



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

FRANCISCO MAICK DOS SANTOS MARQUES

**O PAPEL DO PROTEOGLICANO DE SULFATO DE CONDROITINA (CSPG4) NA
INFECÇÃO POR *Clostridiooides difficile* E NA MEDIAÇÃO DOS EFEITOS DAS
TOXINAS A E B NA GLIA ENTÉRICA**

**FORTALEZA
2025**

FRANCISCO MAICK DOS SANTOS MARQUES

**O PAPEL DO PROTEOGLICANO DE SULFATO DE CONDROITINA (CSPG4) NA
INFECÇÃO POR *Clostridiooides difficile* E NA MEDIAÇÃO DOS EFEITOS DAS
TOXINAS A E B NA GLIA ENTÉRICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Ciências Morfológicas. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual.

Orientador: Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão.

FORTALEZA

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Sistema de Bibliotecas

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

M317p Marques, Francisco Maick dos Santos.

O papel do proteoglicano de sulfato de condroitina (CSPG4) na infecção por Clostridioides difficile e na mediação dos efeitos das toxinas A e B na glia entérica / Francisco Maick dos Santos Marques. – 2025.
127 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas, Fortaleza, 2025.

Orientação: Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão.

1. Clostridioides difficile. 2. Sistema nervoso entérico. 3. Proteoglicano de Sulfato de Condroitina. 4. TcdA. 5. TcdB. I. Título.

CDD 611

FRANCISCO MAICK DOS SANTOS MARQUES

**O PAPEL DO PROTEOGLICANO DE SULFATO DE CONDROITINA (CSPG4) NA
INFECÇÃO POR *Clostridoides difficile* E NA MEDIAÇÃO DOS EFEITOS DAS
TOXINAS A E B NA GLIA ENTÉRICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Ciências Morfológicas. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual.

Orientador: Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Cecília Leite Costa
Centro Universitário Unichristus

Profa. Dra. Danielle Abreu Foscetti
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Mariana Lima Vale
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sua infinita bondade e misericórdia. Por me conceder as condições necessárias para correr atrás dos meus sonhos!

Aos meus amados pais, Francisca Ivoneide Gomes dos Santos e José Neudes Marques de Araújo, por me apoiarem em todos os momentos da minha vida. Eles são a principal razão para eu nunca desistir dos meus sonhos e lutar para realiza-los.

Aos meus queridos irmãos, Mário, Henrique, Laís e Jovana, por tada confiança, cumplicidade e apoio!

À toda minha família por todo apoio e amor!

À minha orientadora, Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão, por tada orientação desde o início do meu doutorado. Pelo seu exemplo de profissionalismo. Por ter me incentivado a fazer o doutorado sanduíche nos Estados Unidos e por todo o suporte para eu conseguir realizar este grande sonho da minha vida. Serei eternamente grato por isso!

À minha amiga e preceptora da *University of Virginia*, Dra. Deiziane Viana Da Silva Costa. Por todos os ensinamentos, ajuda e suporte durante os meses que passei em Charlottesville. Por fazer os meus dias nos Estados Unidos serem mais leves, através do voleibol, *hikes* incríveis, os passeios na neve para tirarmos fotos, *coffee time*, *lunch time*, entre muitos outros. Por ter acreditado que eu conseguia apresentar na conferência *Digestive Disease Week* 2025. Foi incrível e inesquecível. Obrigado pela cumplicidade e por tudo!

À Dra. Cirle Alcântara Warren por ter me recebido tão bem em seu laboratório da *University of Virginia* para desenvolver o projeto que foi proposto em minha tese de doutorado. Por todo o apoio e confiança!

À minha amiga e Pós-doc Conceição da Silva Martins (Josiane) por ter me apoiado ao longo dessa caminhada. Por sua amizade e ensinamentos! Todos os momentos que passamos juntos no laboratório foram incríveis e memoráveis.

À profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito por todo o suporte e legado no nosso laboratório, o Nemi.

Aos meus amigos do Nemi, Tayane, Keyse, André, Sávio, Ludmila, Denis, Andrea e Rafaela por todo companheirismo, amizade e troca de ensinamentos!

Aos amigos que fiz nos Estados Unidos durante o meu doutorado sanduíche: Gislane, Gabriel Santos, Gabriel Alencar, Gabriel Montoya, Lucas Almeida, Victor Ariel, André, Adriana, Valentina, Matt, Sumei, Arka, Silvia Dávila, Verônica, Mônica, Chava, Yasmin

Cursi, George, Luísa, Cielo, Ricardo, Mariana e Masoud Jafari por todos os bons momentos que passamos juntos. Por toda amizade e afeto!

À Luana Gaudêncio e Samuel por terem sido *roommates* incríveis.

À profa. Dra. Roberta Geane por todo apoio e orientação sobre os assuntos burocráticos no decorrer do doutorado e, principalmente, durante o meu período sanduíche nos Estados Unidos.

À Fundação cearense de apoio ao desenvolvimento científico e tecnológico (FUNCAP) pela bolsa de doutorado sanduíche.

À Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) e ao conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico (CNPQ) pelo apoio financeiro necessário para o desenvolvimento deste estudo.

Muito obrigado a todos!

“Como é feliz o homem que acha a sabedoria, o homem que obtém entendimento, pois a sabedoria é mais proveitosa do que a prata e rende mais do que o ouro. É mais preciosa do que rubis; nada do que você possa desejar se compara a ela.”

Provérbios 3:13-18

RESUMO

A infecção por *Clostridioides difficile* (ICD) configura-se como um crescente problema de saúde pública, caracterizado por colite grave, alta taxa de recorrência e elevados custos para os sistemas de saúde. Nos últimos dez anos têm sido observados, em âmbito global, um aumento significativo de casos adquiridos na comunidade e na população pediátrica, grupo anteriormente considerado de menor vulnerabilidade. Embora a maioria dos estudos tenha se concentrado nos efeitos agudos da infecção e no impacto sobre as células epiteliais intestinais, os efeitos da ICD sobre a glia entérica, que é um importante componente do sistema nervoso entérico envolvido na homeostase e na motilidade intestinal, bem como as consequências de longo prazo associado à exposição às toxinas do *C. difficile*, permanecem pouco explorados. Este estudo teve como objetivo investigar o papel do receptor proteoglicano de sulfato de condroitina 4 (CSPG4) na mediação dos efeitos das toxinas A (TcdA) e B (TcdB) do *C. difficile* sobre as células gliais entéricas. Inicialmente, foi realizada uma análise exploratória no banco público de dados de sequenciamento de RNA, por meio da plataforma *Single Cell Portal*, com o intuito de caracterizar os perfis de expressão gênica de diferentes receptores de toxinas do *C. difficile* (*Cspg4*, *Pvrl3*, *Fzd1*, *Lrp1*, *Fzd2*, *Tfpi*, *Fzd7* e *Ldlr*) em células gliais entéricas do cólon de camundongos e humanos. A distribuição desses receptores em células gliais de ratos (CRL2690) foi identificado por meio da técnica do PCR em tempo real (qPCR). Também foi investigado o impacto da exposição a TcdA (50 ng/mL) ou TcdB (1 ng/mL) na expressão desses receptores em células da linhagem enteroglial após 2, 12 e 18 horas de incubação com essas toxinas. A distribuição do CSPG4 em amostras de intestino grosso de humanos e camundongos, infectados ou não por *C. difficile* foi analisada por imunohistoquímica. In vitro, para investigar o envolvimento do CSPG4 na resposta inflamatória, morte celular e senescência provocados por TcdA e TcdB, as células gliais de ratos (CRL2690) foram incubadas com as toxinas, com ou sem pré-tratamento com o anticorpo anti-CSPG4 (0,001 µg/mL), cuja concentração foi previamente determinada por meio do ensaio de Anexina V. A expressão gênica de IL-6 e S100B, ambos considerados marcadores de inflamação, foi quantificada por qPCR, enquanto os níveis extracelulares de S100B foram determinados por ELISA. A ativação dos fatores de transcrição NFκB e STAT3, bem como a atividade da β-galactosidase associada à senescência (SA-β-Gal), foram avaliadas por imunofluorescência. Os resultados demonstraram que a glia entérica de camundongos, ratos e humanos expressam constitutivamente todos os receptores para as toxinas do *C. difficile*. CSPG4 de forma constitutiva, com aumento significativo de sua expressão após a exposição às toxinas. Também foi observada maior expressão do receptor no plexo mioentérico de camundongos infectados por *C. difficile* em relação ao grupo não infectado. O bloqueio do CSPG4 reduziu a liberação de IL-6 e S100B, bem como a translocação nuclear de NFκB e STAT3 induzidas por TcdB. Embora a apoptose induzida por TcdB não tenha sido afetada, o fenótipo de senescência celular foi significativamente atenuado pela inibição do receptor. Em conjunto, os dados indicam que o CSPG4 desempenha um papel relevante na resposta da glia entérica à infecção por *C. difficile*, especialmente na modulação de vias inflamatórias e de senescência, configurando-se como um potencial alvo terapêutico para mitigar os efeitos deletérios das toxinas bacterianas sobre o sistema nervoso entérico.

PALAVRAS-CHAVE: *Clostridioides difficile*; Sistema nervoso entérico; Proteoglicano de Sulfato de Condroitina; TcdA; TcdB.

ABSTRACT

Clostridioides difficile infection (CDI) is a growing public health problem, characterized by severe colitis, a high recurrence rate, and significant costs to healthcare systems. Over the past ten years, a significant increase in community-acquired cases and in pediatric patients, a group previously considered less vulnerable, has been observed globally. Although most studies have focused on the acute effects of infection and its impact on intestinal epithelial cells, the effects of CDI on enteric glia, an important component of the enteric nervous system involved in homeostasis and intestinal motility, as well as the long-term consequences associated with exposure to *C. difficile* toxins, remain poorly explored. This study aimed to investigate the role of chondroitin sulfate proteoglycan receptor 4 (CSPG4) in mediating the effects of *C. difficile* toxins A (TcdA) and B (TcdB) on enteric glial cells. Initially, an exploratory analysis of the public RNA sequencing database using the Single Cell Portal platform was performed to characterize the gene expression profiles of different *C. difficile* toxin receptors (Cspg4, Pvrl3, Fzd1, Lrp1, Fzd2, Tfpi, Fzd7, and Ldlr) in enteric glial cells from the colon of mice and humans. The distribution of these receptors in rat glial cells (CRL2690) was identified using real-time PCR (qPCR). The impact of exposure to TcdA (50 ng/mL) or TcdB (1 ng/mL) on the expression of these receptors in enteroglial cells after 2, 12, and 18 hours of incubation with these toxins was also investigated. The distribution of CSPG4 in large intestine samples from humans and mice, infected or not with *C. difficile*, was analyzed by immunohistochemistry. In vitro, to investigate the involvement of CSPG4 in the inflammatory response, cell death, and senescence caused by TcdA and TcdB, rat glial cells (CRL2690) were incubated with the toxins, with or without pretreatment with anti-CSPG4 antibody (0.001 µg/mL), whose concentration was previously determined by the Annexin V assay. Gene expression of IL-6 and S100B, both considered markers of inflammation, was quantified by qPCR, while extracellular S100B levels were determined by ELISA. Activation of the transcription factors NF κ B and STAT3, as well as senescence-associated β -galactosidase (SA- β -Gal) activity, were assessed by immunofluorescence. The results demonstrated that enteric glia from mice, rats, and humans constitutively express all receptors for *C. difficile* toxins. CSPG4 constitutively upregulated, with a significant increase in its expression after exposure to toxins. Higher receptor expression was also observed in the myenteric plexus of *C. difficile*-infected mice compared to the uninfected group. CSPG4 blockade reduced the release of IL-6 and S100B, as well as the nuclear translocation of NF κ B and STAT3 induced by TcdB. Although TcdB-induced apoptosis was not affected, the cellular senescence phenotype was significantly attenuated by receptor inhibition. Taken together, the data indicate that CSPG4 plays a relevant role in the enteric glial response to *C. difficile* infection, particularly in modulating inflammatory and senescence pathways, constituting a potential therapeutic target to mitigate the deleterious effects of bacterial toxins on the enteric nervous system.

