TcdA- células tratadas com TcdA (10ng/mL) por 24h (B); Alanil- glutamina – células tratadas com alanil-glutamina (10mM) (C); TcdA + Ala-Gln – células tratadas com TcdA (10ng/mL) e alanil-glutamina (10mM) (D); Glutamina – células tratadas com glutamina (10mM) (E); TcdA+ Gln- células tratadas com TcdA (10ng/mL) e glutamina (10mM) (F). As células foram incubadas com Rhodamina- faloidina para marcação das fibras de f-actina. Aumento 100x. O quadro destaca as junções oclusivas. Setas indicam lamelipódios.

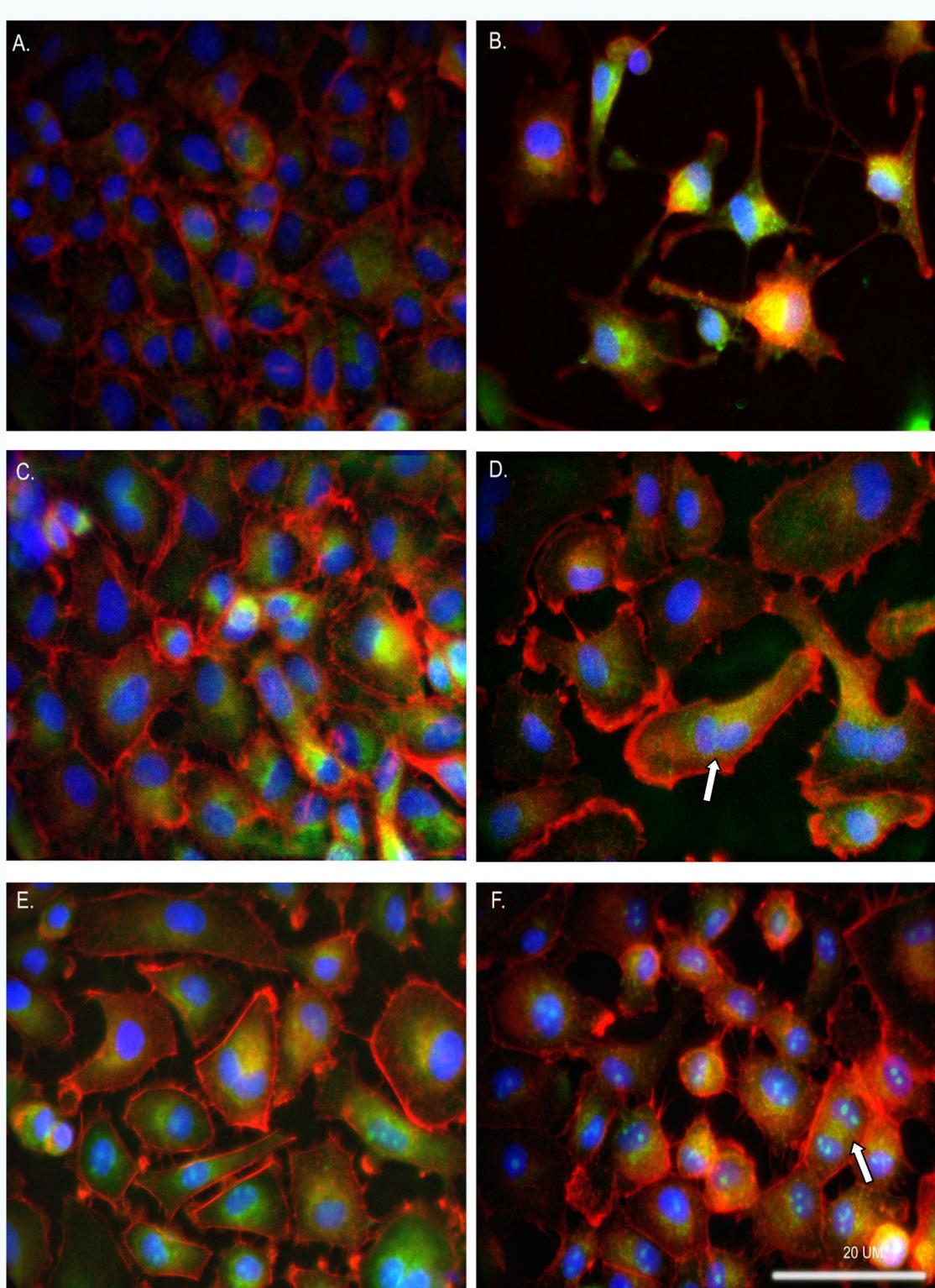


Figura 22: Efeito da TcdA do *C. difficile* na distribuição das fibras de F-actina e proteína RhoA através da microscopia de imunofluorescência. As células IEC-6 foram divididas em seis grupos: Controle (A); TcdA- células tratadas com TcdA (10ng/mL) por 24h (B); Alanil- glutamina – células tratadas com alanil-glutamina (10mM) (C); TcdA + Ala-Gln – células tratadas com TcdA (10ng/mL) e alanil-glutamina (10mM) (D); Glutamina – células tratadas com glutamina (10mM) (E); TcdA+ Gln- células tratadas com TcdA (10ng/mL) e glutamina (10mM) (F). As células foram incubadas com Rhodamina- faloidina, RhoA marcada em verde e DAPI. Aumento 100x. As setas indicam células em mitose.

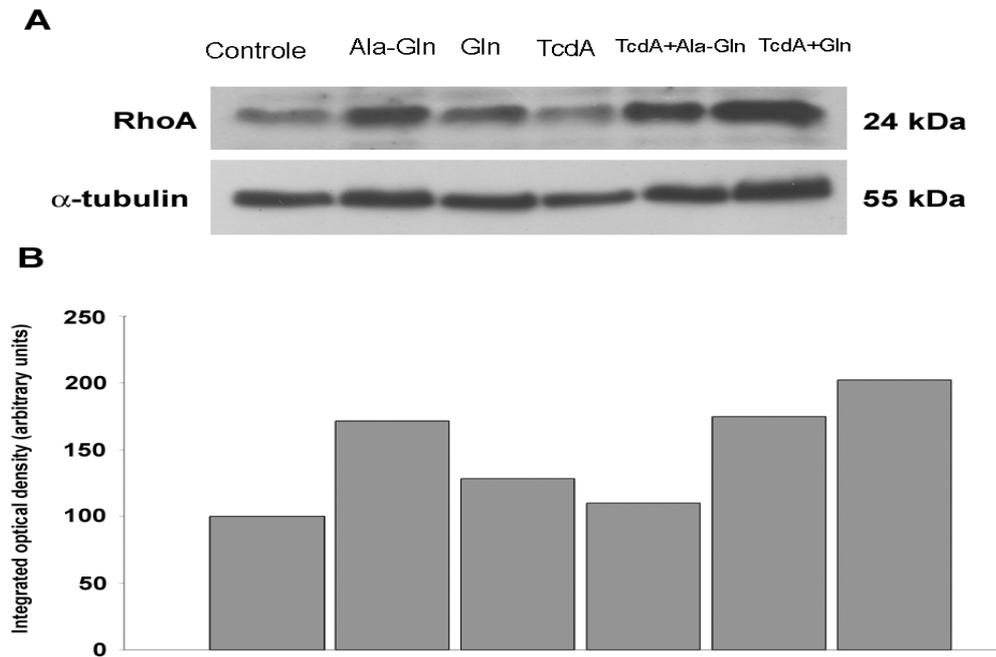


Figura 23: Efeito da TcdA do *C. difficile*, da glutamina e da alanil-glutamina na concentração de proteína RhoA através de imunoblotting. As células IEC-6 foram divididas em seis grupos: Controle; TcdA- células tratadas com TcdA (10ng/mL); Alanil- glutamina – células tratadas com alanil-glutamina (10mM); TcdA + Ala-Gln – células tratadas com TcdA (10ng/mL) e alanil-glutamina (10mM); Glutamina – células tratadas com glutamina (10mM); TcdA+ Gln- células tratadas com TcdA (10ng/mL) e glutamina (10mM). Todos os tratamentos foram de 24h. A quantificação foi feita de forma comparativa usando como padrão a proteína α -tubulina.

5 DISCUSSÃO

Através dos resultados dos nossos experimentos mostramos que a toxina A do *C.difficile* provoca alterações relevantes na morfologia das células epiteliais intestinais tanto nas IEC-6 como nas HCT-8, avaliadas por diferentes abordagens microscópicas.

A microscopia de força atômica foi capaz de demonstrar visualmente e quantitativamente a diminuição do volume e da área celular juntamente com o aumento de altura, o que sugere contração da célula associada a uma possível agregação de material celular em torno do núcleo, sendo este aspecto também observado através da imunofluorescência, pois é constatada a marcação de actina em cima do DAPI utilizado para marcar o núcleo. Além disso, TcdA causou ruptura do envelope nuclear e condensação da cromatina após 1h de incubação na concentração de 100ng/mL. A maioria destas alterações morfológicas foram confirmados pela microscopia eletrônica de varredura, pela microscopia confocal e imunofluorescência.

O levantamento bibliográfico revelou uma estreita relação entre a morfologia das células e a sua função. A organização do citoesqueleto tem um papel importante na orientação da motilidade e adesão célula- célula (DOCHEVA *et al.*, 2008). Conforme Kim *et al.*, (2005; 2007) as células epiteliais do cólon estão envolvidas na manutenção da função da barreira intestinal e a desorganização do citoesqueleto pode danificar as junções oclusivas, com conseqüente contato focal inadequado, levando possivelmente à exposição em larga escala das células do sistema imunológico na lâmina própria aos patógenos. As junções oclusivas apresentam como funções principais: determinar a polaridade das células epiteliais separando o domínio apical e o domínio basolateral e impedir a livre passagem de substâncias ativas através da camada de células epiteliais, essas junções ocorrem através da união de membranas plasmáticas de células adjacentes em intervalos regulares com a finalidade de selar o espaço intracelular apical, essas áreas de íntimo contato se continuam ao redor de todo o perímetro apical como um cinturão, formando faixas anastomosadas de proteínas transmembranares, ocludinas e claudinas (KIERSZENBAUM, 2008). Rupnik, Wilcox e Gerding (2009) mostraram que apesar do processo de patogênese da TcdA, a produção do biofilme e adesão serem desconhecidos o mesmo leva a ruptura das junções oclusivas, apoptose e a produção de mediadores que atraem neutrófilos. Os dados morfológicos demonstrados neste trabalho

sugerem a morte celular por apoptose, como relatado anteriormente por Brito *et al.*, (2002b e 2005) e Carneiro-Filho *et al.*, (2006), o que poderia contribuir para o rompimento da barreira epitelial intestinal levando à resposta inflamatória grave devido à infecção por *C. difficile*. Em 2008, estudo publicado afirmou que em relação à patologia da DACD, deve-se assumir necrose de forma mais importante do que a apoptose, já que esta é acompanhada por uma liberação do conteúdo citoplasmático, que alerta o sistema imunológico, levando a inflamação local (GENTH *et al.*, 2008). No entanto sabe-se que, dependendo da intensidade e da duração do estímulo, o dano pode começar por apoptose e evoluir para necrose.

É conhecido que TcdA induz monoglicosilação de Rho em treorina 37, Rac e Cdc42 em treorina 37/35 proteínas da família Rho impedindo-as de participar na formação e na organização dos filamentos de actina (JUST *et al.*, 1995; SELZER *et al.* 1996). Acredita-se que este mecanismo é a principal causa para as alterações morfológicas celulares induzidas por TcdA, tendo como consequência o colapso do citoesqueleto, como visto por microscopia confocal e imunofluorescência. Os resultados produzidos pela inativação da proteína RhoA são: diminuição da migração celular, alterações no processo de fagocitose, ausência de produção de citocinas, desorganização do complexo focal, desaparecimento de cabos de actina e extensões filopodiais, ausência de lamelipódios, que são filamentos de actina localizados na borda de condução e estão envolvidos na motilidade e interação com outros tipos celulares, resultando na perda completa da forma da célula, ou seja, o arredondamento das células (BRITO *et al.*, 2005; CASTAGLIUOLO *et al.*, 1998; JANK; GIESEMANN; AKTORIES, 2007; FERNANDEZ *et al.*, 2009).

Em nossos resultados podemos observar o aumento discreto da quantidade da proteína RhoA nas células tratadas com TcdA em relação ao controle, nos levando à hipótese de que haja um estímulo na produção de Rho GTPase, em à inativação causada pela TcdA. Em estudo realizado por Heneweer *et al.* (2005) mostrou-se que em células epiteliais uterinas infectadas com TcdA, a maior concentração de RhoA encontrada foi na fração correspondente à membrana, corroborando com a nossa análise morfológica da distribuição de proteína RhoA no grupo TcdA. Segundo Herrmann *et al.*(1998) e Sehr *et al.*(1998) a proteína RhoA, quando glicosilada, fica associada à membrana celular.

Nam *et al.* (2010) trouxe uma nova visão para os mecanismos envolvidos no arredondamento celular rápido induzida por TcdA. Seu grupo demonstrou que, além do papel conhecido da TcdA na inativação de proteínas da família Rho relacionado à desagregação da actina, a toxina também induz desacetilação da tubulina e despolimerização dos microtúbulos

através da ativação HDAC6 deacetilase tubulina citosólica, levando ao remodelamento do citoesqueleto. Instabilidade dos microtúbulos é crucial para a forma da célula (POPOVA *et al.*, 2003), o movimento de células (GAO *et al.*, 2008), transporte intracelular de organelas (BICEK *et al.*, 2009), e a separação dos cromossomos durante a mitose (FERNANDEZ *et al.*, 2009) que poderia explicar, conjuntamente com a inativação da Rho, a diminuição da proliferação induzida por TcdA encontrado nesta pesquisa.