KEYWORDS: *Clostridioides difficile*; Enteric nervous system; Chondroitin sulfate proteoglycan; TcdA; TcdB.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. <i>Clostridioides difficile</i> | 19 |
| Figura 2. Estrutura da TcdA e da TcdB..... | 22 |
| Figura 3. Mecanismo de ação das toxinas de <i>C. difficile</i> | 24 |
| Figura 4. Representação esquemática da estrutura do CSPG4..... | 27 |
| Figura 5. Interações do CSPG4 com vias de sinalização intracelular..... | 28 |
| Figura 6. Representação esquemática da endocitose de TcdB mediada pelo CSPG4 e por outro receptor alternativo..... | 29 |
| Figura 7. Modelo esquemático do reconhecimento de CSPG4 e FZD2 por TcdB e sua dissociação após acidificação endosomal..... | 31 |
| Figura 8. Estrutura do Sistema Nervoso Entérico..... | 33 |
| Figura 9. Tipos de células gliais entéricas baseado nos seus aspectos morfológicos.. | 35 |
| Figura 10. Classificação das células gliais entéricas de acordo com a sua localização no intestino e funções desempenhadas..... | 36 |
| Figura 11. A glia entérica de humano, camundongo e de rato expressa todos os receptores de toxinas do <i>C. difficile</i> atualmente conhecidos..... | 49 |
| Figura 12. A ICD aumenta a imunocoloração de CSPG4 no plexo mioentérico do ceco e cólon de camundongos..... | 51 |
| Figura 13. A expressão gênica dos receptores <i>C. difficile</i> muda com diferentes tempos de incubação com a TcdA e TcdB na glia entérica..... | 53 |
| Figura 14. As toxinas A e B do <i>C. difficile</i> induzem aumento da imunocoloração de CSPG4 na glia entérica..... | 55 |
| Figura 15. Avaliação da morte celular de células gliais entéricas incubadas com diferentes concentrações de Anti-CSPG4..... | 55 |
| Figura 16. O bloqueio do CSPG4 promove a diminuição da translocação nuclear do NFkB induzida por TcdB e a diminuição da expressão gênica de IL-6..... | 57 |
| Figura 17. O bloqueio do CSPG4 promove a diminuição da translocação nuclear do pSTAT3 induzida por TcdB..... | 59 |
| Figura 18. O bloqueio do CSPG4 não diminui a morte celular induzida pela TcdB, mas diminui a morte pela TcdA..... | 61 |
| Figura 19. O bloqueio do CSPG4 promove diminuição da expressão do gene S100B, mas aumento da expressão proteica em células gliais entéricas desafiadas | 63 |

| | |
|---|----|
| com TcdB..... | |
| Figura 20. TcdA e TcdB promovem o aumento do marcador de senescência, β -galactosidase (SA- β -Gal) na glia entérica e a modulação do receptor CSPG4 diminui a imunocoloração..... | 64 |
| Figura 21. Modelo esquemático do envolvimento do CSPG4 na ação das toxinas A e B do <i>C. difficile</i> nas células gliais entéricas..... | 74 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------------------|---|
| °C | Graus centígrados |
| µL | Microlitro |
| µg | Micrograma |
| µmol | Micromol |
| AKT | Serina-treonina quinase |
| ANOVA | Análise de variância |
| Ca ²⁺ | Cálcio |
| <i>C. difficile</i> | <i>Clostridioides difficile</i> |
| DNAc | Ácido desoxirribonucléico complementar |
| CDT | Toxina binária do Clostridioides difficile |
| cdtA | Gene que codifica a subunidade ligante A da toxina binária |
| CdtA | Proteína correspondente à subunidade ligante A da toxina binária |
| CdtB | Gene que codifica a subunidade ligante B da toxina binária |
| CdtB | Proteína correspondente à subunidade ligante B da toxina binária |
| CdtLoc | Locus da toxina binária |
| CdtR | Gene que codifica CdtR |
| Cm | Centímetro |
| CO | Monóxido de carbono |
| CPD | Domínio da cisteína protease |
| CSPG4 | Do inglês “chondroitin sulfate proteoglycan 4” (proteoglicano sulfato de condroitina-4) |
| DAB | Diaminobenzidina |
| DAMP | Padrão molecular associado a dano |
| DAP | Domínio autoproteolítico |
| DAPI | 4,6-diamidino-2-fenilindol |
| DII | Doença inflamatória intestinal |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| DNase | Desoxirribonuclease |
| DRGE | Doença do refluxo gastroesofágico |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| EGFR | Receptor do fator de crescimento epidérmico |

| | |
|-------------------------------|---|
| ELISA | Ensaio imunoenzimático |
| EPM | Erro padrão da média |
| ERK | Quinase reguladora de sinais extracelulares |
| <i>et al</i> | E colaboradores |
| FAK | Quinase de adesão focal |
| FZD | Receptor Frizzled |
| GAG | Glicosaminoglicanos |
| GAPDH | Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase |
| GFAP | Proteína glial fibrilar ácida |
| GTD | Glicosiltransferase |
| GTPase | Guanosina trifosfatase |
| ICD | Infecção por <i>Clostridioides difficile</i> |
| ICD-AC | ICD adquirida na comunidade |
| IL-1β | Interleucina -1 β |
| IL-2 | Interleucina-2 |
| IL-6 | Interleucina-6 |
| IL-8 | Interleucina-8 |
| IL-17 | Interleucina-17 |
| IL-18 | Interleucina-18 |
| IL-23 | Interleucina-23 |
| InsP6 | Inositolhexaquisfosfatocitosólico |
| JTs | Junções de oclusão |
| kDa | KiloDalton |
| LEICA | Sistema de aquisição de imagens |
| LRP1 | Do inglês “Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein 1 (Proteína 1 relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade) |
| M | Molar” |
| MAPK | Proteína quinase ativada por mitógeno |
| mg | Miligrama |
| MMP | Metaloproteinase da matriz |
| N | Número |
| NADPH | Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido |
| NFκB | Fator de transcrição nuclear- κ B |

| | |
|--------------|---|
| NG2 | Antígeno neural/glial 2 |
| P | Página |
| PaLoc | Locus de patogenicidade |
| PBS | Tampão fosfato-salino |
| PCR | Reação em cadeia de polimerase |
| PDGF | Fator de crescimento derivado de plaquetas |
| Pg | Picograma |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| PI3K | Fosfatidilinositol-3-quinase |
| PKC α | Proteína quinase C alfa |
| PM | Plexo mioentérico |
| PS | Plexo submucoso |
| PVRL3 | Do inglês “poliovírus receptor-like protein 3” (proteína relacionada ao receptor de poliovírus-3) |
| qPCR | Reação em cadeia de polimerase em tempo real |
| RBD | Domínio de ligação ao receptor |
| RAGE | Receptor de produtos finais de glicação avançada |
| RNA | Acido ribonucleico |
| RNAm | Ácido ribonucléico mensageiro |
| RNase | Ribonuclease |
| ROS | Espécies reativas de oxigênio |
| RPM | Rotações por minuto |
| RTK | Tirosina quinases receptoras |
| S100 β | Fração beta da proteína S100 |
| SDS | Dodecil sulfato de sódio |
| SDS-PAGE | Proteínas em gel de poliacrilamida-SDS |
| SII | Síndrome do intestino irritável |
| SNC | Sistema nervoso central |
| SNE | Sistema nervoso entérico |
| SOX10 | SRY-box 10 |
| TFPI | Do inglês “Tissue Factor Pathway Inhibitor” (Inibidor da via do fator tecidual) |
| Thr | Treonina |

| | |
|---------------|---|
| TcdA | Toxina A do <i>Clostridioides difficile</i> |
| tcdA | Gene que codifica o RNAm da Toxina A do <i>Clostridioides difficile</i> |
| TcdB | Toxina B do <i>Clostridioides difficile</i> |
| tcdB | Gene que codifica o RNAm da Toxina B do <i>Clostridioides difficile</i> |
| tcdC | Gene que codifica TcdC |
| tcdE | Gene que codifica um holin do bacteriófago |
| tcdR | Gene que codifica um fator sigma da RNA polimerase |
| TNF- α | Fator de necrose tumoral- α |
| TRPV-4 | Receptor de potencial transiente vaniloide do tipo 4 |
| UDP-glicose | Glicose-uridina difosfato |
| V | Volume |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 17 |
| 1.1 <i>Clostridoides difficile</i>..... | 19 |
| 1.2 Toxina A e Toxina B do <i>C. difficile</i> e seu mecanismo de ação..... | 21 |
| 1.3 Receptor Proteoglicano de sulfato de condroitina 4 (CSPG4) e sua relação com a TcdB..... | 25 |
| 1.4 Sistema Nervoso Entérico (SNE) e as Células Gliais Entéricas (CGEs)..... | 32 |
| 1.4.1 Sistema Nervoso Entérico (SNE)..... | 32 |
| 1.4.2 Células Gliais Entéricas..... | 34 |
| 2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA..... | 37 |
| 3 OBJETIVOS..... | 39 |
| 3.1 Objetivo geral..... | 39 |
| 3.2 Objetivos específicos..... | 39 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 40 |
| 4.1 Avaliação da expressão gênica de receptores de toxinas de <i>C. difficile</i> em células gliais entéricas de camundongos, ratos e humanos..... | 40 |
| 4.2 Avaliação da expressão proteica de CSPG4 e GFAP em ceco e cólon de camundongos e humanos por imunofluorescência..... | 40 |
| 4.3 Avaliação da expressão proteica de CSPG4 em ceco e cólon de camundongos infectados e não infectados por <i>C. difficile</i> por Imunohistoquímica..... | 41 |
| 4.4 Estudos in vitro | 42 |
| 4.4.1 Cultura de células da glia entérica..... | 42 |
| 4.4.2 qPCR..... | 43 |
| 4.4.3 Imunofluorescência..... | 44 |
| 4.4.4 Ensaio de ligação Fosfatidilserina-Anexina V..... | 45 |
| 4.4.5 Atividade das Caspases 3/7..... | 45 |
| 4.4.6 Dosagem dos níveis de S100B..... | 46 |
| 4.4.7 Atividade de β-galactosidase (senescência)..... | 46 |
| 4.5 Análise estatística..... | 46 |
| 5 RESULTADOS..... | 48 |
| 6 DISCUSSÃO..... | 66 |
| 7 CONCLUSÃO..... | 74 |

| | |
|-------------------------|-----------|
| REFERÊNCIAS..... | 75 |
| ANEXO 1..... | 83 |
| ANEXO 2..... | 85 |

1 INTRODUÇÃO

Clostridioides difficile (*C. difficile*) é um bacilo anaeróbio estrito gram-positivo, produtor de toxinas, com capacidade de formar de esporos. (GAWEY; KHANNA, 2023). A infecção por *C. difficile* (ICD) representa um crescente problema de saúde pública, tradicionalmente associada a ambientes hospitalares, mas com aumento significativo de casos adquiridos na comunidade, observado nos últimos anos (SALVATI *et al.*, 2024).

A ICD é a oitava principal causa de readmissão hospitalar nos EUA e a sétima de mortalidade entre todos os distúrbios gastrointestinais (PEERY *et al.*, 2022). A sua incidência é em torno de 8,3 casos por 10.000 pacientes-dia e custos de saúde associados totalizando quase US\$ 4 bilhões por ano nos EUA. Na Europa, a incidência de ICD varia de 1,49 a 4,1 casos por 10.000 pacientes-dia (VIPREY *et al.*, 2023; JAZMATI *et al.*, 2024), enquanto na Ásia as estimativas variam de 3% a 12,7% (CUI *et al.*, 2023; WEN *et al.* 2023; KIM *et al.* 2024) e no Brasil entre 7% e 37% entre os casos suspeitos de diarreia (GIRÃO *et al.*, 2020; BRAGA *et al.*, 2023).

A ICD, marcada por colite grave e alta taxa de recorrência, está fortemente relacionada ao uso indiscriminado de antimicrobianos e à disbiose intestinal subsequente. A pandemia de COVID-19 agravou esse cenário, impulsionando o uso de antibióticos e, consequentemente, elevando a incidência de ICD (STOIAN *et al.*, 2024).

O uso inadequado de antibióticos provoca uma disruptão da microbiota intestinal, levando à inflamação e a alterações na estrutura e função do Sistema Nervoso Entérico. Como consequência, a motilidade intestinal e a regulação da inflamação intestinal são prejudicadas (COSTA *et al.*, 2024). Em decorrência dessas alterações, diversas complicações intestinais têm sido relatadas como possíveis sequelas da ICD, incluindo síndrome do intestino irritável (SII), doença do refluxo gastroesofágico (DRGE), diarreia funcional, dispepsia e constipação, sendo a SII e a constipação as complicações mais comuns (GUTIÉRREZ *et al.*, 2015). Além disso, sintomas como dor abdominal, constipação, diarreia, SII e dispepsia podem persistir por até dois anos após a resolução da infecção (BERLAM *et al.*, 2018).

O principal fator de virulência do *C. difficile* é a ação das toxinas A (TcdA) e B (TcdB), que desencadeiam uma resposta inflamatória aguda, promovem a liberação de citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-6) e aumentam a secreção de fluidos. Essas toxinas também interferem com as junções de oclusão (JTs) das células epiteliais intestinais humanas, levando à necrose tecidual, colite pseudomembranosa e, em casos graves, ao óbito (ABHYANKAR *et al.*, 2020; FOSCHETTI *et al.*, 2020).

Descobertas recentes indicam que a TcdB está mais fortemente associada à gravidade da ICD, apresentando um potencial citotóxico 100 a 1000 vezes superior ao da TcdA. Esses achados destacam a TcdB como um fator central na gravidade clínica da ICD (POURLIOTOPOLOU *et al.*, 2024). A diferença no potencial citotóxico entre as duas toxinas já havia sido sugerida por Aktories (1997), que a atribuiu a diferenças na densidade dos receptores específicos das toxinas na superfície celular. Atualmente, os receptores conhecidos para a TcdB incluem Frizzled (1, 2 and 7), Poliovirus-Like Receptor 3 (PVRL3), Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI), Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein 1 (LRP1), e Chondroitin Sulfate Proteoglycan 4 (CSPG4) (TAO *et al.*, 2019; KINSOLVING *et al.*, 2024).

Entre esses receptores de TcdB, o CSPG4 destaca-se por ser um dos mais abundantemente expressos nas células intestinais, configurando-se como um alvo estratégico para a ICD, e, portanto, como um objeto de estudo relevante para a investigação dos efeitos mediados pela TcdB durante a ICD e também no período pós-infecção (CHEN *et al.*, 2021). Dentre as funções fisiológicas reportadas ao CSPG4, destacam-se a promoção da proliferação e sobrevivência, mediadas pela sinalização de MAPK e pela apresentação cruzada de fatores de crescimento (ILIEVA *et al.*, 2018). Além disso, com base na interconexão com o citoesqueleto de actina e na ligação a várias integrinas e componentes da matriz extracelular, o CSPG4 desempenha um papel na motilidade celular e na invasão de tecidos (SCHIFFER *et al.*, 2018).

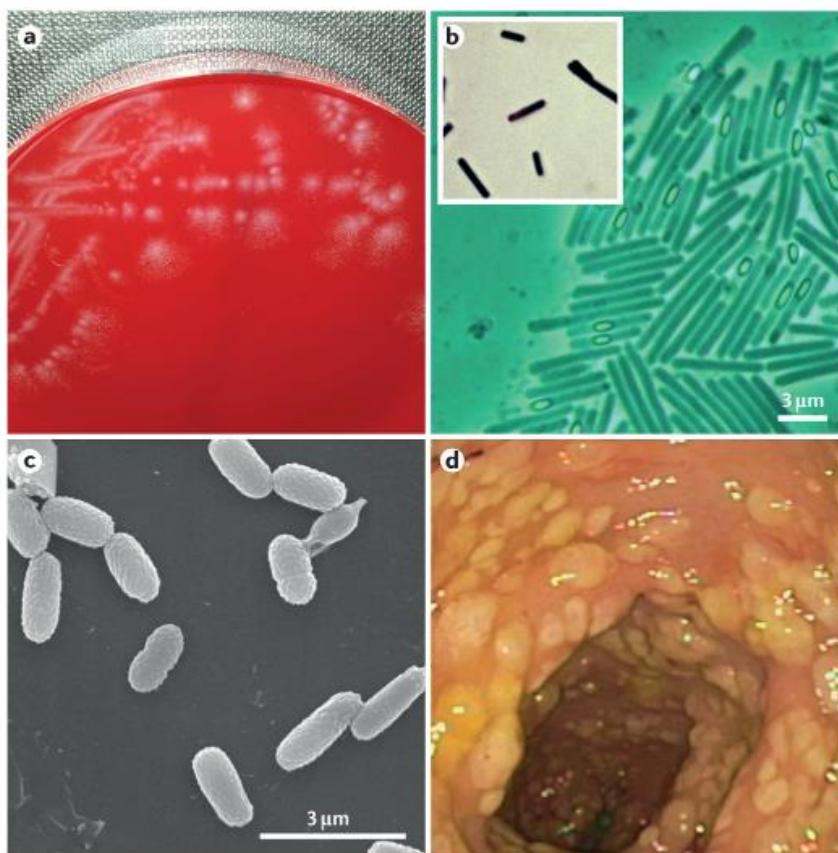
A literatura já descreve que a glia entérica que sobrevive aos efeitos citotóxicos da TcdB pode permanecer metabolicamente ativa e entrar em processo de senescência. (VETTUCCIARI *et al.*, 2018). Em outras palavras, essas células podem apresentar parada irreversível do ciclo celular, alterações no metabolismo, na morfologia e na expressão gênica, além de sofrerem modificações e danos no DNA (LIU *et al.*, 2025). Como consequência, diversas condições clínicas gastrointestinais podem aparecer, como doenças inflamatórias intestinais (DII) e carcinogênese colorretal (PENFIELD *et al.*, 2013; FREY *et al.*, 2018) até síndrome do intestino irritável (SII) (ZHANG *et al.*, 2022). Além disso, o estresse patológico devido à resposta inflamatória forte e persistente associada a uma microbiota fortemente alterada pode ocorrer processos contínuos de reparo tecidual que, eventualmente, levam à formação de células senescentes (RISQUES *et al.*, 2011; SOHN *et al.*, 2012; FETTUCCIARI *et al.*, 2023).

Nesse contexto, a presente pesquisa teve como objetivo investigar o papel do receptor CSPG4 na modulação da resposta inflamatória, morte celular e senescência induzida pelas toxinas A e B do *C. difficile* na glia entérica.

1.1 *Clostridioides difficile*

Clostridioides difficile (*C. difficile*) é um bacilo anaeróbio estrito Gram-positivo, produtor de toxina, formador de esporos (Figura 1), distribuído no trato intestinal de humanos, animais e no meio ambiente. O *C. difficile* é reconhecido como a causa mais comum de diarreia bacteriana infecciosa associada a antibióticos em ambientes de saúde em todo o mundo (GAWEY; KHANNA, 2023).

Figura 1. *Clostridioides difficile*



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

A apresentação da doença varia de colonização assintomática à doença propriamente dita, compreendendo diarreia profusa, pungente, aquosa e, às vezes, sanguinolenta. Além de dor abdominal, febre e náusea, entre outros sintomas debilitantes. As formas mais graves incluem colite pseudomembranosa, íleo paralítico, megacôlon tóxico e perfuração intestinal (MOHANDAS, 2021).

Um desafio primário no manejo da ICD é a recorrência, uma vez que os antimicrobianos padrão usados para o tratamento têm como alvo principal a fase vegetativa bacteriana (BOUSTANY; FEUERSTADT; TILLOTSON, 2024). A fase de esporos, responsável pela transmissão e recorrência, frequentemente persiste após o tratamento, levando a infecções repetidas (KELLY *et al.*, 2021). Até 35% dos pacientes tratados para ICD apresentam recorrência, com recorrências subsequentes afetando até 60% desses pacientes (JOHNSON *et al.*, 2021; KELLY *et al.*, 2021). Esses episódios recorrentes resultam em consequências clínicas, econômicas e humanísticas significativas (FEUERSTADT; THERIAULT; TILLOTSON, 2023).

A grande maioria dos casos de ICD em pediatria é adquirida na comunidade, uma mudança em relação à doença nosocomial clássica (MOHANDAS, 2021). A ICD adquirida na comunidade (ICD-AC) foi descrita pela primeira vez em 1980 (STERGACHIS *et al.*, 1984). No passado, acreditava-se que o *C. difficile* era um patógeno adquirido exclusivamente no ambiente hospitalar, mas agora é reconhecido como uma causa importante de diarreia no ambiente comunitário. A IDC-AC pode ser definida, de acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), como o início dos sintomas na comunidade ou ≤ 48 horas após a admissão em uma instituição de saúde, desde que o início dos sintomas tenha ocorrido há mais de 12 semanas após a última alta de uma instituição de saúde (ÁLVAREZ-VILLALOBOS *et al.*, 2025).