A alta resolução das avançadas técnicas de microscopia como a microscopia de fluorescência confocal a laser, microscopia de força atômica, microscopia eletrônica de varredura e imunofluorescência são capazes de fornecer detalhadas características morfológicas e informações do citoesqueleto. Em particular, AFM, o qual além de suas capacidades de alta resolução oferece vantagem sobre as tradicionais técnicas microscópicas, porque não é restrita a morfologia das células e/ou elementos do citoesqueleto, organelas, mas também fornece informações quantitativas sobre o volume celular e altura, o que possibilitou não só a demonstração da citotoxicidade grave de TcdA em células epiteliais intestinais de ratos e humanos, mas também o efeito protetor da glutamina e alanil-glutamina.

O presente estudo também forneceu evidências de que a suplementação de Gln e Ala-Gln revertem parcialmente alterações morfológicas induzidas por TcdA em células epiteliais intestinais. Estes resultados estão em conformidade com estudos anteriores do nosso grupo que mostraram que Gln e Ala-Gln preveniram a inibição da migração celular, apoptose e da queda inicial na resistência transepitelial induzida por TcdA (BRITO *et al.*, 2005). Em estudo realizado por Li *et al.* (2004) as junções oclusivas de células Caco-2 são rompidas quando há uma depleção de glutamina, induzida pelo inibidor de glutamina sintetase. Essa inibição leva à dissolução de componentes das junções oclusivas, incluindo claudina-1 e proteínas de zônulas de oclusão-1 sendo este efeito revertido com adição de glutamina ao meio anteriormente livre deste aminoácido.

As alterações em relação às medidas de volume e área celular onde a glutamina e o seu derivado estável alanil-glutamina, revertem, em parte, a lesão causada pela TcdA, podem estar ligadas ao fato deste aminoácido necessitar de transporte ativo para penetrar na célula, por um sistema dependente de sódio, que ao ser absorvido promove também a absorção de água, aumentando o estado de hidratação, que influencia no volume celular sendo considerado um sinal anabólico podendo estimular a síntese protéica (CRUZAT *et al.*, 2007; MEIJER, 2003).

Além disso, nosso grupo demonstrou previamente que glutamina e alanil-glutamina inibem a apoptose de células T84, impedindo a ativação da caspase 8, reduzindo também *in vivo* a morte celular detectado pelo método de TUNEL mostrando a preservação da mucosa e reduzindo a secreção em alça ileal de coelho (CARNEIRO-FILHO *et al.*, 2006). Desde que o citoesqueleto e os microtúbulos estão envolvidos na separação dos cromossomos durante o processo de mitose, não é de estranhar que a preservação, mesmo que parcial do citoesqueleto, pelos micronutrientes leve à proliferação celular aumentada, mesmo na presença de TcdA. Conforme pesquisas publicadas por Rhoads *et al.* (1997 e 2000) células que estavam em meio ausente de glutamina quando foram suplementados com este aminoácido na concentração de 2,5mM apresentaram um aumento de 20X na incorporação de timidina ao DNA caracterizando uma resposta proliferativa. Sendo esta resposta associada à ativação do ERKs 1 e 2 via MAPK quinase, fosforilação de fatores de transcrição nuclear Elk-1 e c-Jun, juntamente com a ativação da proteína ativadora de transcrição gene dependente. Por isso a glutamina é considerada como um combustível de proliferação para células intestinais.

Giesemann *et al.* (2006) mostrou que a TcdA provoca o efeito de formação de poros, principalmente em tipos celulares específicos como Caco-2 dependente da presença de colesterol, já a TcdB forma poros na ausência de colesterol. O malonildialdeído é utilizado como indicador de peroxidação lipídica. A TcdA aumenta a concentração deste produto citotóxico que leva a um aumento da permeabilidade da membrana celular causando também alterações estruturais podendo ocasionar a morte celular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Possivelmente essa dosagem de MDA elevada está relacionada com o processo oxidativo, já o tratamento com glutamina e alanil-glutamina reverteu, em parte, esses dados. A glutathione desempenha papel central em danos oxidativos e vias de sinalização, sendo a sua concentração indicadora de funcionalidade celular e proteção contra o estresse oxidativo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). A TcdA induz a célula ao dano oxidativo, apesar da glicosilação da Rho diminuir a produção do radical superóxido (JANK; GIESEMANN; AKTORIES, 2007) enquanto as células infectadas com TcdA e tratadas com glutamina e/ou alanil-glutamina mostram uma redução nos níveis de MDA e um aumento significativo na concentração de GSH indicando uma maior proteção ao dano oxidativo e redução no processo de peroxidação lipídica. Segundo Oliveira *et al.* (2010) a suplementação com glutamina é eficaz no combate ao estresse oxidativo. O aumento na concentração de glutamina intracelular eleva a produção de GSH, pois a Gln é um de seus precursores. O GSH é considerado o principal antioxidante celular não-enzimático e também está relacionado à via apoptótica, pois

a HSP preveni a apoptose fazendo a inibição da via de sinalização celular da NF- κ B que dependente do estado redox celular, sendo que este se relaciona com a concentração de GSH (CRUZAT; PETRY; TIRAPEGUI, 2009).

Gabai e Sherman (2002) mostraram que a principal via de sinalização para sobrevivência das células as alterações em sua homeostasia é ativação das HSPs que tem sua ação regulada pela glutamina. Segundo Bilban e colaboradores (2008), em alguns modelos de doença, o efeito protetor da glutamina requer a indução do fator HO-1. Nosso grupo de pesquisa sugeriu que a via HO/CO tem um importante efeito protetor quando há injúria causada pela TcdA do *C. difficile*, inclusive na diminuição do infiltrado neutrofílico na mucosa. Estudos realizados por diversos autores mostraram que Gln e seu derivado estável Ala-Gln têm ações efetivas sobre proliferação celular, apoptose e síntese de proteínas (NEWSHOLME *et al.*, 2003; ROGERO; TIRAPEGUI, 2003; SINGLETON; BECKEY; WISCHMEYER, 2005; SINGLETON; WISCHMEYER, 2007). Como foi demonstrado neste trabalho, para todas as situações na quais as células sofreram a ação deletéria da TcdA houve uma melhora nas características apresentadas pelas células ao serem tratadas com Gln, apesar dos estudos não mostrarem ainda uma relação direta entre o metabolismo da proteína Rho e a glutamina. Neste trabalho podemos constatar que a concentração de proteína RhoA se encontrou relevantemente elevada na presença dos micronutrientes quando utilizados na ausência e/ou presença de TcdA. O aumento de expressão de RhoA pode ser uma das explicações à atividade protetora de glutamina e alanil-glutamina na citotoxicidade induzida pela toxina A.

Este é o primeiro estudo realizado com a finalidade de avaliar morfologicamente o efeito da toxina A do *C. difficile* e do tratamento Ala-Gln e Gln utilizando AFM. Estas imagens obtidas através da microscopia de força atômica fundamentaram o estudo confocal, utilizando marcadores imunofluorescentes necessários para compreender o efeito da TcdA em linhagens de células epiteliais intestinais. Além disso, as alterações morfológicas das células epiteliais intestinais e desorganização dos filamentos de actina mediada pela TcdA pode inicialmente ser responsabilizada pela indução de lesões graves na mucosa intestinal em decorrência da infecção pelo *C. difficile*. A glutamina e alanil-glutamina revertem o dano causado pelo TcdA, reduzindo alterações na morfologia celular e aumentando a proliferação celular, que reforçam o potencial destes nutrientes como intervenção terapêutica adjuvante em enterite *C. difficile*. Os mecanismos precisos por trás desses efeitos benéficos da glutamina e alanil-glutamina necessitam de uma investigação mais aprofundada.

Neste estudo também demonstramos que a análise de características morfológicas por avançadas técnicas de microscopia, juntamente com moléculas de sinalização intracelular pode fornecer a plataforma adicional para avaliar o efeito de toxinas *C. difficile* ou outras toxinas e possíveis tratamentos em células epiteliais intestinais.

6 CONCLUSÕES

- A TcdA induz alterações morfológicas associadas à desagregação de actina do citoesqueleto em células epiteliais intestinais, diminui a proliferação das células epiteliais intestinais e induz estas células ao estresse oxidativo. As alterações morfológicas mostradas neste trabalho independem da ativação do sistema imune.
- A glutamina e alanil-glutamina revertem o dano causado pelo TcdA, reduzindo as alterações na morfologia celular, aumentando a proliferação celular e a concentração da proteína RhoA, que reforça o potencial destes nutrientes como na terapêutica adjuvante da DACD.
- O uso de avançadas técnicas de microscopia para o estudo de alterações morfológicas fornece dados relevantes para avaliar o efeito de toxinas *C. difficile* ou outras toxinas e seu tratamento em células epiteliais intestinais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHN, SG; THIELE, D. Redox regulation of mammalian heat shock1 is essential for HSP gene activation and protection from stress. **Genes Dev.** v. 17, p. 516-28, 2003.
- ARDAWI, MSM. Glutamine-synthesizing activity in lugs of fed, starved, acidotic, diabetic, injured and septic rats. **Biochem J.** v. 270, p. 829-832, 1990.
- ARTEAGA, A; SANTA-OLALLA, P; SIERRA, MJ; LIMIA, A; CORTÉS, M; AMELA, C. Riesgo epidémico de la enfermedad asociada a una nueva cepa de *Clostridium difficile* **Enferm Infecc Microbiol Clin.**v.27, n.5, p. 278–284.2009
- ATALAY, M; OKSALA, NKKJ; LAAKSONEN, DE; KHANNA, S; NAKAO, C; LAPPALAINEN, J ET AL. Exercise training modulate heat shock protein response em diabetes. **J Appl Physiol.** v. 97, p. 605-11, 2004.
- AUSIELLO, CM; CERQUETTI, M; FEDELE, G; SPENSIERI, F; PALAZZO, R; NASSO, M; FREZZA, S; MASTRANTONIO, P. Surface layer proteins from *Clostridium difficile* induce inflammatory and regulatory cytokines in human monocytes and dendritic cells. **Microbes Infect.**v. 8, p. 2640–2646. 2006.
- BAINES, SD; O’CONNOR, R; SAXTON, K; FREEMAN, J; WILCOX, MH. Comparison of oritavancin versus vancomycin as treatments for clindamycin-induced *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 infection in a human gut model. **J. Antimicrob. Chemother.** v.62, p. 1078-1085, 2008.
- BALASSIANO, IT; MIRANDA, KR; BOENTE, RF; PAUER, H; OLIVEIRA, ICM, SANTOS-FILHO, J; AMORIM, ELT; CANINÉ, GA; SOUZA, CF; GOMES, MZR; FERREIRA, EO; BRAZIER, JS; DOMINGUES, RMCP. Characterization of *Clostridium difficile* strains isolated from immunosuppressed in patients in a hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Anaerobe.** v.15, p. 61–64. 2009
- BARRETO, AR; CAVALCANTE, IC; CASTRO, MV; JUNQUEIRA, AF; VALE, MR; RIBEIRO, RA; SOUZA, MH; BRITO, GA. Funcoidin prevents *Clostridium difficile* toxin-A-induced ileal enteritis in mice. **Dig. Dis. Sci.** v. 53, n.4, p. 990-6, 2008.
- BARTH, H; PFEIFER, G; HOFMANN, F; MAIER, E; BENZ, R; AKTORIES, K. Low pH-induced formation of ion channels by *Clostridium difficile* toxin B in target cells. **J Biol Chem.** v.276, p.10670-10676. 2001
- BICEK, AD; TUZEL, E; DEMTCHOUK, A; UPPALAPATI, M; HANCOCK, WO; KROLL DM; ODDE, D. Anterograde microtubule transport drives microtubule bending in LLC-PK1 epithelial cells. **Mol. Biol. Cell.**v. 20, n.12, p. 2943-2953. 2009

BILBAN, M; HASCHEMI, A; WEGIEL, B; CHIN, BY; WAGNER, O; OTTERBIEN, LE. Heme oxygenase and carbon monoxide initiate homeostatic signaling. **J Mol Med** 86:267-279. 2008

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

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

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

BRITO, GA; FUJJI, J; CARNEIRO –FILHO, B; LIMA, AA; OBRIG, T; GUERRANT, RL. Mechanism of *Clostridium Difficile* toxin A – induced apoptosis in T84 cell. **J. Infect. Dis.** v.186, n.10, p.1438-1447. 2002a

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

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

BURCKHARDT, F; FRIEDRICH, A; BEIER, D; ECKMANNS, T. *Clostridium difficile* surveillance trends, Saxony, Germany. **Emerg. Infect. Dis.** v.14, p. 691–692 .2008.

BURG, MB; FERRARIS, JD; DMITRIEVA, NI. Cellular response to hyperosmotic stresses. **Physiol Res.** v. 87, p. 1441-74, 2007.

CARNEIRO–FILHO, BA; FUJJI, J; BRITO, GA; ALCANTARA, C; ORIÁ, RB; LIMA, AA; OBRIG, T; GUERRANT, RL. Caspase and bid involvement in *Clostridium difficile* toxin A - induced apoptosis and modulation of toxin A effects by glutamine and alanyl-glutamine in vivo and vitro. **Infect. Immun.** v.74, n.1, p. 81-87. 2006.

CARNEIRO–FILHO, BA; ORIÁ, RB; REA, KW; BRITO, GA; FUJJI, J; OBRIG, T; LIMA, AA; GUERRANT, RL. Alanyl –glutamine hastens morphologic recovery from 5-fluorouracil – induced mucositis in mice. **Nutrition.** v.20, n.10, p. 934-41. 2004.

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

CASTAGLIUOLO, I; RIEGLER, M; NIKULASSON, S; LU, B; GERARD, C; GERARD, NP; POTHOUKAKIS, C. NK-1 receptor is required in *Clostridium difficile* - induced enteritis. **J. Clin. Invest.** v.101, p.1547-1550. 1998

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

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

CRUZAT, VF; PETRY, ER; TIRAPEGUI, J. Glutamina: aspectos bioquímicos, metabólicos, moleculares e suplementação. **Rev. bras med esporte.** v. 15, n. 5, p. 392-397. 2009.

CRUZAT, VF; REGERO, MM; BORGES, MC; TIRAPEGUI, J; Aspectos sobre stress oxidativo, exercícios físicos e suplementação. **Ver. Bras. Med. Esporte.** V 79, 336-342, 2007.

CURI, R; LAGRANHA, CJ; DOI, SQ; SELLITI, DF; PROCOPIO, J; PITHON-CURI, TC; CORLESS, M; NEWSHOLME, P. Molecular mechanisms of glutamine action. **J Cell Physiol.** v.204, p. 392-401. 2005

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

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

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

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

DOCHEVA, D, PADULA, D; POPOV, C; MUTSCHLER, W; CLAUSEN-SCHAUMANN, H; SCHIEKER, M; Researching into the cellular shape, volume and elasticity of mesenchymal stem cells, osteoblast and osteosarcoma cells by atomic force microscopy. **J. Cell Mol. Med.** 12(2):537-552. 2008

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

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

EAGLE, H. Nutrition needs of mammalian cells in tissues cultures. **Science.** v.122, p. 501-504. 1955.

ETIENNE, MANNEVILLE, S; HALL, A; Rho GTPases in cell biology. **Nature.** 420:629 – 635. 2002

EVANS, ME; JONES, DP; ZIEGLER, TR. Glutamine prevents cytokine-induced apoptosis in human colonic epithelial cells. **J Nutr.**v. 133, p. 3065-3071. 2003.

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

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

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

FERNANDEZ, N; CHANG, Q; BUSTER, DW; SHARP, DJ; MA, A. A model for the regulatory network controlling the dynamics of kinetochore microtubule plus-ends and poleward flux in metaphase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 106:7846-7851.2009

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

FERREIRA, ALA; MATSUBARA, LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil.** v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FLARING, UB; ROOYACKERS, OE; WERNERMAN, J; HAMMARQVIST, F; Glutamine attenuates post-traumatic glutathione depletion in human muscle. **Clin. Sci.** 104:275-282. 2003

FRANCISCO, TD; PITHON-CURI, TC; CURI, R; GARCIA, JRJ. Glutamina: metabolismo, destinos, funções e relação com o exercício físico. **Arq. Ciênc. Saúde unipar.** v.6, n.1, p. 81-88, 2002.

FUNG, CKM; SEIFFER-SINHA, K; LAI, KWC; YANG, R; PANYARD, D; ZHANG, J; XI, N; SINHA, AA; Investigation of human keratinocyte cell adhesion using atomic force microscopy. **Nanomedicine:NBM** 6:191-200. 2010

FURST, P; POGAN, K; STEHLE, P. Glutamine dipeptides in clinical nutrition. **Nutrition**. v. 13, n. 7-8, p. 731-737,1997.

GABAI, VL; SHERMAN, MY. Interplay between molecular chaperones and signaling pathways in survival of heat shock. **J Appl Physiol**. v.92, p. 1743-8, 2002.

GAO, J; HUO, L; SUN, X; LIU, M; LI, D; DONG, JT; ZHOU, J; The tumor suppressor CYLD regulates microtubule dynamics and plays a role in cell migration. **J. Biol. Chem.** 283(14):8802-8809. 2008

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

GENTH, H; AKTORIES, K; JUST, I. Monoglucosylation of RhoA at threonine-37 blocks cytosol- membrane cycling. **J Biol Chem**. v.274, p. 29050-29056. 1999.

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

GERHARD, R; NOTTROT, S; SCHOENTAUBE, J; TATGE, H; OLLING, A; JUST, I; Glucosylation of Rho GTPases by *Clostridium difficile* toxin A triggers apoptosis in intestinal epithelial cells. **Journal of medical microbiology**. 57: 765-770. 2008

GERHARD, R; TATGE, H; GENTH, H; THUM, T; BORLAK, J; FRITZ, G; JUST I. *Clostridium difficile* toxin A induces expression of the stress-induced early gene product RhoB. **Journal of Biological Chemistry**. v.280, p. 1499–1505.2005.

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

GEYER, M; WILDE, C; SELZER, J; AKTORIES, K; KALBITZER, HR; Glucosylation of Ras by *Clostridium sordellii* lethal toxin: consequences for the effector loop conformations observed by NMR. Spectroscopy. **Biochemistry**: 42:11951 – 11959. 2003

GIESEMANN, T; JANK, T; GERHARD, R; MAIER, E; JUST, I; BENZ, R; AKTORIES R. Cholesterol-dependent pore formation of *Clostridium difficile* toxin A. **Journal of Biological Chemistry**. v. 281, p. 10808–10815. 2006

GIRIS, M; ERBIL, Y; OZTEZCAN, S; OLGAC, V; BARBAROS, U; DEVECI, U; KIRGIZ B; UYSAL, M; TOKER, GA. The effect of heme oxygenase-I induction by glutamine on radiation-induced intestinal damage: the of heme oxygenase – I on radiation enteritis. **Am J Surg** 191: 503 – 509. 2006

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

GROVER, Z; TUBMAN, R; MCGUIRE, W. Glutamine supplementation for young infants with severe gastrointestinal disease. **Cochrane database Syst Rev**. v. 24, n. CD005947. 2007.

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

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

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

HENEWEER, C; SCHMIDT, M; DENKER, H; THIE, M; Molecular mechanism in uterine epithelium during trophoblast binding: the role of small GTPase RhoA in human uterine ishikawa cells. **Journal of experimental & Clinical assisted reproduction** 2:4. 2005

HERRMANN, C; AHMADIAN, MR; HOFNAM, F; JUST, I; Functional consequences of H-Ras at effector domain amino acid theonine-35. **J Biol Chem**. 273:16134 – 16139 1998

HISCOCK, N; PEDERSEN, BK; Exercise-induced immunodepression- plasma glutamine is not the link. **J Appl Physiol**. 93: 813-822. 2002

HOUDIJK, AP; RIJNSBURGER, ER; JANSEN, J; WESDORP, RI; WEISS, JK; McCAMISH, MA; TEERLINK, T; MEUWISSEN, SG; HAARMAN, HJ; THIJS, LG; VAN, LEEUWEN, PA; Randomized trial of glutamine-enriched enteral nutrition on infectious morbidity in patients with multiple trauma. **Lancet**. 352:772-776. 1998

JAFFE, AB; HALL, A; Rho GTPases: biochemistry and biology. **Annu Rev Cell Dev Biol**., 21: 247-269. 2005

JANDT, KD; Developments and perspectives of scanning probe microscopy (SPM) on organic materials. **Materials Science and Engineering R.: Reports, Lausanne**, 21:221-295. 1998

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

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

JOHNSON, S; Recurrent *Clostridium difficile* infection: A review of risk factors, treatments, and outcomes. **J Infect** 58:403-410. 2009

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

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

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

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

KELLY, CP; LAMONT, JT. *Clostridium difficile*—more difficult than ever. **N Engl J Med**. v.359, p.1932-1940. 2008

KIERSZENBAUM, AL. Epitélio. In _____. **Histologia e Biologia celular: uma introdução a patologia**. 2ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. cap. 1, p. 1-57.

KIM, H; KOKKOTOU, E; NA, X; RHEE, SH; MOYER, MP; POTHOUKAKIS, C; LAMONT, JT; *Clostridium difficile* toxin A-induced apoptosis in human colonocytes involves p53-dependent-p21(WAF-1/CIP-1) induction via p38 MAP kinase. **Gastroenterology**,129:1875-1888. 2005

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

KO, TC; BEAUCHAMP, RD; TOWNSEND, CMJR; THOMPSON, JC. Glutamine is essential for epidermal growth factor- stimulated intestinal cell proliferation. **Surgery**. v. 114, p. 147-153. 1993.

KREBS, H. The synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia, and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissues. **Biochem J**. v. 33, p. 1951-1969. 1935.

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

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

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

LABOW, BI; SOUBA, WW; ABCOUWER, SF; Mechanisms governing the expression of the enzymes of glutamine metabolism – glutaminase and glutamine synthetase. **J. Nutr**. V 131, 2467s-2474s, 2001.

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

LARSON, HE; PRINCE, AB; HONOUR, P; BORRIELO, SP; *Clostridium difficile* and the aetiology of pseudomembranous colitis. **Lancet**, v 1, 1063-1066, 1978.

LARSON, SD; LI, J; CHUNG, DH; EVERS, BM. Molecular mechanisms contributing to glutamine- mediated intestinal cell survival. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**. v. 293, p. G1262-1272. 2007.

LI, N; LEWIS, P; SAMUELSON, D; LIBONI, K; NEU, J. Glutamine regulates caco-2 cell tight junction proteins. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**. v. 287, p. G726-G733, 2004.

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

LIMA, NL. Suplementação de alanil-glutamina em crianças de uma comunidade carente de Fortaleza-CE: Impacto sobre a barreira intestinal e estado nutricional infantil. 2006.174f. **Tese (Doutorado em Farmacologia)- Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**. Universidade Federal do Ceará, 2006.

LIMA, NL; PEREIRA, CR; SOUZA, IC; FACANHA, MC; LIMA, AA, GUERRANT, RL; FARR, BM. Selective surveillance for nosocomial infections in a Brazilian hospital. **Infect Control Hosp Epidemiol**. v. 14, n. 4, p. 197-202. 1993.

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

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.

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

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

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

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

MCDONALD LC, KILLGORE GE, THOMPSON A, OWENS RC JR, KAZAKOVA SV, SAMBOL SP, JOHNSON S, GERDING DN. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. **N Engl J Med**. v.353, n. 23, p. 2433-41. 2005

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

MEIJER, AJ. Amino Acids as regulators and components of nonproteinogenic pathway. **Journal of Nutrition**. v.133, p. 2057s-2062s. 2003.

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

METCALF, D; AVERY, BP; JANECKO, N; MATIC, N; REID-SMITH, R; WEESE, JS. *Clostridium difficile* in seafood and fish. **Anaerobe**. p.1-2. 2011

MORLION, BJ; STEHLE, P; WACHTLER, P; SIEDHOFF, HP; KOLLER, M; KONIG, W; FURST, P; PUCHSTEIN, C; Total parenteral nutrition with glutamine dipeptide after major abdominal surgery. **Ann Surg.** 227: 302-308. 1998

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

NA, X; KIM, H; MOYER, MP; POHOULAKIS, C; LAMONT, TJ; Gp96 is a human colonocyte plasma membrane binding protein for *Clostridium difficile* toxin A. **Infect. Immune.** V76, 2862-2871, 2008.

NAKA, S; SAITO, H; HASHIGUCHI, Y; LIN, MT; FURUKAWA, S; INABA, T; FUKUSHIMA, R; WADA, N; MUTO, T; Alanyl-glutamine supplemented total parenteral nutrition improves survival and protein metabolism in a rat protracted bacterial peritonitis model. **JPEN** 20: 417-423. 1996

NAM H J, KANG JK, KIM SK, AHN KJ, SEOK H, PARK J, CHANG JS, POTHOUKAKIS C, LAMONT JT, KIM H. *Clostridium difficile* Toxin A Decreases Acetylation of Tubulin, Leading to Microtubule Depolymerization through Activation of Histone Deacetylase 6, and This Mediates Acute Inflammation. **The Journal of Biological Chemistry.** 285(43): 32888–32896. 2010

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

NEWSHOLME, P; PROCOPIO, J; LIMA, MMR; PITHON-CURI, TC; CURI, R; Glutamine and glutamate – their central role in cell metabolism and function. **Cell Biochem Funct.** V 21, 1-9, 2003.

O’CONNOR, JR; JOHNSON, S; GERDING, DN; *Clostridium difficile* infection caused by the epidemic BI/NAP 1/027 strain. **Gastroenterology** 136:1913-1924. 2009

OLIVEIRA, GP; DIAS, CM; PELOSI, P; ROCCO, PRM; Understanding the mechanism of glutamine action in critically ill patients. **An Acad Bras Cienc.**82(2):417-430. 2010

PÉPIN J, VALIQUETTE L, ALARY ME, VILLEMURE P, PELLETIER A, FORGET K, PÉPIN K, CHOUINARD D. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. **CMAJ.** 31;171(5):466-472. 2004

PHANVIHITSIRI, K; MUSCH, MW; ROPELESKI, MJ; CHANG, EB; Heat induction of heat shock protein 25 requires cellular glutamine in intestinal epithelial cells. **Am J Physiol** 291:C290- C299. 2006

PINEL, C; COXAM, V; MIGNON, M; TAILANDIER, D; CUBIZOLLES, C; LEBECQUE, A, DAURMAN, D; MEYNIAL-DENIS, D. Alterations in glutamine synthetase activity in rat skeletal muscle are associated with advanced age. **Nutrition**. v. 22, p.778-785. 2006.

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

POPOFF, MR; RUBIN, EJ; GILL, DM; BOQUET, P; Actin-specific ADP- ribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain . **Infect Immun**. Sep; 56(9): 2299-306. 1988

POPOVA, JS; RASENICK, MM; G β γ Mediates the interplay between tubulin dimmers and microtubules in the modulation of Gq signaling. **J.Bio Chem**. 278:34299-34308. 2003

POSSIDONIO, ACB; SENNA, ML; PORTILHO, DM; SOARES, CP; SAMPAIO, LS; EINICKER-LAMAS, M; BRANCO, MTL; COSTA, ML; MERMELSTEIN, C. α -Cyclodextrin enhances myoblast fusion and muscle differentiation by the release of IL-4 **Cytokine** 55: 280–287 2011

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

POTHOULAKIS, C; LAMONT, JT. The integrated response of the intestine to *Clostridium difficile* toxins. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**. v.280, p. G178-83. 2001

POUNTANEN, SM; SIMOR, AE. *Clostridium difficile*- associated diarrhea in adults. **CMAJ**. v. 171, p. 51-58. 2004.