Os fatores de risco para ICD incluem exposição recente a antibióticos, exposição frequente ao sistema de saúde, comorbidades como doença inflamatória intestinal (DII), câncer, receptor de transplante, exposição a inibidores da bomba de prótons e/ou histórico de cirurgia abdominal, como gastrostomia ou colostomia. A exposição prévia a antibióticos, hospitalização e imunodeficiência continuam sendo os fatores de risco mais significativos, e quase todos os antibióticos têm sido associados à ICD (MALHOTRA; MOHANDAS, 2021).

A ICD apresenta uma taxa de letalidade de até 14% em 30 dias após o diagnóstico, com recorrências que podem aumentar as taxas de doença e diminuir a qualidade de vida; ainda assim, a morbidade e a mortalidade podem ser determinadas pela virulência variável do patógeno (ZHANG *et al.*, 2018). Além de impactar na vida dos pacientes e na sobrecarga dos

profissionais de saúde, a ICD impacta de forma significativa nos custos da saúde, que podem chegar a bilhões em unidades de tratamento intensivo (DUBBERKE *et al.* 2012; ÁLVAREZ-VILLALOBOS *et al.*, 2025).

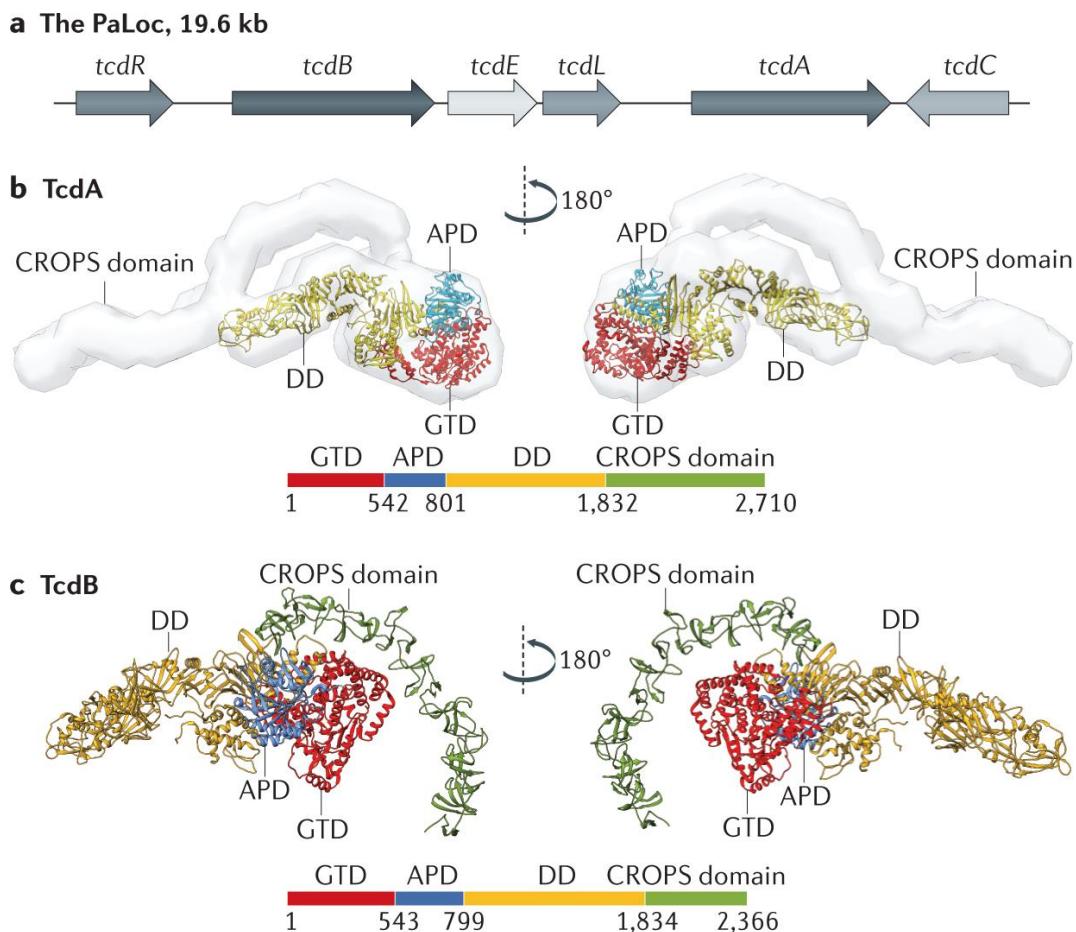
A incidência de ICD é em torno de 8,3 casos por 10.000 pacientes-dia e custos de saúde associados totalizando quase US\$ 4 bilhões por ano nos EUA. Na Europa, a incidência de ICD varia de 1,49 a 4,1 casos por 10.000 pacientes-dia (VIPREY *et al.*, 2023; JAZMATI *et al.*, 2024), enquanto na Ásia as estimativas variam de 3% a 12,7% (CUI *et al.* 2023; WEN et al. 2023; KIM *et al.*, 2024) e no Brasil estudos de incidência de ICD ainda são escassos, mas trabalhos relatam que ela pode chegar até 37% (GIRÃO *et al.*, 2020; BRAGA *et al.* 2023). A ICD é a oitava principal causa de readmissão hospitalar nos EUA e a sétima de mortalidade entre todos os distúrbios gastrointestinais (PEERY *et al.*, 2022).

O principal fator de virulência do *C. difficile* é a ação das toxinas A (TcdA) e B (TcdB), que desencadeiam uma resposta inflamatória aguda, promovem a liberação de citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-6) e aumentam a secreção de fluidos. Essas toxinas também interferem nas junções de oclusão (JTs) das células epiteliais intestinais humanas, levando à necrose tecidual, colite pseudomembranosa e, em casos graves, ao óbito (ABHYANKAR *et al.*, 2020; FOSCHETTI *et al.*, 2020).

1.2 Toxina A e Toxina B do *C. difficile* e seu mecanismo de ação

Os genes que codificam TcdA e TcdB são encontrados em uma região de DNA de 19,6 kb denominada "locus de patogenicidade" (PaLoc) (Figura 2A). O PaLoc contém genes para quatro proteínas adicionais, TcdR, TcdE, TcdL e TcdC, que desempenham um papel na regulação da expressão e secreção de toxinas. Os genes *tcdA* e *tcdB* são ativados transcripcionalmente por *tcdR*, um membro da família σ 70 de fatores σ da RNA polimerase 7. TcdR atua como um regulador positivo da produção de toxinas e estimula sua própria transcrição para aumentar ainda mais a expressão de LCT 8–10. A atividade do *tcdR* é modulada por ativadores e repressores e é influenciada por mudanças ambientais, como mudanças na temperatura e na disponibilidade de nutrientes (KORDUS *et al.*, 2022).

Figura 2. Estrutura da TcdA e da TcdB



Fonte: Adaptado de Kordus *et al.* (2022). A) O locus de patogenicidade (PaLoc). O PaLoc contém genes que codificam as grandes toxinas clostridiais A (TcdA) e B (TcdB), o regulador positivo de toxina TcdR, o regulador negativo de toxina TcdC, a holina TcdE e o fragmento de endolisina TcdL. B) Estrutura cristalina de TcdA. C) Estrutura de TcdB.

O TcdC funciona como um anti-fator σ ligado à membrana e um regulador negativo da expressão da toxina. Após a expressão da toxina, TcdA e TcdB são secretados pela TcdE, uma proteína com função semelhante à holina (GOVIND; FITZWATER; NICHOLS, 2015). As holinas do fago são tipicamente expressas em conjunto com uma proteína endolisina que quebra ligações na camada de peptidoglicano da parede celular. A análise das sequências de PaLoc revelou um pequeno fragmento de um gene de endolisina, *tcdL*, mantido diretamente a jusante do *tcdE*. O TcdL pode se ligar ao TcdB para facilitar a secreção da toxina (KORDUS *et al.*, 2022).

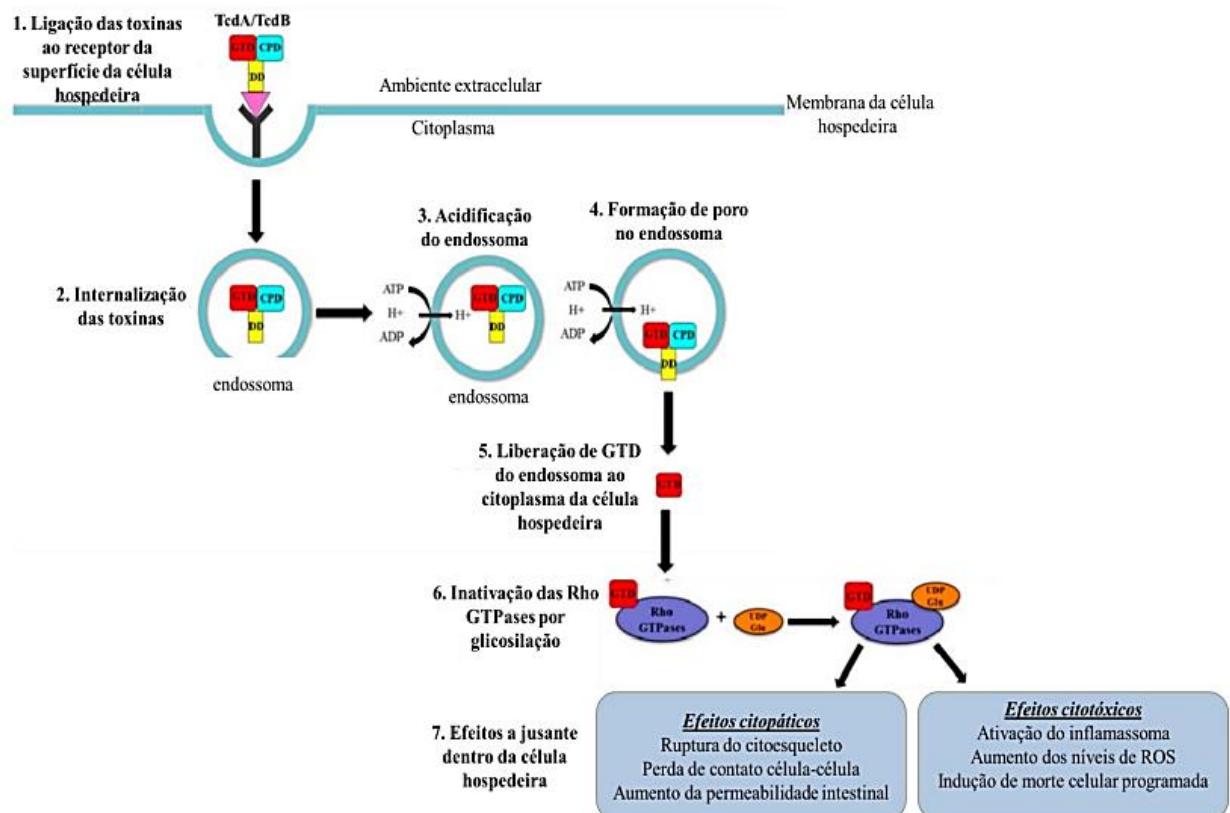
As duas toxinas são compostas pelos seguintes domínios (Figuras 2B e 2C): o domínio A, correspondente ao domínio N-terminal da glicosiltransferase (GTD); o domínio C,

correspondente ao domínio da cisteína protease (CPD) e o domínio do feixe de três hélices (3HB) identificado tanto na toxina A (TcdA) quanto na toxina B (TcdB); o domínio D, que corresponde ao domínio hidrofóbico de entrega (DD), qual contém o pequeno domínio globular (SGD) em TcdA que corresponde à região de formação de poros mínima (MPFR) em TcdB, e sobrepondo-se apenas parcialmente para a região hidrofóbica (HR) de TcdA e TcdB; o domínio B, correspondente ao domínio de ligação ao receptor (RBD) (DI BELLA *et al.*, 2016).