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

QUIRINO, CS; LEITE, GO; REBELO, LM; TOMÉ, AR; COSTA, JGM; CARDOSO, AH; CAMPOS, AR; Healing potential of pequi (*Caryocar coriaceum wittm.*) fruit pulp oil. **Phytochemistry letters**.2:179-183. 2009

RENNIE, MJ; BOWTELL, JL; BRUCE, M; KHOGALI, SEO; Interaction between glutamine availability and metabolism of glycogen, tricarboxylic acid cycle intermediates and glutathione. **Journal of Nutrition**. v.131, p. 2478s-2490s. 2001

RHOADS, JM; ARGENZIO, RA; CHEN; GRAVES, LM; LICATO, LL; BILKSLAGER, AT; SMITH, J; GATZY, J; BRENNER, DA. Glutamine metabolism stimulates intestinal cell

MAPKs by a Camp-inhibitable, Raf- independent mechanism. **Gastroenterology** 118:90-100. 2000

RHOADS, JM; ARGENZIO, RA; CHEN, W; RIPPE, RA; WESTWICK, JK; COX, AD; BERSCHNEIDER, HM; BRENNER, DA; L-Glutamine stimulates intestinal cell proliferation and activates mitogenactivated protein kinases. **Am J Physiol** 272:G943-G953. 1997

RHOADS, JM; KEKU, EO; QUINN J; WOOSLEY, J; LEECE, JG. L-glutamine stimulates jejunal sodium and chloride absorption in pig rotavirus enteritis. **Gastroenterology**. v. 100, p.683-691, 1991.

RHOADS, JM; WU, G. Glutamine, arginine, and leucine signaling in the intestine. **Amino acids**. 37: 111-122. 2009

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

ROGERO, MM; TIRAPEGUI, JO. Considerações nutricionais e bioquímicas da suplementação da glutamina em atletas, controvérsias e aspectos atuais. **J. Metab. Nutr.** v.7, p.106-117, 2003.

ROGERO, MM; TIRAPEGUI, JO; PEDROSA, RG; CASTRO, JÁ; PIRES, ISSO; OLIVEIRA, AAM ET AL. Efeito da suplementação com L-alanil-L-glutamina sobre a reposta de hipersensibilidade do tipo tardio em ratos submetidos ao treinamento intenso. **Rev Bras Cie Farm.**v.38,p.487-97, 2002.

ROGERO, MM; TIRAPEGUI, JO; PEDROSA, RG; PIRES, ISO; CASTRO, IA. Plasma and tissue glutamine response to acute and chronic supplementation with L-glutamine and L-alanyl-L-glutamine in rats.**Nutr Res**.v.24,p.261-270, 2004.

ROPELESKI, MJ; RIEHM, J; BAER, KA; MUSCH, MW. Anti-apoptotic effects of L-glutamine-mediated transcriptional modulation of the heat shock protein 72 during heat shock. **Gastroenterology** 129:170-184. 2005

ROWBOTTOM, DG; KEAST, D; MORTON, AR; The emerging role of glutamine as an indicator of exercise stress and overtraining. **Sport Med**. V 21, 80-97, 1996.

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

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

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

SANDRES, MM; KON, C. Glutamine is a powerful effector of heat shock protein expression in drosophila kc cells. **Am J Cell Physiol**. v. 145, p. 180-190, 1991.

SANTOS, RVT; CAPERUTO, EC; COSTA ROSA, LFBP; Effect of acute exhaustive physical exercise upon glutamine metabolism of lymphocytes from trained rats. **Life Sci**. v 80, 573-580, 2007.

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

SCHWAN C, STECHER B, TZIVELEKIDIS T, HAM MV, ROHDE M, HARDT W, WEHLAND J, AKTORIES K. *Clostridium difficile* toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. **Plos pathog**. 5(10): e1000626. 2009

SEDLAK, J; LINDAY, SR. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. **Anal Biochem.**, v. 25, p. 192-205, 1968.

SEHR P, JOSEPH G, GENTH H, JUST I, PICK E, AKTORIES K . Glcosylation and ADP-ribosylation of Rho proteins – effects on nucleotide binding, GTPase activity, and effector-coupling. **Biochemistry**. 37:5296 – 5304. 1998

SELZER J, HOFMANN F, REX G. WILM M, MANN M, JUST I, AKTORIES K. *Clostridium novyi* a-tosin-catalyzed incorporation of GlcNac into Rho subfamily proteins **J Biol Chem**. 271:25173—25177. 1996

SINGLETON, KD; BECKEY, VE; WISCHMEYER, PE. Glutamine prevents activations of NF- κ B and stress kinase pathways, attenuates inflammatory cytokine release, and prevents acute respiratory distress syndrome (ARDS) following sepsis. **Shock**, v. 92, p. 583-589. 2005.

SINGLETON, KD; WISCHMEYER, PE; Glutamine Protection against sepsis and lung injury is dependent on heat shock protein 70 expression. **Am J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol**. v. 292, p.1839-1845. 2007.

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

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

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

UEHARA, K; TAKAHASHI, T; FUJII, H ET AL. The lower intestinal tract-specific induction of heme oxygenase-1 by glutamine protects against endotoxemic intestinal injury. **Crit Care Med.** v. 33, p. 381-390, 2005.

UK NATIONAL STATISTICS. *Clostridium difficile*: number of deaths increase in 2007. <http://www.statistic.gov.uk/cci/nugget.asp?id=1735>. Accessed January 28, 2009.

VAUGHAN, M; MOSS, J. Activation of toxin ADP-ribosyltransferases by the family of ADP-ribosylation factors. **Adv Exp Med Biol.** v. 419, p. 315-20, 1997.

VETTER, IR; HOFMANN, F; WOHLGMUTH, S; HERMANN, C; JUST, I. Structural consequences of mono-glucosylation of Ha-Ras by *Clostridium sordellii* lethal toxin. **J Mol Biol.** 301:1091-1095. 2000

VETTER IR; WITTINGHOFER A. The guanine nucleotide – binding switch in tree dimensions. **Science.** 294:1299 – 1304. 2001

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

VOTH, DE; BALLARD, J; *Clostridium difficile* Toxins: mechanism of action and role disease. **Clinical microbiology reviews.** 18: 247-263. 2005

WANG, WW; QIAO, SY; LI, DF. Amino acids and gut function. **Amino Acids.** v.1, n.1, p.105-110, 2008.

WILMORE, DW; SHABERT, JK; Role de glutamine in immulogic response. **Nutrition** 14: 618-626. 1998

WISCHMEYER PE, LYNCH J, LIEDEL J, WOLFSON R, RIEHM J, GOTTLIEB L, KAHANA M. Glutamine administration reduces: A prospective, randomized, double-blind trial versus isonitrogenous control. **Crit Care Med** 29:2075-2080. 2001

WISCHMEYER, PE; MUSCH, MW; MADONNA, MB; THISTED, R; CHANG, EB. Glutamine protects intestinal cells: role of inducible HSP70. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** v. 272, p. 879-84, 1997.

WISCHMEYER PE. Glutamine and heat shock protein expression. **Nutrition** 18: 225-228. 2002

WRAY, CJ; MAMMEN, JMV; HASSELGREN, P; Catabolic response to stress and potential benefits of nutrition support. **Nutrition**, vol 18, 443-460, 2002.

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

ZIEGLER, TR; MANTELL, MP; CHOW, JC; ROMBEAU, JL; SMITH, RJ. Gut adaptation and the insulin-like growth factor system: regulation by glutamine and IGF-I administration. **Am J Physiol**. v. 271; p. G:866-G875. 1996.

ZIEGLER, TR; OGDEN, LG; SINGLETON, KD; LUO, M; FERNANDEZ-ESTIVARIZ, C; GRIFFITH, DP; GALLOWAY, JR; WISCHMEYER, PE. Parenteral glutamine increases serum heat shock protein 70 in critically ill patients. **Intensive Care Med**. v. 31, p. S105-S111, 2005.

ANEXO: Artigo enviado para publicação na revista BMC Gastroenterology.

EFFECT OF GLUTAMINE AND ALANYL-GLUTAMINE ON MORPHOLOGICAL ALTERATIONS INDUCED BY *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* TOXIN A ON INTESTINAL EPITHELIAL CELLS USING ADVANCED MICROSCOPIC TECHNIQUES.

Ana A. Q. A. Santos², Manuel B. Braga-Neto³, Marcelo R. Oliveira³, Rosemeire S. Freire³, Eduardo B. Barros⁴, Thiago M. Santiago⁴, Luciana M. Rebelo⁴, Aldo A. M. Lima⁵, Cirle A. Warren⁶, Gerly A. C. Brito^{1*}

1. Department of Morphology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Brazil

2. Post Graduation in Medical Sciences, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Brazil.

3. Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Brazil

4. Department of Physics, Faculty of Physics, Federal University of Ceará, Brazil

5. Clinical Research Unit & Institute of Biomedicine, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Brazil

6- Department of Medicine, Division of Infectious Diseases and International Health, University of Virginia, US

E-mail addresses;

AAQAS: angelica.nutri@gmail.com

MBBN: bonfim_net@hotmail.com

MRO: marcelroseo@yahoo.com.br

RSF: rosefreire@gmail.com

EBB: ebarros@fisica.ufc.br

TMS: thiagodemelosantiago@gmail.com

LMR: lucianamagal@gmail.com

AAML:alima@ufc.br

CAW: ca6t@virginia.edu

GACB: gerlybrito@hotmail.com

ABSTRACT

Background: *Clostridium difficile* is the major cause of antibiotic-associated colitis, a disease with significant morbidity and mortality. Glutamine (Gln), a non-essential aminoacid, is a major fuel for the dynamic intestinal cell population. Alanyl-glutamine (Ala-gln) is a dipeptide that is highly soluble and well tolerated. **Aim:** Analyze the changes induced by *Clostridium difficile* toxin A (TcdA) in intestinal epithelial cell morphology and cytoskeletal element and the effect of Gln and Ala-Gln treatment, using advanced microscopic techniques. **Methods:** We used two intestinal cell lines: IEC-6, undifferentiated rat intestinal epithelial cells, and HCT-8, differentiated human colon adenocarcinoma cells. We evaluated cell morphology using Atomic Force Microscopy (AFM) and Scanning Electron Microscopy (SEM). Cell proliferation was assessed using WST-1 colorimetric assay. Cytoskeleton, was evaluated by Confocal Microscopy for F-actin. **Results:** As observed by AFM and SEM, TcdA caused intense cell shrinkage with multiple extensions. This change in shape was associated with collapse of the F-actin cytoskeleton demonstrated by confocal microscopy. The AFM, showed complete disruption of nucleus, decreased cell volume and area and increased cell height by 79%, 66.2% and 58.9%, respectively, compared to control group. Both Gln and Ala-Gln partially prevented cell shrinkage, changes in cell volume, area and height and cytoskeleton disorganization. TcdA caused a reduction of 6.8% and 8.4% on cell proliferation at 24 and 48h, respectively. Ala-Gln and Gln supplementation significantly increased cell proliferation. **Conclusion:** We demonstrated that TcdA dramatically altered the intestinal cell morphology and cytoskeleton organization and that Ala-Gln and Gln supplementation consistently prevented the intestinal epithelial cell damage induced by TcdA. Our findings provide rationale for the potential use of Ala-Gln and Gln as adjuvant therapy in *Clostridium difficile* enteritis. Investigation of morphological and cytoskeletal

changes using advanced microscopic techniques may aid in the evaluation of the protective or therapeutic activity of drugs against TcdA effects.

1. Background

The gram-positive bacillus, *Clostridium difficile* (*C. difficile*), is considered the most frequent cause of diarrhea associated with the use of antibiotics in industrialized countries. The infection caused by *C. difficile* is considered a major problem among hospitalized patients exposed to long-term antibiotic treatment (more recently related to fluoroquinolone exposure) resulting in increased morbidity, mortality and length of hospitalization [1,4].

Since 2000, reported cases of *Clostridium difficile* infection (CDI) in US hospitalized patients have steadily increased [5]. Other countries, notably Canada and European Union members, have experienced similar increases [6]. Compounding these alarming increases in reported disease incidence is a parallel increase in disease severity and, hence, case-fatality rates [6,10].

The clinical manifestations of CDI range from asymptomatic colonization to severe diarrhea, pseudomembranous colitis, toxic megacolon and death. These complications were associated with an age over 65 years, renal failure and severe immunosuppression. In Canada, the proportion of patients dying within 30 days after diagnosis increased from 4.7% in 1991 to 1992 to 13.8% in 2003 [11]. The increase in incidence and severity of CDI has been related to the emergence of a more virulent strain-NAP1/B1/027, which produces elevated quantities of A toxin (TcdA) and B Toxin (TcdB), and carries as well a Binary Toxin (CDT)[12].

TcdA and TcdB have glucuronyltransferase activity and lead to disaggregation of actin by inactivation of Rho [13,14]. Cell rounding caused by TcdA can be explained by the monoglucosylation of Rho, Cdc42 and Rac, which inhibits the Rho family proteins role in the formation of actin filaments, leading to cellular restrain, loss of adhesion and cell rounding [15-18]. Nam et al (2010) demonstrated that TcdA causes microtubule depolymerization by tubulin deacetylation through activation of HDA6, which is involved in cytokine production, alpha-tubulin deacetylation and mucosal damage[19]. TcdA also causes intestinal secretion, intense destruction of the mucosa, hemorrhage, and accentuated inflammation with neutrophil infiltration and production of inflammatory cytokines such as TNF- α e IL1- β [20,21]. Additionally, TcdA induces cellular rearrangement of actin cytoskeleton into aggregates and increases secondary adhesion, by inducing Mac-1 expression in human

neutrophils. Such events could be associated with the formation of pseudomembranes [22,23].

Glutamine (Gln) is the major respiratory fuel for the intestinal epithelium, since it is a precursor for nucleotide biosynthesis and, therefore, a critical requirement for the dynamic proliferating intestinal cell population. However, glutamine has limited solubility and a tendency to hydrolyze to potentially toxic glutamate. It has been demonstrated that alanyl-glutamine is stable, highly soluble, well tolerated, and at least as effective in driving sodium cotransport and intestinal injury repair *in vitro* [23-26] in animals [27] and in patients[28]. Glutamine supplementation influences inflammatory response, oxidative stress, apoptosis modulation and the integrity of gut barrier [28]. Carneiro et al. (2006), demonstrated that Gln and Ala-Gln significantly reduced the intestinal damage caused by TcdA in rabbit ileal loops and the amount of intestinal epithelial cell apoptosis [25]. Similarly, Gln and Ala-Gln have also been shown to repair intestinal mucosal injury from 5-FU[26].

In this study we evaluated the effects of glutamine or alanyl-glutamine supplementation on intestinal epithelial cell injury induced by TcdA using a morphological approach.

2. Methods

2.1 Reagents, drugs and toxin

Trypsin, Dulbecco's modified Eagle media (DMEM), fetal bovine serum (FBS), RPMI media, penicillin-streptomycin, sodium pyruvate and antibiotic antimyotic solution were obtained from either Gibco BRL (Grand Island, NY) or Invitrogen (Carlsbad, CA). Gln, Ala-Gln, TcdA of *C. difficile* (c3977), tetrazolium salt WST-1 (4-[3-(4-iodophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1-3-benzene disulfonate) and bovine insulin were obtained from Sigma (St. Louis, MO).

2.2 Cell culture

Rat intestinal jejunal crypt cells (IEC-6, passages 10-24) and the human colonic adenocarcinoma cells (HCT-8) were purchased from American Type Culture Collection (Rockville, MD) and cultured at 37°C in a 5% CO₂ incubator. For the HCT8 cells, the maintenance cell media was RPMI media (Gibco BRL, Grand Island, NY) supplemented with 10% FBS and 50µg/ml of penicillin-streptomycin (Gibco BRL, Grand Island, NY) and a final concentration of 1mM of sodium pyruvate. When 90-95% confluency, cells were trypsinized

with 0.25% EDTA trypsin. Cells were cultivated in 75cm² flasks and media was changed twice a week. For IEC-6 cells, the maintenance cell medium was DMEM (Gibco BRL, Grand Island, NY) supplemented 5% FBS, 5mg bovine insulin, 50 µg/mL of penicillin/streptomycin (Gibco BRL, Grand Island, NY) and a final concentration of 1mM of sodium pyruvate. The medium was changed thrice a week, according to standard culture protocols [25,30].

2.3 Atomic force microscopy

For atomic force microscopy (AFM), 12 well cell culture plates, with 13 mm diameter glass coverslips, were seeded with 6.25×10^4 IEC-6 cells and grown for 24 h in standard DMEM media (which contains Gln). Wells were washed and incubated for 24h with TcdA (10ng/mL) in DMEM without Gln or supplemented with 10mM of Ala-Gln or 10mM of Gln. Afterwards, cells were fixed to glass coverslips in 4% formaldehyde solution for 14 h. For the imaging process, the samples were air-dried for 5 min, placed on steel sample disks covered with doublesided adhesive tape and carried off to Multimode Atomic Force Microscope (Digital Instruments – Santa Barbara, CA) equipped with a Nanoscope IIIa controller [31]. Scans were performed in air and all topography images were acquired by tapping mode using silicon crystal cantilevers (Veeco-probes) with a spring constant of approximately 40 N/m and tip radius of 15 nm. The AFM height data was represented as a distinct height value of the sample in a finite number of pixels (512 x 512 point scan) [32]. The clearest regions indicate the highest area, which in the control cell indicates the localization of the nucleus. All topography images were performed with a Nanoscope IIIa controller and Nanoscope software, (Digital Instruments – California, USA) at room temperature. The area, height and volume of the cells were calculated using Nanoscope 5.30 R3.SR3 [33,34].

2.4 Scanning electron microscopy

Twelve well cell culture plates, with 13 mm diameter glass coverslips, were seeded with 6.25×10^4 IEC-6 cells and grown for 24 h in standard DMEM media (which contains 4mM of Gln). Afterwards, the wells were washed and incubated for 24h with TcdA (10ng/mL) in DMEM without Gln or supplemented with 10mM of Ala-Gln or 10mM of Gln. Cells were then fixed in 4% formaldehyde for 14 h. For imaging, the samples were fixed to samples holders with carbon adhesive tape and sputtered with a 15 nm gold-layer (BALTEC MED 020 coating system) and transferred into the scanning electron microscope (TESCAN VEGA-XMU) [35,36].

2.5 Confocal microscopy

Four well slide chambers were seeded with HCT-8 cells at 4×10^4 cells/well in standard RPMI medium. After 48h, approximately 50-70% confluency was reached and wells were incubated in Gln-free RPMI media containing *C. difficile* TcdA at 10ng/mL, with or without 10mM of Ala-Gln or 10mM of Gln. As control groups, wells were incubated in Gln-free RPMI media with or without 10mM of Ala-Gln or 10mM of Gln. After 24h of exposure, HCT-8 cell monolayers were carefully washed twice in PBS, fixed for 20 min in 4.0% ultrapure paraformaldehyde, again washed in PBS and permeabilized for 10 min in 0.1% Triton X-100 at room temperature, and washed in PBS. Afterwards, wells were incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC)-phalloidin at 5 μ g/mL for 30min in a dark chamber, washed in PBS, and incubated with 4,969-diamidino-2-phenylindole dilactatem (DAPI) at 5 mg/ml for 5 min. Monolayers were then washed again in PBS and postfixed with 4% ultrapure paraformaldehyde and mounted using an anti-fading mounting media. Flourescent microscopy was performed using an inverted ZEISS LSM 510 UV confocal microscope with a ZEISS Plan Neofluor 40x/1.3 objective, available at the University of Virginia Advanced Microscopy Facility [35,36]. Cytoplasm elements were examined in a blinded fashion for overall disruption, morphology and orientation [37]. We evaluated as actin integrity in HCT8 cells several criteria as follows: disruption of actin cortex, fragmentation, kinking, or detachment from membrane areas.

2.6 WST-1 cell proliferation assay

Intestinal cell proliferation was evaluated using the tetrazolium salt WST-1 (4-[3-(4-iodophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1-3-benzene disulfonate), which measures proliferation indirectly, according to the manufacturer recommendations. HCT8 cells were seeded in 96-well plates at 4×10^3 cells/well in 100 μ L of RPMI media and allowed to attach for 48 hours. Afterwards, wells were washed with RPMI media without Gln and incubated for 24 and 48h with TcdA 10ng/mL, diluted in RPMI media without Gln, supplemented or not with 10mM Gln or 10mM Ala-Gln. As for controls, wells were incubated with RPMI media without Gln or supplemented with 10mM of Gln or Ala-Gln. After 24 or 48 hours, wells were incubated for 4 h with 10uL of the tetrazolium salt and the absorbance was measured using an ELISA microplate reader at 450nm (reference range 420-480 nm). Mitochondrial enzymes in viable cells cleave tetrazolium salts to formazan, changing the media's color. An increase in cell proliferation, and therefore of viable cells will result in an increase of the concentration of formazan dye that is detected using an ELISA reader [25,30].

3. Results

3.1 Effect of Tcd A on IEC-6 morphology and the effect of Gln and Ala-Gln treatment on cellular dimensions as evaluated through AFM

IEC-6 cells grown in normal media alone displayed well-preserved cytoplasm, nucleus and nucleoli (Figure 1 A and B). Treatment with the TcdA caused shrinking and compression of cytoplasmic material around the nucleus, blurring of the nuclear membrane and condensation of nuclear elements (Figure 1 C and D). Multiple vestigial filamentous extensions around the pyknotic cell were observed. In the presence of TcdA, the nucleus height of a representative IEC-6 cell was increased to 4000nm (Figure 1 C and D), compared to 2000nm in the control group (Figure 1 A and B). Visualization of the nucleus by AFM at higher magnification showed unchallenged IEC-6 cell nucleus to have well defined nuclear envelope and prominent nucleoli (Figure 2 A and B). The TcdA challenged cell had complete disruption of the nuclear envelope, condensation of chromatin and loss of the nucleolar apparatus (Figure 2 C and D). Measurement of cellular dimensions revealed TcdA-challenged IEC6 cells to have a 58.9% increase in cell height (Figure 3 E), which may indicate deposition of cytoplasmic material on the nuclear region. However, cell area and cell volume were noted to be decreased by 66.2% and 79%, respectively, compared to control (Figure 3 F and G)($P < 0.05$). Supplementation with 10mM of Gln caused an increase of 46.3% and 67.6% in cell volume and area, respectively, and a reduction of 46.3% in the cell height in relation to the group treated with TcdA ($p < 0.05$; Figure 3). Supplementation with 10mM of Ala-Gln significantly increased cell volume and area by 92.9% and 65.4%, respectively, and decreased cell height by 16.9% ($p < 0.05$ compared to TcdA-treated group).

3.2 Effect of TcdA on rat intestinal epithelial cell (IEC-6) morphology and the prevention of injury by Gln and Ala-Gln through SEM

Consistent with AFM findings, SEM also demonstrated shrinkage of IEC-6 cells in the presence of TcdA. Again, only few thin cytoplasmic extensions or projections around the pyknotic body are left compared to the plump appearance of healthy cells in the absence of TcdA (Figure 4 B). The cells treated with TcdA in medium contain 10mM of Ala-Gln, (Figure 4 C) or Gln (Figure 4 D) showed partial preservation of cell morphology displaying a “pancake like” shape similar to control cell incubated in medium without TcdA (Figure 4 A).

3.3 Effect of TcdA, Gln and Ala-Gln on cell proliferation.

Treatment with TcdA at 10ng/mL reduced cell proliferation by 6.8% after 24h ($p=0.06$, compared to control group) and by 8.4% after 48h ($p=0.01$, compared to control group). Supplementation with 10mM of Gln significantly increased cell proliferation at 48h (increase of 12.7% compared to TcdA group; $P<0.05$) but not at 24h (increase of 9.3%; $P=0.07$). Supplementation with 10mM of Ala-Gln significantly increased cell proliferation at both 24h and 48h (increase of 14.4% and 13.2%, respectively, compared to TcdA group; $P<0.05$). Supplementation with 10mM Gln alone (without TcdA treatment) significantly increased cell proliferation at both 24 and 48h (increase of 18.9% and of 6.02%, compared to control group; $P<0.05$, by student's unpaired t test). Supplementation with 10mM Ala-Gln alone significantly increased cell proliferation at both 24 and 48h (increase of 18.3% and of 5.3%, compared to control group; $P<0.05$, by student's unpaired t test)

3.4 Effect of Gln, Ala-Gln and TcdA on the distribution of F-actin fibers as evaluated through confocal microscopy.

As demonstrated in Figure 6, incubation with TcdA for 24h caused change in F-actin distribution causing cytoskeleton collapse seen as clearing around the nucleus of the IEC6 cells in the monolayer. In addition, TcdA treated cells show decreased staining of actin filaments beyond the plasma membrane. The control cell monolayer (incubated in media without Gln) showed more homogeneous actin distribution with actin bundles attached to the plasma membrane. Additionally, as seen with DAPI staining, TcdA caused some nuclear fading and some nuclear pyknosis. Supplementation with both Gln and Ala-Gln partially reverted the changes described in cells treated with TcdA alone, showing preservation of F-actin cytoskeleton and a more organized intracellular actin network. In addition, in both Ala-Gln and Gln treated cells mitosis was observed as indication of increased proliferation. In cells not treated with TcdA, supplementation with 10mM of Ala-Gln and Gln showed robust and organized intracellular actin network (images not shown).

4. Discussion

We have shown that TcdA causes significant cell changes in intestinal epithelial cell morphology as assessed by different microscopic approaches. AFM was able to demonstrate quantitative decreases in cell volume and area together with increases in height, suggesting shrinkage of the cell associated with a possible aggregation of cellular material at polar aspects of the nucleus. In addition, TcdA caused disruption of the nuclear envelope and chromatin condensation as early as after 1h of incubation. Most of these morphological changes were confirmed by SEM. Likewise, demonstrated disruption of cytoskeleton,

observed by confocal microscopy, and reduction of cell proliferation were confirmed in this study.

Review of literature has revealed a close relationship between cell morphology and function. The organization of the cytoskeleton with its rapid assembly and disassembly has important role in motility, guidance and adhesion of cells [38]. In colonic epithelial cells involved in maintaining the barrier function, cytoskeletal disruption may damage tight junctions and cause failure of focal contact formation, possibly leading to large scale exposure of luminal pathogens to immune cells in the lamina propria [39,40]. In addition, the morphological feature showed here suggest cell death by apoptosis, as reported previously [23-25], which could contribute to the disruption of intestinal epithelial barrier leading to the severe inflammatory response seen in response to *C. difficile* infection.

It is well known that TcdA induces monoglucosylation of Rho, Rac, and Cdc42 at threonine 37 preventing Rho family proteins from participating in the formation of actin filaments [41]. This mechanism is believed to be the main cause for the cell morphological changes induced by TcdA, which can be a consequence of the cytoskeleton collapse as seen by confocal microscopy. Rho glucosylation results in the disappearance of actin cables, peripheral membrane ruffling, filopodial extensions, and the disorganization of focal complexes, and ultimately resulting in complete loss of cell shape, i.e. cell rounding [42,43].

Nam et al. (2010) gave new insight to the mechanisms involved in the rapid cell rounding induced by TcdA [19]. Their group demonstrated that in addition to the known role of inactivation of Rho family proteins in actin disaggregation, TcdA induces tubulin deacetylation and microtubule depolymerization through HDAC6 cytosolic tubulin deacetylase. Microtubule instability is critical to cell shape [44], cell movement [45], intracellular transport of organelles [46], and the separation of chromosomes during mitosis [42] which could explain the decreased proliferation induced by TcdA showed here.