A TcdA e TcdB têm como principal alvo a superfamília Ras de pequenas GTPases (Rho, Rac e Cdc42) que são modificadas por glicosilação. Essa modificação é irreversível e inativa essas pequenas proteínas reguladoras, levando como consequência uma interrupção das vias de sinalização vitais para a célula. No entanto, além da modificação enzimática de alvos específicos das toxinas, existem várias etapas importantes para a entrada da toxina na célula que também são importantes (PAPARELLA *et al.*, 2022).

Após chegar no trato gastrintestinal do hospedeiro, as toxinas são produzidas e liberadas no lúmen intestinal. A libertação de toxinas no citosol da célula hospedeira pode ser dividida em sete etapas principais, sendo elas: (1) ligação da toxina ao receptor da superfície da célula hospedeira; (2) internalização de toxinas através de uma endocitose a qual é mediada pelo receptor; (3) acidificação do endossoma; (4) formação de poros; (5) liberação de GTD do endosoma para o citoplasma da célula hospedeira; (6) Inativação de RhoGTPases por glicosilação e (7) efeitos a jusante dentro da célula hospedeira, ou seja, efeitos citopáticos e citotóxicos induzidos pelas toxinas (Figura 3) (DI BELLA *et al.*, 2016). As etapas do mecanismo de ação das toxinas está apresentado na Figura 3.

Figura 3. Mecanismo de ação das toxinas de *C. difficile*



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

Na primeira e segunda etapa do mecanismo de ação, a TcdA e TcdB se ligam ao(s) receptor(es) da superfície celular através do domínio RBD e entram nas células hospedeiras através de endocitose até os compartimentos endossômicos (FLORIN; THELESTAM, 1983).

Na terceira etapa após a ligação aos receptores, a toxina entra na célula por endocitose e esse processo requer um endossoma acidificado para que possa ocorrer a translocação. A acidificação do endossoma é essencial para que possa haver alteração na estrutura das toxinas por meio de uma mudança conformacional induzida pelo pH (PAPARELLA *et al.*, 2021).

Na quarta e quinta etapa, com a acidificação no interior do endossomao corre a exposição de regiões hidrofóbicas com consequente formação de poros na membrana pelo DD que resulta na translocação de GTD e/ou CPD para o citoplasma da célula do hospedeiro (PAPARELLA *et al.*, 2021).

Na sexta e última etapa do mecanismo de ação das toxinas, o inositol-hexaquisfosfatocitosólico (InsP6) ativa a protease para clivagem autoproteolítica fazendo com que o GTD seja liberado para assim inativar as RhoGTPases. Essa inativação ocasiona a despolimerização da actina, o que resulta em perda da integridade estrutural da célula e, eventualmente, em morte celular por meio de vias dependentes de caspase-3 e caspase-9 (Li *et al.*, 2013).

Ambas as toxinas exibem o mesmo mecanismo de toxicidade celular, porém, foi demonstrado que a TcdB é mais potente que a TcdA em sua capacidade de induzir arredondamento celular e morte celular, ou seja, a TcdA é mais enterotóxica em murinos, enquanto a TcdB é mais citotóxica (ZHANG *et al.*, 2018).

As toxinas do *C. difficile* utilizam a glicose-uridina difosfato (UDP-glicose) como co-substrato e a transfere para o resíduo de aminoácido treonina (Thr35/37) em quase todas as subfamílias das RhoGTPases, inativando-as (HIPPENSTIEL *et al.*, 2002; DI BELLA *et al.*, 2016).

As proteínas Rho são pequenas proteínas ligantes de GTP de 21 a 25kDa que pertencem à superfamília Ras (JAFFE; HALL, 2005). Estas proteínas localizam-se no citosol e estão envolvidas em numerosos processos de sinalização, incluindo a regulação do citoesqueleto de actina, apoptose, transcrição gênica, progressão do ciclo celular e, dentre outros (ETIENNE-MANNEVILLE; HALL, 2002). Além disso, no que diz respeito às interações patógeno-hospedeiro, as RhoGTPases são essenciais para funções de barreira epitelial, contato célula-célula, migração de células imunes, fagocitose e produção de citocinas (JANK; GIESEMANN; AKTORIES, 2007).

1.3 Receptor Proteoglicano de sulfato de condroitina 4 (CSPG4)

A literatura recente indica que a TcdB está mais fortemente associada à gravidade da ICD, apresentando um potencial citotóxico 100 a 1000 vezes superior ao da TcdA. Essas descobertas destacam a TcdB como um fator primordial na gravidade clínica da ICD (POURLIOTOPOLOU *et al.*, 2024). A diferença no potencial citotóxico entre as duas toxinas já havia sido sugerida por Aktories (1997), que a atribuiu a diferenças na densidade

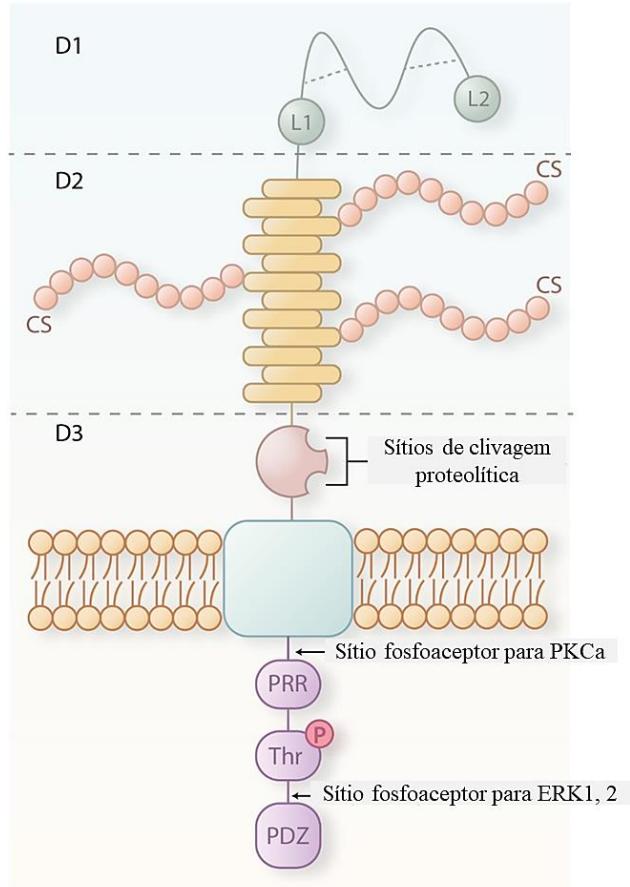
dos receptores específicos das toxinas na superfície celular. Atualmente, os receptores conhecidos para a TcdB incluem Frizzled (1, 2 and 7), Poliovirus-Like Receptor 3 (PVRL3), Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI), Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein 1 (LRP1), e Chondroitin Sulfate Proteoglycan 4 (CSPG4) (TAO *et al.*, 2019; KINSOLVING *et al.*, 2024).

O CSPG4 ou Antígeno neural/glial 2 (NG2), anteriormente denominado proteoglicano de sulfato de condroitina associado ao melanoma (MCSP) ou antígeno de alto peso molecular associado ao melanoma (HMW-MAA) é uma proteína transmembrana codificada pelo cromossomo 15 (HARRER; DÖRRIE; SCHAFIT, 2019). A estrutura glicoproteica do CSPG4 incorpora três sítios de glicosaminoglicanos (GAG) para a ligação do sulfato de condroitina (CS), dando origem a um proteoglicano de 450 kDa (JIANG *et al.*, 2022).

O CSPG4 é composto por um amplo domínio extracelular e domínios transmembrana e citoplasmático mais curtos (Figura 4). A grande parte extracelular é subdividida em três domínios distintos: D1, D2 e D3. O domínio D3, proximal à membrana, é um sítio de ligação globular glicosilado para lectinas, como galectina-3 e P-selectina, bem como para a integrina $\alpha 1\beta 3$. O domínio D2 é composto por 15 repetições específicas de CSPG4 e abriga sítios de ligação de glicosaminoglicano (CS), sítios de ligação de integrina e sítios de ligação de colágeno, além de atuar como um repositório de fatores de crescimento, apresentando-os às tirosina quinases receptoras (RTK) adjacentes. O domínio D1 é o mais distante da membrana e é abundante em resíduos de cisteína que formam ligações dissulfeto N-terminal, que contribuem para a estabilidade da estrutura da proteína. Contém ainda dois domínios de laminina do tipo G, que estão envolvidos em interações com a matriz extracelular. O domínio intracelular, que não possui capacidades catalíticas intrínsecas, apresenta dois sítios de fosforilação de treonina, Thr2256 para a proteína quinase C alfa (PKC α) e Thr2314 para a quinase relacionada ao sinal extracelular (CHEN *et al.*, 2024).

Além disso, dentro do domínio citoplasmático, uma região rica em prolina é considerada responsável pelas interações com proteínas intracelulares. O domínio PDZ localizado na extremidade C-terminal cria sítios de ancoragem para moléculas adaptadoras, como a proteína 1 de domínio multi-PDZ (MUPP1) e a sintenina-1, que, possivelmente apoiadas por uma região rica em prolina, estabelecem uma conexão com o citoesqueleto de actina por meio da formação de um arcabouço proteico (JIANG *et al.*, 2022).