Altogether, high resolution advanced microscopic techniques such as confocal laser fluorescence microscopy, atomic force microscopy and scanning electron microscopy are capable of providing detailed morphological features and cytoskeletal information. In particular, AFM, besides its high resolution capabilities, provides advantage over traditional microscopic techniques because it is not restricted to cell morphology, cytoskeletal elements, or organelles, but also provides quantitative information on cell volume and height, which made possible not only the demonstration of the severe cytotoxicity of TcdA in rat and human intestinal epithelial cells, but also the protective effect of Gln and Aln-Gln.

In the present study we also provided evidence that Gln and Ala-Gln supplementation partially reversed intestinal epithelial morphological changes induced by TcdA. These findings are in accordance with previous studies which showed that Gln and Ala-Gln prevented the inhibition of cell migration, apoptosis and the initial drop in transepithelial resistance induced by TcdA [23]. These effects may be explained by the partial preservation of the cytoskeleton as visualized here by confocal microscopy. Furthermore, Gln and Ala-Gln have been reported previously to inhibit the apoptosis of T84 cells by preventing caspase 8 activation and to reduce TcdA-induced intestinal secretion and epithelial disruption [25]. Since cytoskeleton is involved in separation of chromosomes during mitosis it is not surprising that its preservation by the micronutrients leads to increased proliferation even in the presence of TcdA.

To the best of our knowledge this is the first study conducted evaluating the effect of *C. difficile* toxins and Ala-Gln and Gln treatment on cell morphology using AFM. These AFM images substantiate the confocal study of the effect of TcdA on intestinal epithelial cell lines. Moreover, the aberration in intestinal epithelial cell morphology and actin filament organization mediated by TcdA may, at least, partially account for the severe intestinal mucosal disruption found in *C. difficile* induced disease.

5. Conclusion

In summary, the present study showed that TcdA induced morphological alterations through disaggregation of actin cytoskeleton in intestinal epithelial cells. Gln and Ala-Gln reversed the injury caused by TcdA, reducing changes in cell morphology and increasing cell proliferation which reinforces the potential of these nutrients as adjuvant therapeutic intervention in *C. difficile* enteritis. Analysis of morphological features by advanced microscopic techniques along with intracellular signaling molecules can provide additional platform for evaluating the effect of *C. difficile* toxins or other toxins and their treatment on intestinal epithelial cells. However, the precise mechanisms behind these effects need further investigation.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

AAQAS: Participated in the conduct of experiments and data analysis and drafted the manuscript. MBBN: Participated in the conduct of experiments, data analysis and drafting of the manuscript. MRO: Participated in the AFM experiments and data analysis. RSF: Participated in the experiments, critical reviewing and study design. EBB: Participated in the study design and critical reviewing. TMS: Participated in the experiments and review of the manuscript. LMR: Participated in the AFM experiments and critical reviewing. CAW: Participated in the confocal experiments and critical review of the manuscript. AAML: Participated in the experiment design and critical reviewing. GACB: Participated in overall coordination, conception of the study, experimental design, critical reviewing and writing. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES). We gratefully acknowledge the technical assistance of Maria Silvandira and Socorro. MBBN was partially supported by NIH/Fogarty International Center Global Infectious Disease Research Training grant **D43 TW0006578**.

References

1. Gaynes R, Rimland D, Killum E, Lowery HK, Johnson TM^{2nd}, Killgore G, Tenover FC: **Outbreak of *Clostridium difficile* infection in a long-term care facility: association with gatifloxacin use.** *Clin infect Dis.* 2004 1; **38**(5):640-645.
2. Muto CA, Pokriwka M, Shutt K, Mendelsohn AB, Nouri K, Posey K, Roberts T, Croyle K, Kristofiak S, Patel-Browns S, Pasculle AW, Panterson DL, Saul M, Harrison LH: **A large outbreak of *Clostridium difficile*-associated disease with an unexpected proportion of deaths and colectomies at a teaching hospital following increased fluoroquinolone use.** *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2005;**26**(3):273-280.

3. Blossom DB, McDonald LC: **The challenges posed by reemerging *Clostridium difficile* infection.** *Emerg Infect Dis.* 2007 **45**:222-227.
4. Ananthakrishnan AN, Issa M, Binion DG: ***Clostridium difficile* and inflammatory bowel disease.** *Med Clin N Am* 2010 **94**: 135-153.
5. McDonald LC, Owings M, Jernigan DB. ***Clostridium difficile* infection in patients discharged from US short-stay hospitals, 1996 to 2003.** *Emerg Infect Dis.* 2006; **12**(3):409-415.
6. Pépin J, Saheb N, Coulombe MA, Alary ME, Corriveau MP, Authier S, Leblanc M, Rivard G, Bettez M, Primeau V, Nguyen M, Jacobl CE, Lanthier L. **Emergence of fluoroquinolones as the predominant risk factor for *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a cohort study during an epidemic in Quebec.** *Clin Infect Dis.* 2005; **41**(9):1254-1260.
7. Pépin J, Valiquette L, Alary ME, Villemure P, Pelletier A, Forget K, Pépin K, Chouinard D. ***Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity.** *CMAJ.* 2004; **31**;171(5):466-472.
8. Loo VG, Poirier L, Miller MA, Oughton M, Libman MD, Michaud S, Bourgault AM, Nguyen T, Frenette C, Kelly M, Vibien A, Brassard P, Fenn S, Dewar K, Hudson TJ, Horn R, René P, Monczak Y, Dascal A. **A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality.** *N Engl J Med.* 2005;**353**(23):2442-9.
9. McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, Owens RC Jr, Kazakova SV, Sambol SP, Johnson S, Gerding DN. **An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*.** *N Engl J Med.* 2005;**353**(23):2433-41.
10. Kelly CP: **A 76-year-old man with recurrent *Clostridium difficile*-associated Diarrhea.** *JAMA.* 2009 **4**:301(9):954-62

11. Freeman J, Bauer MP, Baines SD, Corver J, Fawley WN, Goorhuis B, Kuijper EJ, Wilcox MH: **The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections.** *Clinical Microbiology reviews.* 2010 **23**(3): 529-549.
12. McGuire T, Dobesh P, Klepser D, Rupp M, Olsen K : **Clinically important interaction between statin drug and *Clostridium difficile* toxin?** *Med Hypotheses* 2009, **73**(6):1045-7
13. Riegler M, Sedivy R, Pothoulakis C, Hamilton G, Zacherl J, Bischof G, Cosentini E, Feil W, Schiessel R, LaMont JT: ***Clostridium difficile* toxin B is more potent than toxin A in damaging human colonic epithelium in vitro.** *J Clin Invest.* 1995 **5**:2004-2011.
14. Castagliuolo I, Kelly CP, Qiu BS, Nikulasson ST, LaMont JT, Pothoulakis C: **IL-11 inhibits *Clostridium difficile* toxin A enterotoxicity in rat ileum.** *Am J Physiol.* 1997,**273** (2 Pt 1):G333-341.
15. Sauerbonn M, Leukel P, Eicheil-Streiber C: **The C-terminal ligand-binding domain of *Clostridium difficile* toxin A (TcdA) abrogates TcdA-specific binding to cell and prevents, mouse lethality.** *FEMS Microbiol Lett.* 2006, 1;**155**(1):45-54
16. Drudy D, Fanning S, Kine L: **Toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile*.** *International journal of infectious diseases* 2007,**11**:5-10.
17. Genth H, Dreger SC, Huelsenbeck J, Just I: ***Clostridium difficile* toxin: More than mere inhibitors of Rho proteins.** *The international journal of biochemistry & cell biology* 2008, **40**: 592-597.
18. Kim H, Rhee SH, Pothoulakis C, LaMont JT: ***Clostridium difficile* toxin A binds colonocyte Src causing dephosphorylation of focal adhesion kinase and paxillin.** *Experimental cell research* 2009,**315**: 3336-3344.
19. Nam H J, Kang JK, Kim SK, Ahn KJ, Seok H, Park J, Chang JS, Pothoulakis C, Lamont JT, Kim H: ***Clostridium difficile* Toxin A Decreases Acetylation of Tubulin, Leading to Microtubule Depolymerization through Activation of**

- Histone Deacetylase 6, and This Mediates Acute Inflammation.** *The Journal of Biological Chemistry.* 2010, **285**(43): 32888–32896.
20. Brito GAC, Souza MHL, Melo-filho AA, Hewlett EL, Lima AAM, Flores CA, Ribeiro AR : **Role of pertussis toxin A subunit in neutrophil migration and vascular permeability.** *Infections and Immunity.* 1997,**65**(3): 1114-1118.
21. Weiss K: **Toxin-binding treatment for *Clostridium difficile*: a review reports of studies with tolevamer.** *Int J Antimicrob Agents* .2009, **33**(1): 4-7.
22. Brito GA, Fujji J, Carneiro –Filho B, Lima AA, Obrig T, Guerrant RL: **Mechanism of *Clostridium Difficile* toxin A – induced apoptosis in T84 cell.** *J. Infect. Dis.* 2002a, **186**(10): 1438-1447.
23. Brito GA, Oriá RB, Lima AA, Guerrant RL, Carneiro–Filho B, Destura RV : ***Clostridium difficile* toxin A induces intestinal epithelial cell apoptosis and damage: role of Gln and Ala-Gln in toxin A effects.** *Dig. Dis. Sci.* 2005, **50**(7): 1271-1278
24. Brito GA, Sullivan GW, Ciesla WP Jr, Carper HT, Mandell GL, Guerrant RL. ***Clostridium difficile* toxin A alters in vitro-adherent neutrophil morphology and function.** *J Infect Dis.* 2002 May 1;185(9):1297-306.
25. Carneiro–Filho BA, Fujji J, Brito GA, Alcantara C, Oriá RB, Lima AA, Obrig T, Guerrant RL: **Caspase and bid involvement in *Clostridium difficile* toxin A - induced apoptosis and modulation of toxin A effects by glutamine and alanyl-glutamine in vivo and vitro.** *Infect. Immun.* 2006,**74**(1): 81-87.
26. Braga-Neto MB, Oriá RB, Warren CA, Monteiro MS, Maciel AA, Brito GA, Lima AA, Guerrant RL: **Alanyl-glutamine supplementation improves 5-fluorouracil-induced intestinal epithelial damage in vitro.** *Dig Dis Sci* 2008,**53**:2687-2696.
27. Carneiro –Filho BA, Oriá RB, Wood RK, Brito GA, Fujji J, Obrig T, Lima AA, Guerrant RL: **Alanyl-glutamine hasten morphologic recovery from 5-fluorouracil-induced mucositis in mice.** *Nutrition.* 2004,**20**(10): 3934-3941.

28. Oliveira GP, Dias CM, Pelosi P, Rocco PRM: **Understanding the mechanism of glutamine action in critically ill patients.** *An Acad Bras Cienc.*2010.**82**(2):417-430.
29. Perng W, Huang K, Li M, Hsu C, Tsai S, Chu S, Chang D: **Glutamine attenuates hiperoxia-induced acute lung injury in mice.** *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2010, **37**(1):56-61.
30. Maciel AAFL, Oriá RB, Braga-neto MB, Braga AB, Carvalho EB, Lucena HBM, Brito GAC, Guerrant RL, Lima AAM: **Role of retinol in protecting epithelial cell damage induced by *Clostridium difficile* toxin A.** *Toxicon.* 2007, **50**: 1027-1040.
31. Santos RP, Arruda TTP, Carvalho CBM, Carneiro VA, Braga LQV, Texeira EH, Arruda FVS, Cavada BS, Havt A, Oliveira TM, Bezerra GA, Freire VN: **Correlation between enterococcus faecalis biofilms development stage and quantitative surface roughness using atomic force microscopy.** *Microscopy and microanalysis.* 2008.**14**:150-158.
32. Fung CKM, Seiffer-Sinha K, Lai KWC, Yang R, Panyard D, Zhang J, Xi N, Sinha AA: **Investigation of human keratinocyte cell adhesion using atomic force microscopy.** *Nanomedicine:NBM* 2010, **6**:191-200.
33. Jandt KD: **Developments and perspectives of scanning probe microscopy (SPM) on organic materials.** *Materials Science and Engineering R.: Reports, Lausanne,* 1998, **21**:221-295.
34. Quirino CS, Leite GO, Rebelo LM, Tomé AR, Costa JGM, Cardoso AH, Campos AR: **Healing potential of pequi (*Caryocar coriaceum wittm.*) fruit pulp oil.** *Phytochemistry letters.*2009,**2**:179-183.
35. Heneweer C, Schmidt M, Denker H, Thie M: **Molecular mechanism in uterine epithelium during trophoblast binding: the role of small GTPase RhoA in human uterine ishikawa cells.** *Journal of experimental & Clinical assisted reproduction* 2005, **2**:4.
36. Schwan C, Stecher B, Tzivelekidis T, Ham MV, Rohde M, Hardt W, Wehland J, Aktories K: ***Clostridium difficile* toxin CDT induces formation of microtubule-**

- based protrusions and increases adherence of bacteria. *Plos pathog.* 2009, **5**(10): e1000626.
37. Banan A, Fields JZ, Farhadi A, Talmage DA, Zhang L, Keshavarzian A: **Activation of δ -isoform of protein kinase c is required for oxidant-induced disruption of both the microtubule cytoskeleton and permeability barrier of intestinal epithelia.** *The journal of pharmacology and experimental therapeutics.* 2002, **303**:17-28.
38. Docheva D, Padula D, Popov C, Mutschler W, Clausen-Schaumann H, Schieker M. **Researching into the cellular shape, volume and elasticity of mesenchymal stem cells, osteoblast and osteosarcoma cells by atomic force microscopy.***J. Cell Mol. Med.* 2008, **12**(2):537-552.
39. Kim H, Kokkotou E, Na X, Rhee SH, Moyer MP, Pothoulakis C, Lamont JT. ***Clostridium difficile* toxin A-induced apoptosis in human colonocytes involves p53-dependent-p21(WAF-1/CIP-1) induction via p38 MAP kinase.** *Gastroenterology.* 2005,**129**:1875-1888.
40. Kim H, Rhee SH, Pothoulakis C, Lamont JT. **Inflammation and apoptosis in *Clostridium difficile* enteritis is mediated by PGE2-stimulation of FasL.** *Gastroenterology* 2007,**133**:875-886.
41. Just I, Wil M, Selzer J, Rex G, Von Eichel-Streiber C, Mann M, Aktories K. **The enterotoxin from *Clostridium difficile* (ToxA) monoglucosylates the Rho proteins.** *J Biol Chem.* 1995, **270**(23):13932-6.
42. Fernandez N, Chang Q, Buster DW, Sharp DJ, Ma A. **A model for the regulatory network controlling the dynamics of kinetochore microtubule plus-ends and poleward flux in metaphase.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009,**106**:7846-7851.
43. Castagliuolo I, Riegler M, Nikulasson S, Lu B, Gerard C, Gerard NP, Pothoulakis C, **NK-1 receptor is required in *Clostridium difficile* - induced enteritis.** *J. Clin. Invest.* 1998,**101**:1547-1550.