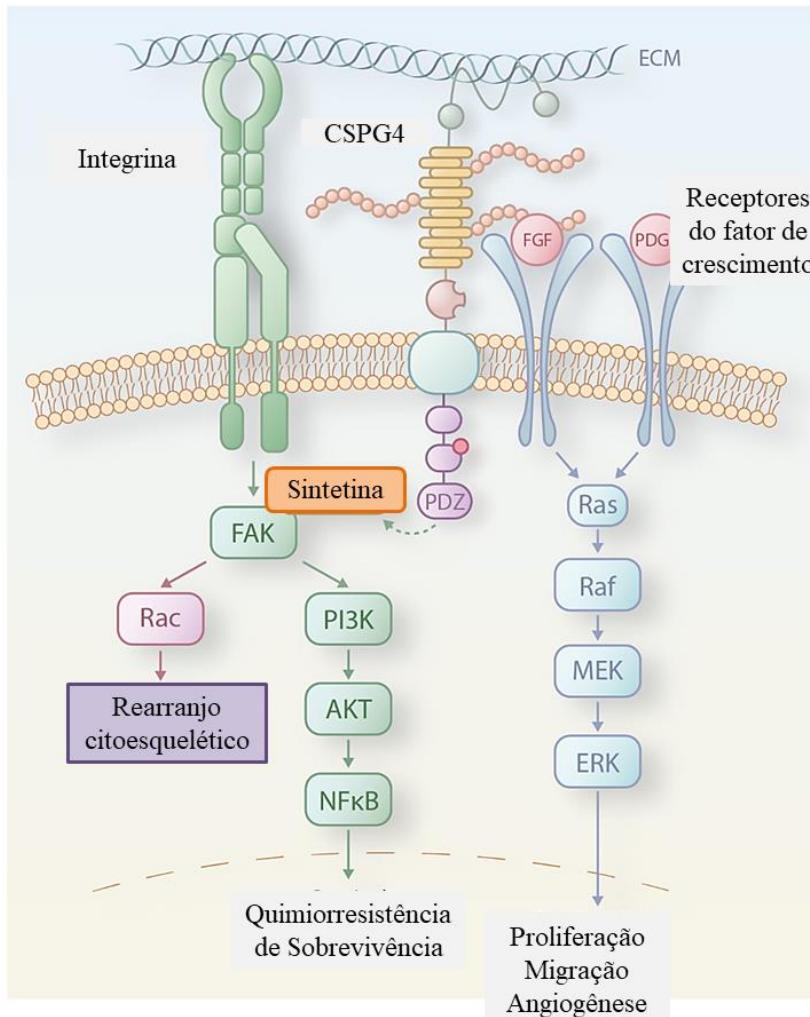
Figura 4. Representação esquemática da estrutura do CSPG4



Adaptado de Chen *et al.* (2024). A região extracelular do CSPG4 consiste em três subdomínios: D1, D2 e D3. D1, estabilizado por ligações dissulfeto (linhas tracejadas), propõe-se a ligar lamininas por meio de uma região LG (L1 e L2). D2 possui 15 sequências repetidas de CSPG e múltiplos sítios de ligação de CS. D3 contém potenciais sítios de clivagem da metaloproteinase da matriz (MMP). Intracelularmente, os principais sítios de fosforilação incluem Thr2252 (PKC- α) e Thr2310 (ERK1/2). A região rica em prolina (PRR) e o motivo de ligação PDZ facilitam as interações com proteínas como a sintenina, MUPP1 e GRIP1.

Duas vias de sinalização principais se ramificam da parte intracelular do CSPG4 (Figura 5). A primeira é a via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), desencadeada diretamente pela ativação de ERK1/2 ou indiretamente por meio de RTKs adjacentes estimulados por fatores de crescimento ligados a CSPG4, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). Em segundo, as interações com integrinas e o citoesqueleto de actina estabelecem uma ligação com a via da quinase de adesão focal (FAK), responsável por detectar alterações na matriz extracelular. É importante ressaltar que a fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K) e a AKT1 também são mediadores a jusante da sinalização de CSPG4 (CHEN *et al.*, 2024).

Figura 5. Interações do CSPG4 com vias de sinalização intracelular.



Adaptado de Chen *et al.* (2024). O CSPG4 ativa duas cascadas de sinalização primárias. Essas interações ocorrem por meio de seu domínio citoplasmático e de duas vias distintas: a via de sinalização da integrina da cinase de adesão focal (FAK) e a via da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK)/proteína cinase regulada por sinal extracelular (ERK). Na via FAK, a proteína Scaffold sintenina facilita a formação do complexo FAK/Src, levando à ativação de Rac e induzindo o rearranjo citoesquelético. O complexo FAK também desencadeia a fosforilação de PI3K e a subsequente ativação de AKT, regulando a atividade transcripcional de NF-κB e promovendo a sobrevivência e a quimiorresistência. Na via MAPK/ERK, juntamente com os receptores do fator de crescimento, o CSPG4 ativa a pequena GTPase RAS, que fosforila MEK e, subsequentemente, ERK, apoiando a migração, a proliferação e a angiogênese.

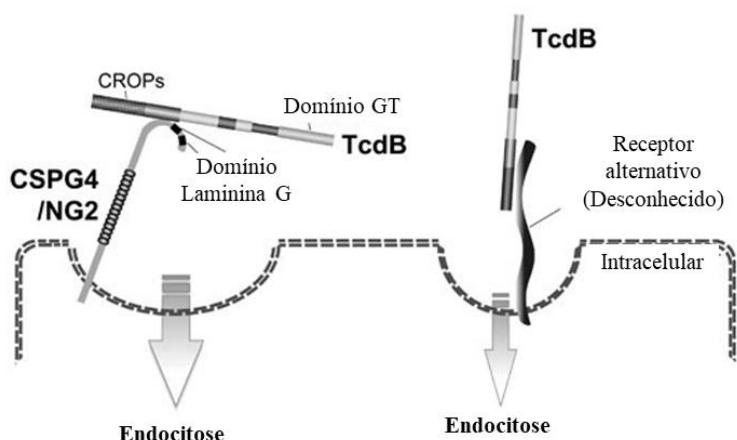
Dentre as funções fisiológicas reportadas ao CSPG4, destacam-se a promoção da proliferação e sobrevivência, mediadas pela sinalização de MAPK e pela apresentação cruzada de fatores de crescimento (ILIEVA *et al.*, 2018). Além disso, com base na interconexão com o citoesqueleto de actina e na ligação a várias integrinas e componentes da

matriz extracelular, o CSPG4 desempenha um papel na motilidade celular e na invasão de tecidos (SCHIFFER *et al.*, 2018).

O CSPG4 é um receptor crucial para a ligação da TcdB à superfície celular, induzindo a desorganização do citoesqueleto e a morte celular. Uma interação direta entre o terminal N de CSPG4 e o terminal C da TcdB foi confirmada, e o peptídeo solúvel do domínio de ligação da toxina do CSPG4 pode proteger as células contra a ação da TcdB. Notavelmente, a perda completa de CSPG4/NG2 reduz a indução de interleucina-8 desencadeada pela TcdB em camundongos, sem afetar significativamente a mortalidade dos animais. Além de que, curiosamente, o domínio citoplasmático do CSPG4 está envolvido na ativação da família Rho GTPases, Rac e Cdc42 e a deficiência de CSPG4 confere resistência celular a TcdB (YUAN *et al.*, 2015).

O CSPG4 medeia a endocitose de TcdB (Figura 6) e os efeitos citopáticos e citotóxicos subsequentes, incluindo a glicosilação de pequenas proteínas da família GTPase Rho, como mencionado anteriormente, que resulta em interrupção e arredondamento celular e morte por células necróticas. No entanto, é provável que exista uma via alternativa independente de CSPG4, o que também pode mediar a endocitose da TcdB. A evidência em apoio a essa via alternativa inclui: (1) A alta concentração de TcdB é capaz de causar arredondamento celular em células deficientes de CSPG4 (HeLa/CSPG4-/e HT29/CSPG4-/-); e (2) alta concentração de TcdB é capaz de desencadear a morte celular em células HeLa/CSPG4 -/- (YUAN *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2021).

Figura 6. Representação esquemática da endocitose de TcdB mediada pelo CSPG4 e por outro receptor alternativo

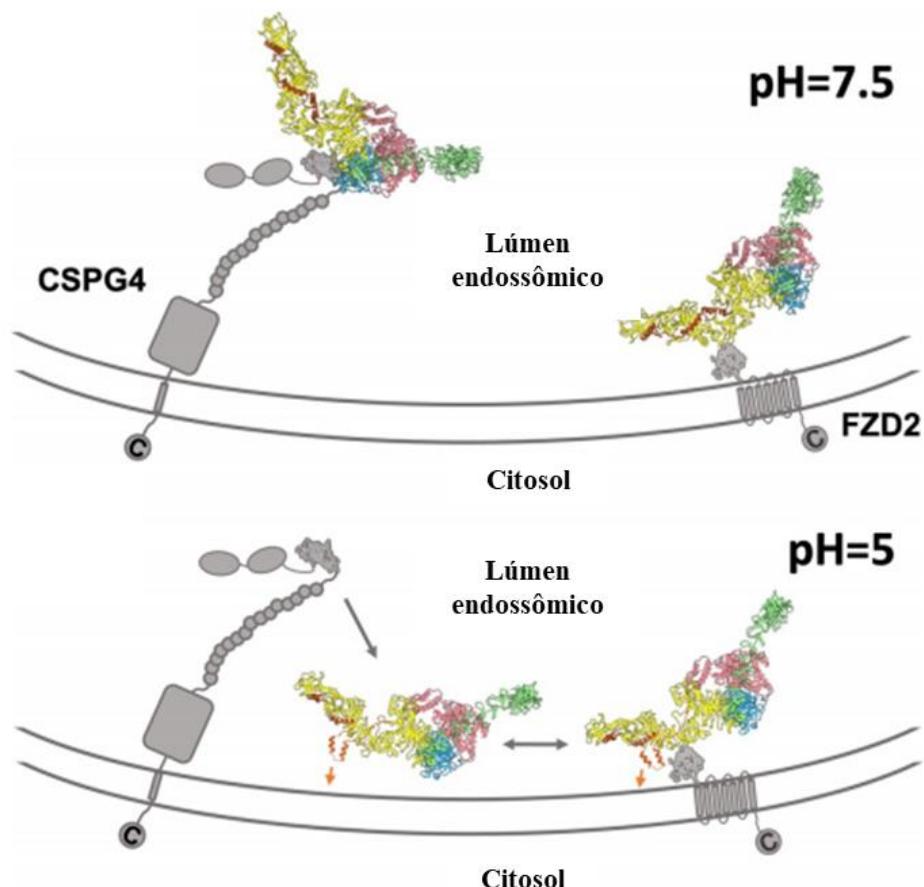


Adaptado de Yuan *et al.* (2015). Tanto o CSPG4 quanto um receptor alternativo desconhecido são capazes de mediar a ligação do TcdB à superfície celular e a internalização.

Para translocar os domínios efetores da TcdB para o citosol, várias hélices formadoras de poros, que estão embutidas no centro do domínio de entrega da TcdB, precisam se aproximar da membrana endossomal para formar poros (Figura 7). O domínio extracelular do CSPG4 é volumoso (aproximadamente 220 kDa para proteínas e aproximadamente 200 kDa para glicanos) e se liga à TcdB por meio do segmento D1401-560, que pode estar a mais de 400 Å de distância da membrana endossomal. No citosol ocorre a acidificação do meio e a TcdB é drasticamente liberado do CSPG4, devido às interações eletrostáticas comprometidas no pH ácido e à desestabilização da região D97 no domínio da entrega da toxina. Se a TcdB ainda estivesse associada ao CSPG4 após a acidificação, ela não conseguiria acessar a membrana endossomal para a formação dos poros. Por outro lado, proteínas frizzled, como a FZD2, possuem um domínio extracelular muito menor (aproximadamente 25 kDa) e se ligam à TcdB no meio de seu domínio de entrega, próximo a essas hélices formadoras de poros (JIANG *et al.*, 2022).

Já está elucidado que a TcdB pode intoxicar células que expressam apenas CSPG4. Uma explicação é que, depois de ser recrutada pelo CSPG4 e dissociada no endossoma após a acidificação, o espaço confinado dentro do endossoma tardio permitirá que o TcdB se difunda frequentemente próximo à membrana endossômica para inserir as hélices de formação de poros sem a ajuda de outro receptor, como o FZD2 (HENKEL *et al.*, 2020).

Figura 7. Modelo esquemático do reconhecimento de CSPG4 e FZD2 por TcdB e sua dissociação após acidificação endosomai



Adaptado de Jiang *et al.* (2022). (A) TcdB (mostrado como um modelo de fita) liga-se aos receptores (desenho cinza), CSPG4 e FZD2, antes da acidificação endossomal. As hélices formadoras de poros propostas de TcdB são mostradas como modelos de fita laranja. (B) TcdB dissocia-se dos receptores e as hélices formadoras de poros se reorganizam. As setas cinzas indicam a dissociação de TcdB. As setas laranja sugerem a inserção de hélices formadoras de poros na membrana endossomal. CSPG4 (proteoglicano 4 de sulfato de condroitina); FZD2 (frizzled-2) TcdB (Toxina B do *Clostridioides difficile*).

Um estudo realizado por Chen e colaboradores (2021) mostrou que em modelo com *knockout* de CSPG4, camundongos infectados com *C. difficile* apresentaram dano colônico reduzido, sugerindo esse receptor como importante alvo para ICD. Ademais, trabalhos que mostram a expressão do CSPG4 nas células gliais entéricas são escassos na literatura, mas são muito importantes, uma vez que a glia entérica é um componente do sistema nervoso entérico (SNE), que exerce funções importantes como modulação da resposta inflamatória, secreção e motilidade e é um dos principais alvos das toxinas do *C. difficile* (COSTA *et al.* 2025).

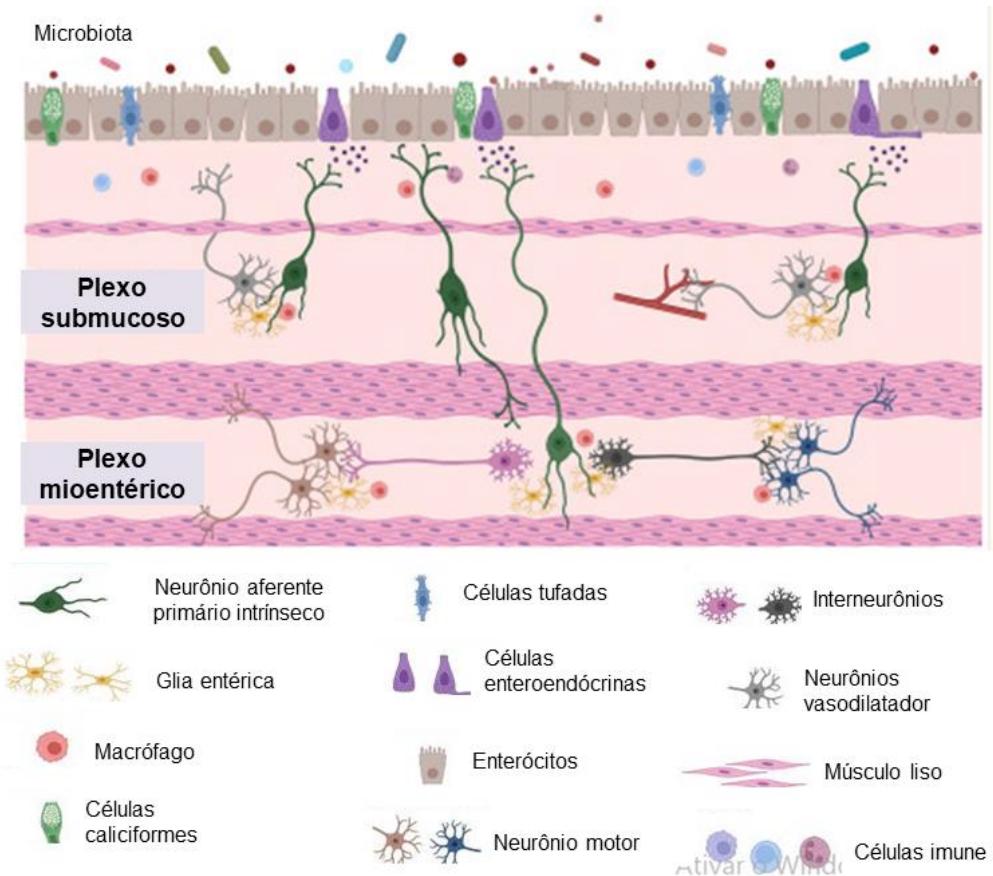
1.4 Sistema Nervoso Entérico (SNE) e as Células Gliais Entéricas (CGEs)

1.4.1 Sistema Nervoso Entérico (SNE)

O trato gastrointestinal (GI) é inervado por um vasto sistema nervoso intrínseco, o sistema nervoso entérico (SNE), que pode funcionar independentemente do sistema nervoso central (SNC), por esse motivo é conhecido como "segundo cérebro". O SNE é a maior e mais complexa divisão do sistema nervoso periférico, estendendo-se da parte superior do esôfago ao esfínter anal interno e conectando-se ao fígado, vesícula biliar, trato biliar e pâncreas (NGUYEN *et al.*, 2023).

O SNE é derivado principalmente de progenitores da crista neural vagal que colonizam o intestino durante o desenvolvimento fetal e se organizam em uma rede interconectada de células nervosas e gliais, que se organizam em gânglios localizados em dois plexos principais: o plexo mioentérico e o plexo submucoso (Figura 8). Os dois plexos ganglionares interconectados envolvem e integram-se à estrutura laminar do trato gastrointestinal. O plexo mioentérico situa-se entre as camadas musculares longitudinal e circular e ao longo de todo o trato gastrointestinal. O plexo submucoso situa-se abaixo da mucosa, mais próximo do lúmen intestinal e nos intestinos delgado e grosso, mas não no estômago ou esôfago (SHARKEY; MAWE, 2023).

Figura 8. Estrutura do Sistema Nervoso Entérico



Adaptado de Sharkey e Mawe (2023). O sistema nervoso entérico é composto pelos plexos mucoso, submucoso e mioentérico. O plexo mucoso, localizado na camada mucosa, é constituído por células gliais entéricas e terminações nervosas. O plexo submucoso pode ser encontrado na camada submucosa próximo à camada muscular circular interna. Enquanto o plexo mioentérico encontra-se entre a camada muscular circular interna e a longitudinal externa. Os plexos submucoso e mioentérico são constituídos por células gliais entéricas e neurônios.

O SNE regula quase todos os aspectos da fisiologia intestinal, como a motilidade GI, a vasodilatação, a absorção, a secreção e a organização dos processos imunorregulatórios e inflamatórios (FLEMING *et al.*, 2020). O plexo mioentérico (PM) coordena os movimentos musculares subjacentes à propulsão do conteúdo, enquanto o plexo submucoso (PS) desempenha um papel na secreção e absorção (SPENCER; HU, 2020).

As células do SNE, especificamente os neurônios entéricos e a glia, são profundamente afetadas pelas toxinas de *C. difficile*. Na fase aguda da doença, a perda de neurônios entéricos e da glia entérica, bem como a hiperatividade de alguns componentes de sua inervação extrínseca e das células do SNE remanescentes, contribui para a inflamação, diarreia secretora e lesão do tecido intestinal. Em adição, na presença de doença grave ou o controle inadequado da infecção pode resultar em alterações na estrutura e função do SNE,

resultando em dismotilidade gastrointestinal persistente mesmo após a infecção inicial (COSTA *et al.*, 2025).

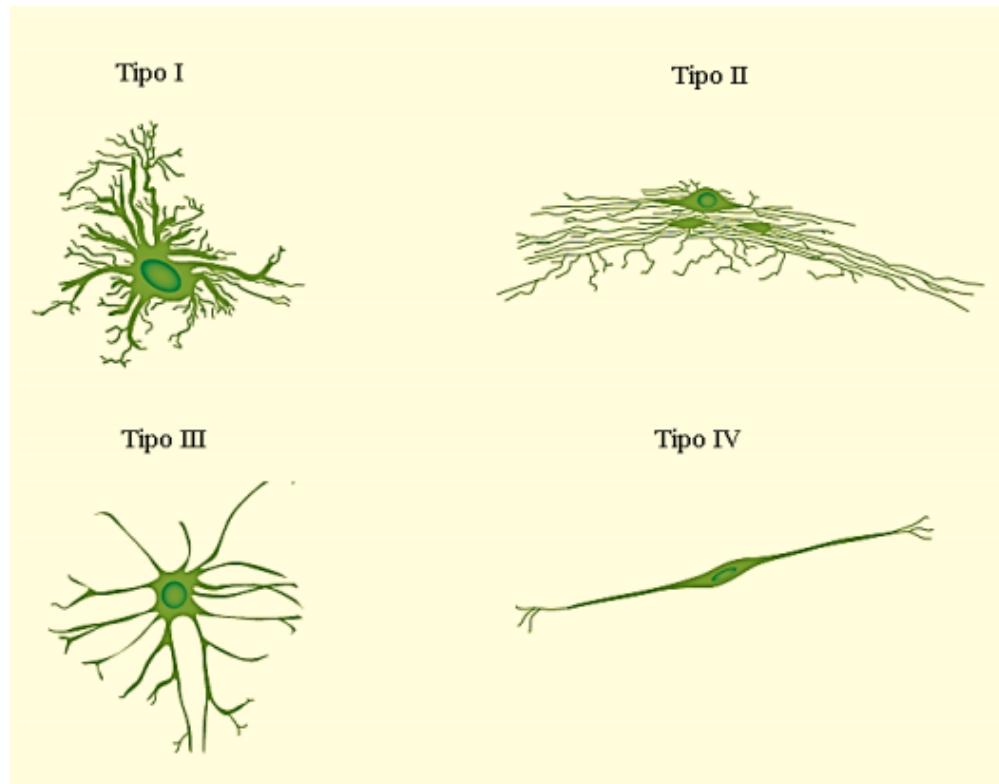
1.4.2 Células Gliais Entéricas

O termo "glia entérica" refere-se coletivamente a toda a neuroglia associada ao SNE, existindo uma heterogeneidade substancial dentro dessa ampla população de células. As células gliais são fenotipicamente 'plásticas' e adaptam suas funções em resposta a estímulos no microambiente para manter a homeostase local. Presumivelmente, os diferentes papéis funcionais e especializações regionais de diferentes órgãos intestinais promovem o desenvolvimento de subpopulações de glia com características únicas (SEGUELLA; GULBRANSEN, 2021). Da mesma forma, a glia entérica contribui para diversos processos patológicos, incluindo neuroinflamação (BROWN *et al.*, 2016), câncer (VALÈS *et al.*, 2019) e infecção (SELGRAD *et al.*, 2009), nos quais a glia adquire fenótipos pró-inflamatórios ou pró-tumorigênicos. Nesses casos, tanto as perdas quanto os ganhos das funções gliais contribuem para a alteração da homeostase do SNE e da fisiopatologia gastrointestinal (SEGUELLA; GULBRANSEN, 2021).