44. Popova JS, Rasenick MM. **G β γ Mediates the interplay between tubulin dimmers and microtubules in the modulation of Gq signaling.** *J. Bio Chem.* 2003,**278**:34299-34308.
45. Gao J, Huo L, Sun X, Liu M, Li D, Dong JT, Zhou J. **The tumor suppressor CYLD regulates microtubule dynamics and plays a role in cell migration.** *J. Biol. Chem.* 2008, **283**(14):8802-8809.
46. Bicek AD, Tuzel E, Demtchouk A, Uppalapati M, Hancock WO, Kroll DM, Odde D. **Anterograde Microtubule Transport Drives Microtubule Bending in LLC-PK1 Epithelial Cells.** *Mol. Biol. Cell* 2009, **20**:12 2943-2953.

Figures

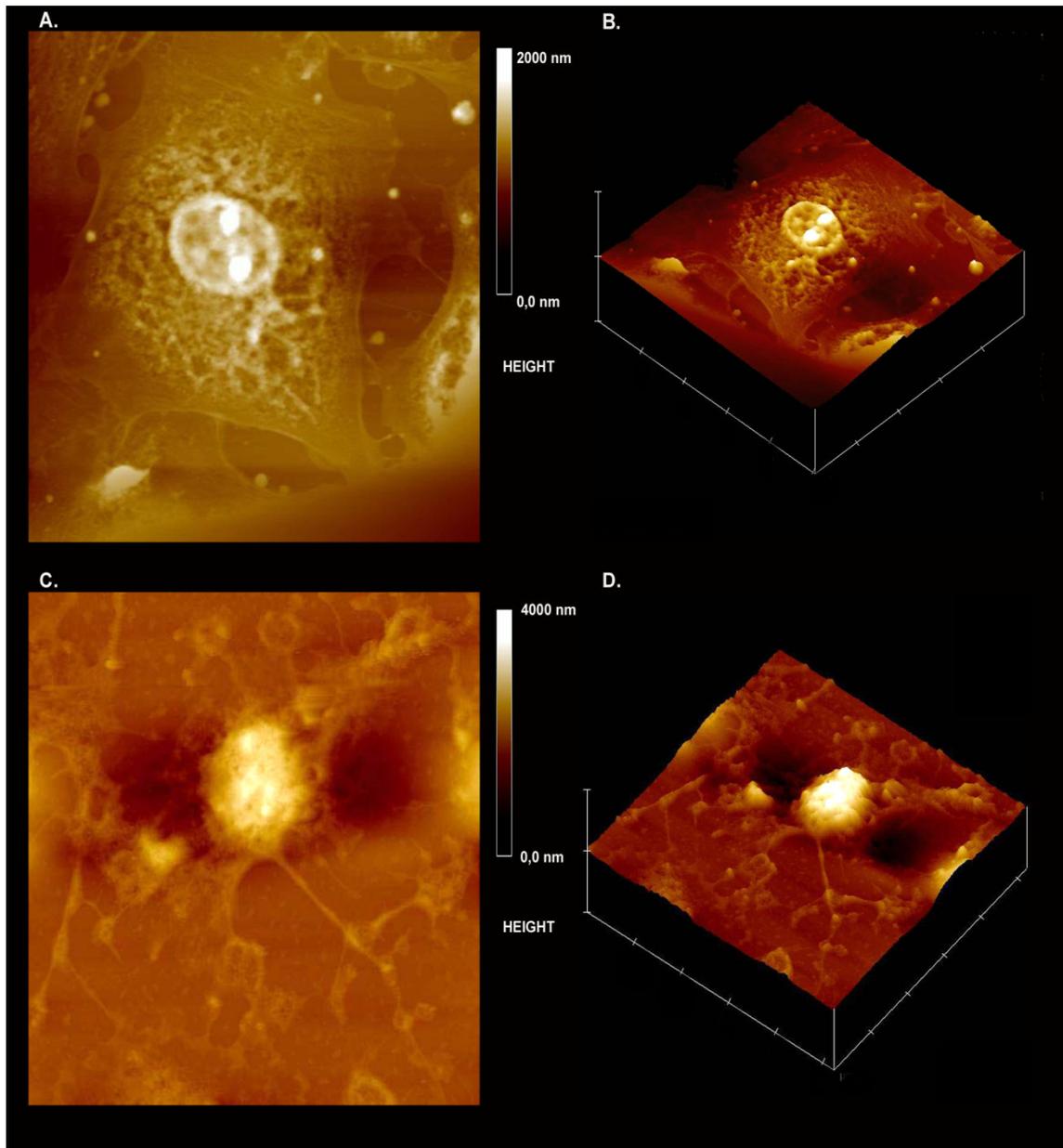


Figure 1: Analysis of the morphological changes caused by TcdA in IEC6 cells. IEC6 cells in the test group were treated with TcdA (100ng/mL) for 1 h. The images were confected with AFM in the contact mode. Control group cell (A) with height scale (color bar): 2000nm. Cell treated with TcdA (B) with height scale (color bar): 4000nm. Images A and B in 3D view (C and D) (scan size 50 x 50 μm^2).

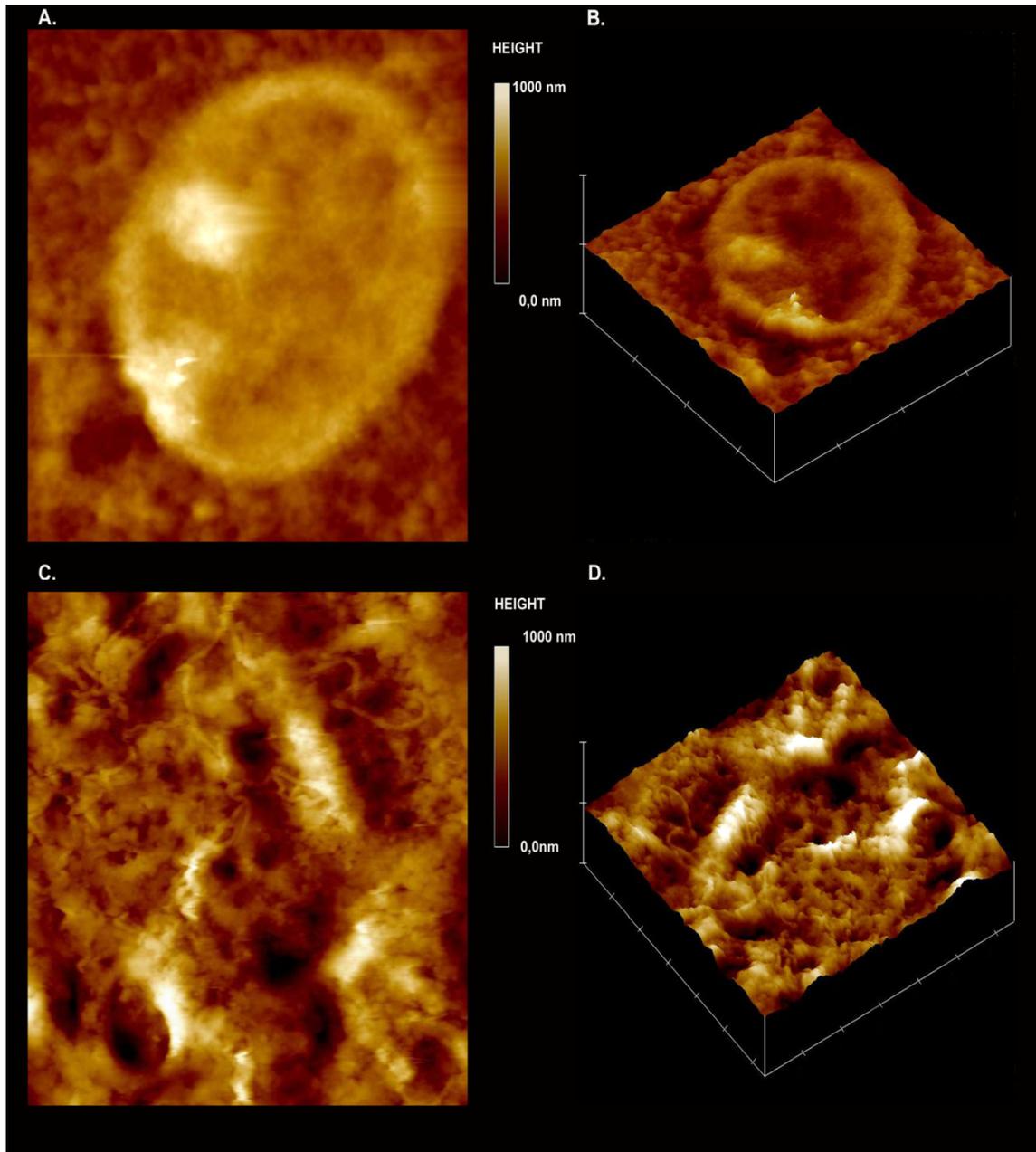


Figure 2: Analysis of the morphological changes caused by TcdA in the cell nucleus. IEC cells in the test group were treated with TcdA (100ng/mL) for 1 h. The images were collected with AFM in the contact mode. Nucleus of a cell from control group (A). Nucleus of a cell treated with TcdA (B). Images A and B in 3D view (C and D). The images were scanned at $15 \times 15 \mu\text{m}^2$ and height scale (color bar): 1000 nm.

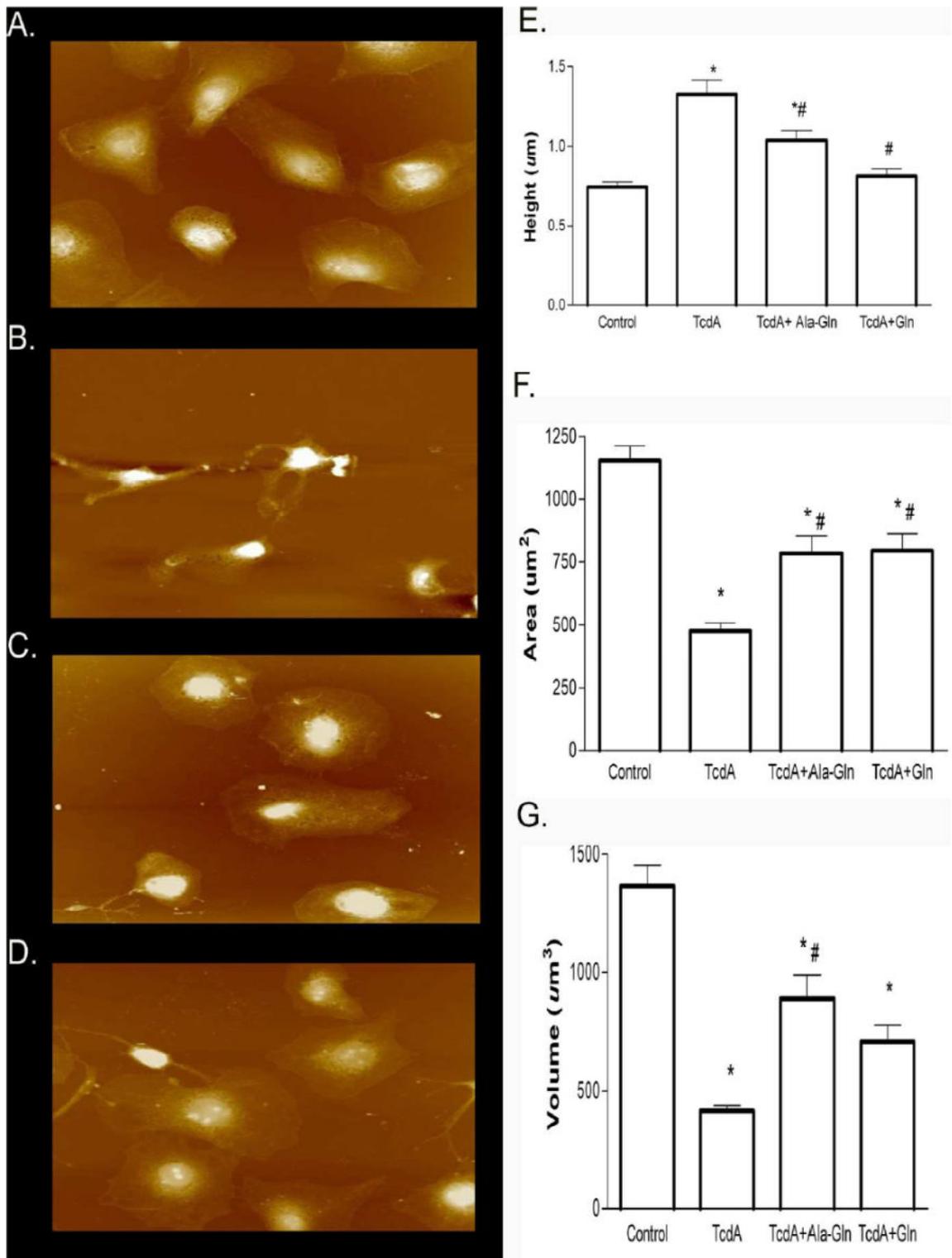


Figure 3: Effect of glutamine and alanyl-glutamine on the altered cell dimensions induced by TcdA. The IEC-6 cells were divided in 4 groups: Control, TcdA (treated with TcdA 10ng/mL for 24h), TcdA + Gln (treated with TcdA 10ng/mL and Gln 10mM for 24h) and TcdA + Ala-Gln (treated with TcdA 10ng/mL and Ala- Gln 10mM for 24h). The images were

confected with AFM in the contact mode. Images were scanned at $150 \times 150 \mu\text{m}^2$. The volume, height and area were calculated with the nanoscope 5.30R3.SR3 software. The height of the IEC-6 cells treated or not with TcdA, supplemented or not with Gln and Ala-Gln (E). The area of the IEC-6 cells treated or not with TcdA, supplemented or not with Gln and Ala-Gln (F). The volume of the IEC-6 cells treated or not with TcdA, supplemented or not with Gln and Ala-Gln (G). * $P < 0.05$ compared to control. # $P < 0.05$ compared to TcdA.

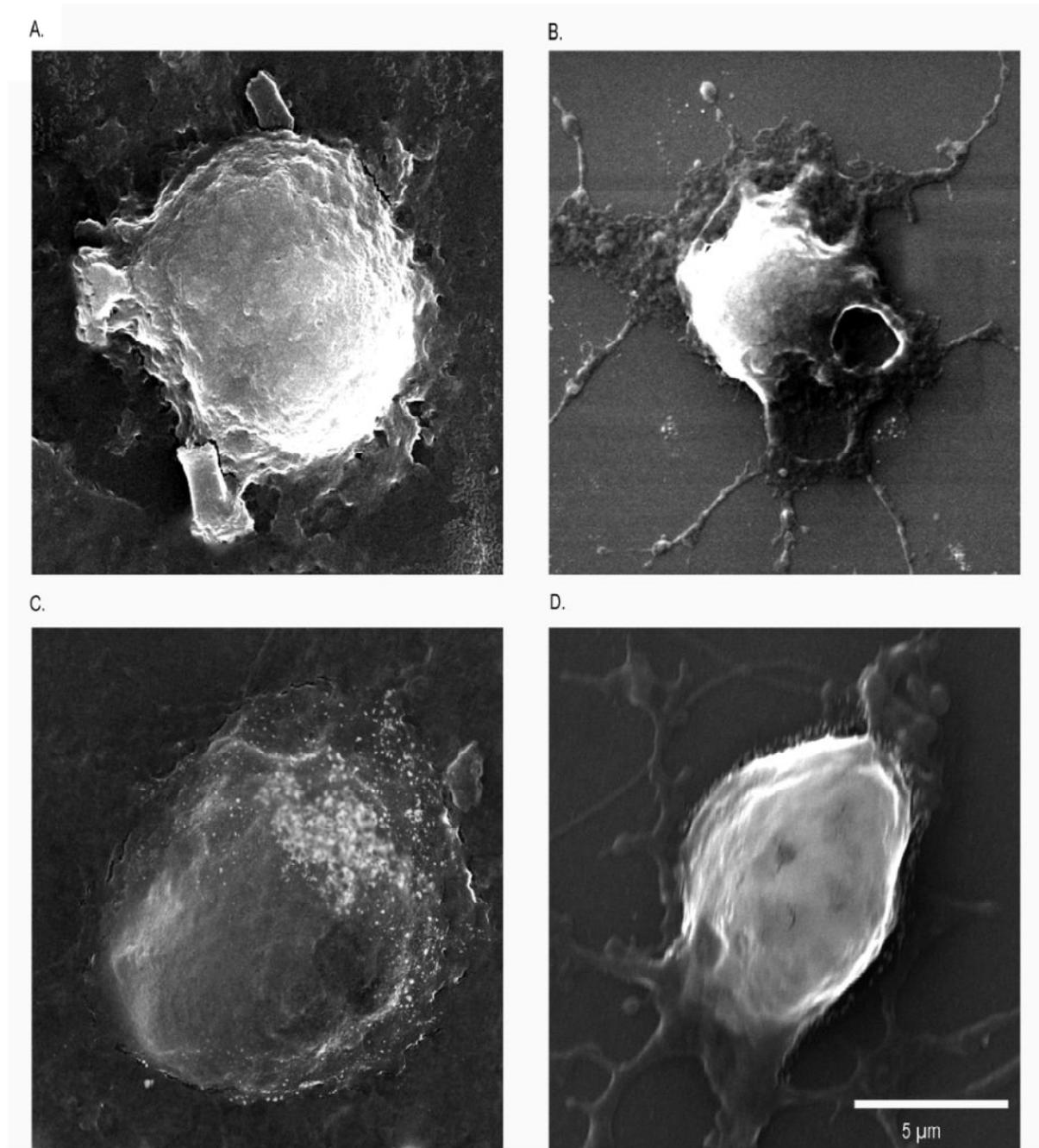


Figure 4: Effect of glutamine and alanyl-glutamine in the morphological damage in IEC6 cells induced by TcdA. The IEC-6 cells were divided in 4 groups: Control (A), TcdA

(treated with TcdA 10ng/mL for 24h) (B), TcdA+Ala-Gln (treated with TcdA 10ng/mL and Ala-Gln 10mM for 24h) (C) and TcdA+Gln (treated with TcdA 10ng/mL and Gln10mM for 24h) (D). The images were confected with SEM, magnification 9.45x and scale bar 5 μ m.

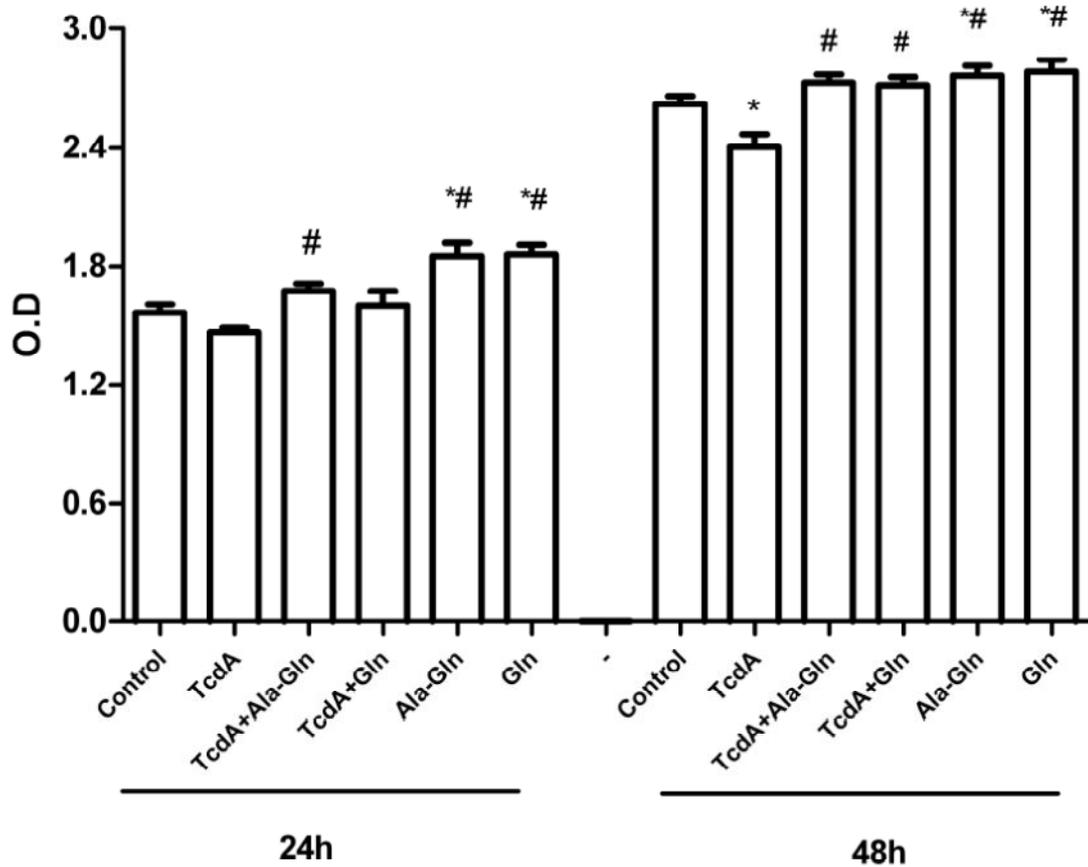


Figure 5: Effect of TcdA, glutamine and alanyl-glutamine on human intestinal cell proliferation. The HCT-8 cells were divided in 6 groups: Control, TcdA (treated with TcdA 10ng/mL), TcdA + Gln (treated with TcdA 10ng/mL and Gln10mM), TcdA + Ala-Gln (treated with TcdA 10ng/mL and Ala-Gln 10mM), Gln 10mM and Ala-Gln 10mM. The cells treated with TcdA and/or Gln or Ala-Gln for 24h and 48h. The WST absorbance was measured using an ELISA microplate reader at 450nm (reference range 420-480 nm). * P<0.05 compared to control. # P<0.05 compared to TcdA.

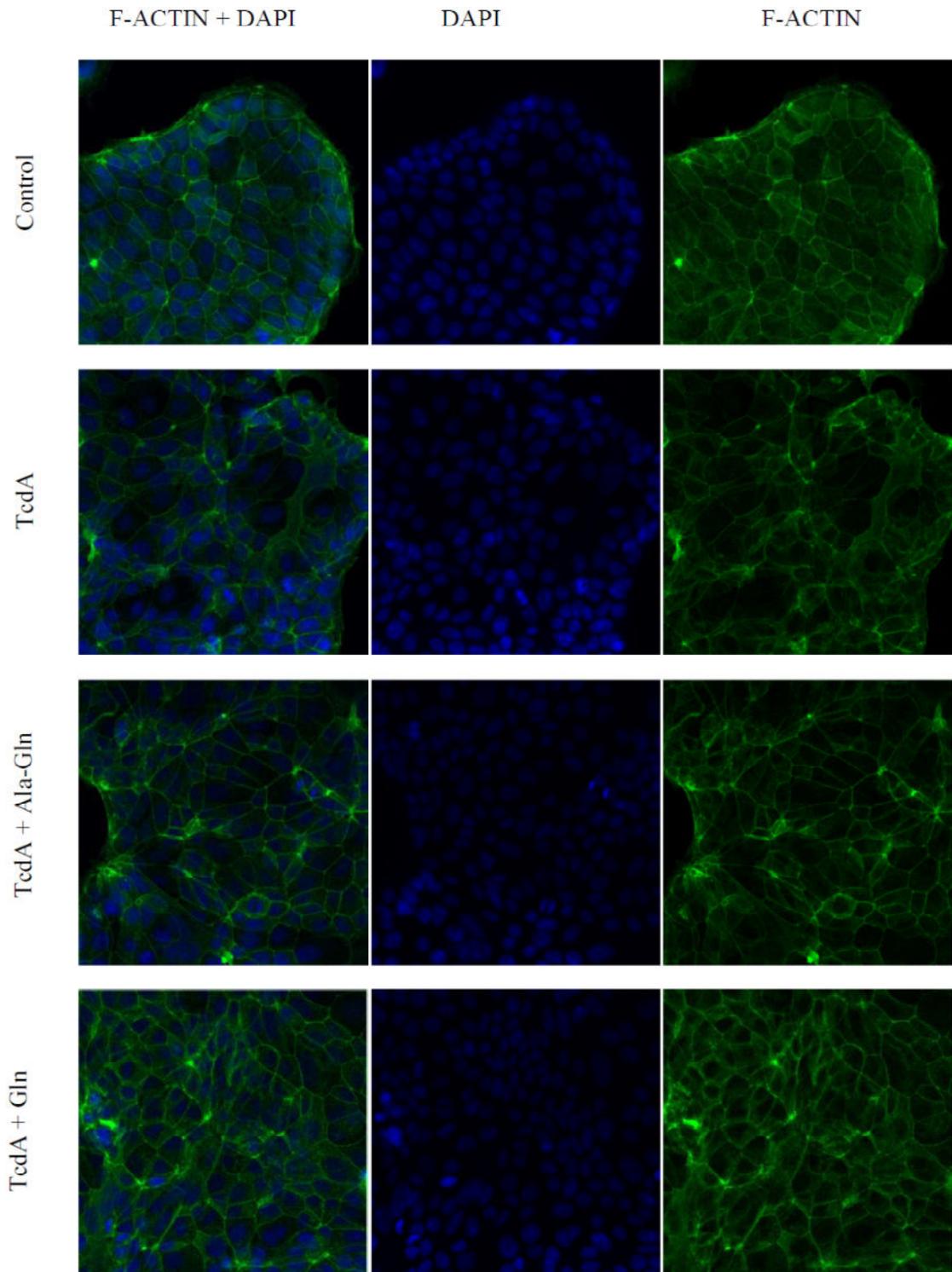


Figure 6: Effect of TcdA on the distribution of f-actin fibers as assessed through confocal microscopy. The HCT-8 cells were divided in 6 groups: Control , TcdA (treated with TcdA 10ng/mL), TcdA + Gln (treated with TcdA 10ng/mL and Gln10mM), TcdA + Ala-Gln (treated with TcdA 10ng/mL and Ala-Gln 10mM), Gln 10mM or Ala-Gln 10mM. The cells

were treated with TcdA, Gln or Aln-Gln for 24h. The cells were incubated with FITC-phalloidin and DAPI.