As células gliais entéricas podem ser classificadas de acordo com a sua morfologia (tipo I, II, III ou IV) (Figura 9) (LÓPEZ-GÓMEZ *et al.*, 2021).

A classificação morfológica das células gliais entéricas foi estabelecida por Hanani e Reichenbach (1994). Eles notaram a semelhança estrutural das células gliais entéricas com os astrócitos do SNC e descreveu cada tipo da seguinte forma: Tipo I, células em forma de estrela com muitos processos curtos irregulares e ramificados, o que lembra aos astrócitos do SNC. Localização: Intraganglionar (gânglios entéricos); Tipo II, células com aspecto alongado presentes dentro de feixes de fibras interganglionares, o que leva a esse tipo de célula ter semelhança aos astrócitos fibrosos do SNC. Localização: Localizados dentro ou nos limites do plexo submucoso e mioentérico; Tipo III, apresentam processos de ramificação longos e finos. Localização: Localizados dentro ou nos limites do plexo submucoso e mioentérico e tipo IV, glia associada a fibras nervosas nas camadas musculares circulares longitudinais com uma morfologia bipolar. Localização: Extraganglionar: acompanha as fibras nervosas e circunda os músculos lisos (LÓPEZ-GÓMEZ *et al.*, 2021).

Figura 9. Tipos de células gliais entéricas baseado nos seus aspectos morfológicos

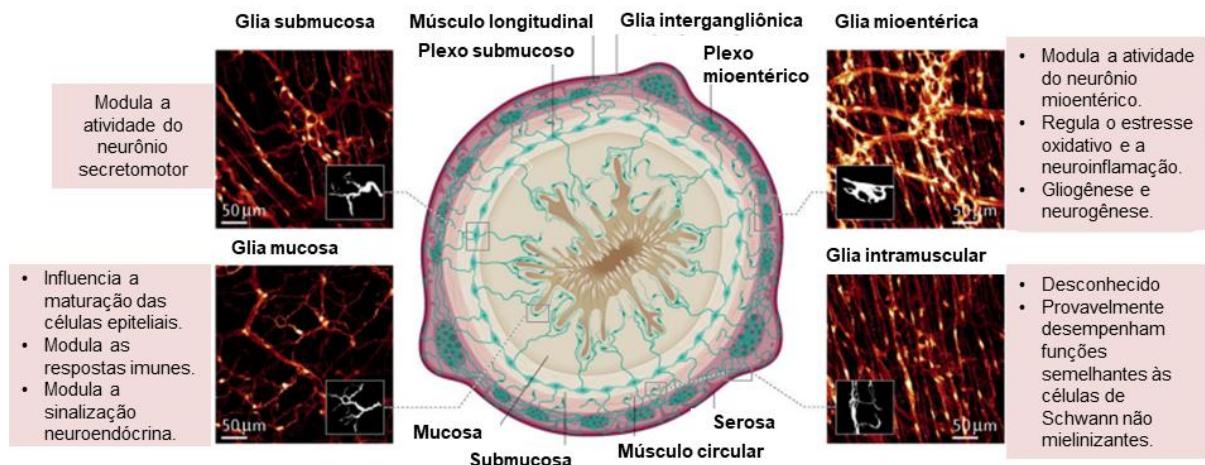


Fonte: Gulbransen e Sharkey (2012).

As células gliais entéricas podem ainda ser classificadas de acordo com a sua localização nas camadas do trato gastrintestinal, que é a mais utilizada, (mucosa, intraganglionica ou intramuscular) (Figura 10) (LÓPEZ-GÓMEZ *et al.*, 2021).

Com base na localização, pelo menos seis tipos principais de glia entérica são identificados em qualquer região do intestino: glia intraganglionar, incluindo glia associada a corpos celulares neuronais nos plexos mioentérico e submucoso (glia mioentérica ou Tipo-IMP e glia submucosa ou Tipo-ISMP); glia interganglionar, localizada dentro de feixes de fibras nervosas que conectam os gânglios mioentéricos (Tipo-II); glia extraganglionar, incluindo glia associada a fibras nervosas no plexo mioentérico e submucoso, mas fora dos gânglios (Tipo-IIIMP/SMP) e na mucosa intestinal (glia mucosa ou TipoIII); e glia associada às fibras nervosas nas camadas musculares circulares e longitudinais (glia intramuscular ou Tipo IV) (Figura 10) (SEGUELLA; GULBRANSEN, 2021).

Figura 10. Classificação das células gliais entéricas de acordo com a sua localização no intestino e funções desempenhadas



Fonte: Adaptado de Seguella e Gulbransen (2021). Principais populações de glia entérica e suas funções fisiológicas conhecidas. Subpopulações locais de glia são definidas com base em sua morfologia, localização anatômica ao longo da parede intestinal e localização dentro ou fora dos gânglios entéricos.

2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

A infecção por *Clostridioides difficile* (ICD) representa hoje um desafio crescente de saúde pública. Tradicionalmente associada a ambientes hospitalares, a ICD vem registrando aumento significativo de casos adquiridos na comunidade, inclusive em indivíduos sem fatores de risco clássicos (KOCIOLEK *et al.*, 2021). Além disso, observa-se uma expansão preocupante da infecção na população pediátrica, grupo anteriormente considerado de menor vulnerabilidade (NOGUEIRA *et al.*, 2024). A pandemia de COVID-19 agravou ainda mais esse cenário, impulsionando o uso indiscriminado de antimicrobianos e, consequentemente, elevando a incidência de disbiose intestinal e infecções oportunistas, como a causada por *C. difficile* (HILVERS *et al.*, 2024).

A ICD configura como a oitava principal causa de readmissão hospitalar nos EUA e a sétima de mortalidade entre todos os distúrbios gastrointestinais (PEERY *et al.*, 2022) e os custos de saúde associados a essa infecção chega a quase US\$ 4 bilhões por ano nos EUA. (JAZMATI *et al.* 2024). No Brasil a incidência pode chegar a 37% quando se leva em consideração os casos suspeitos de diarreia (GIRÃO *et al.*, 2020; BRAGA *et al.*, 2023).

Em decorrência das alterações acarretadas pela ICD, diversas complicações intestinais têm sido relatadas como possíveis sequelas dessa infecção, como síndrome do intestino irritável (SII), doença do refluxo gastroesofágico (DRGE), diarreia funcional, dispepsia e constipação (GUTIÉRREZ *et al.*, 2015). Além disso, sintomas como dor abdominal, constipação, diarreia, SII e dispepsia podem persistir por até dois anos após a resolução da infecção e comprometer significativamente a qualidade de vida dos pacientes (BERLAM *et al.*, 2018).

A glia entérica, que sobrevive aos efeitos citotóxicos da TcdB pode permanecer metabolicamente ativa e entrar em processo de senescênciia. (VETTUCCIARI *et al.*, 2018), consequentemente essas células podem apresentar parada irreversível do ciclo celular, alterações no metabolismo, na morfologia, além de modificações e danos no DNA (LIU *et al.*, 2025). Acrescenta-se que aTcdB está mais fortemente associada com a gravidade da ICD, com um potencial citotóxico 100 a 1000 vezes superior ao da TcdA. Esses achados destacam a TcdB como um fator central na gravidade clínica da ICD, e, portanto, como um objeto de estudo relevante para compreender a patogenicidade da infecção (POURLIOTOPOULOU *et al.*, 2024).

Apesar dos avanços no tratamento da ICD, que incluem o uso de antibióticos específicos (vancomicina, metronidazol e fidaxomicina) e terapias de suporte, ainda persistem

desafios importantes relacionados à elevada taxa de recorrência, complicações intestinais que comprometem a qualidade de vidas dos pacientes (NORMINGTON; CHILTON; BUCKLEY, 2024). Nesse contexto, a identificação de novos alvos terapêuticos e o aprofundamento do conhecimento sobre os mecanismos fisiopatológicos da doença tornaram-se prioridades estratégicas. Desta forma, o receptor de TcdB, CSPG4, destaca-se como um potencial objeto de estudo, uma vez que é um dos mais abundantemente expressos nas células intestinais (CHEN *et al.*, 2021), neurônios e pericitos (MANION *et al.*, 2023) e não há relatos na literatura de sua expressão nas células gliais entéricas.

Desse modo, a presente pesquisa propõe a identificar se a célula glial entérica expressa receptores para as toxinas do *C. difficile* e investigar o papel do CSPG4 na resposta inflamatória, morte celular e senescência promovidos por TcdA e TcdB na glia entérica.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o papel do receptor Proteoglicano Sulfato de Condroitina (CSPG4) na resposta inflamatória, morte celular e senescência induzidas na glia entérica pelas toxinas A (TcdA) e B (TcdB) de *Clostridioides difficile*.

3.2 Objetivos específicos

- Investigar a expressão gênica de diferentes receptores de toxinas de *C. difficile* (*Cspg4*, *Pvrl3*, *Fzd1*, *Lrp1*, *Fzd2*, *Tfpi*, *Fzd7* e *Ldlr*) em células gliais entéricas de camundongos, ratos e humanos;
- Validar a expressão e a distribuição do receptor CSPG4 em células da glia entérica de tecidos colônicos de camundongos e humanos não infectados;
- Avaliar o impacto da exposição às toxinas TcdA e TcdB na expressão gênica desses receptores em células da linhagem enteroglial CRL2690, em diferentes tempos de incubação (2 h, 12 h e 18 h);
- Avaliar se a ICD altera a expressão proteica e a distribuição do CSPG4 no ceco e no cólon de camundongos;
- Investigar o papel do CSPG4 na resposta inflamatória da glia entérica induzida pelas toxinas do *C. difficile* (TcdA e TcdB) *in vitro*;
- Analisar a participação do CSPG4 na morte celular de células gliais entéricas induzida pelas toxinas do *C. difficile* (TcdA e TcdB) *in vitro*;
- Avaliar o envolvimento do CSPG4 na senescência celular induzida pelas toxinas do *C. difficile* (TcdA e TcdB) em células da glia entérica, *in vitro*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Avaliação da expressão gênica de receptores de toxinas de *C. difficile* em células gliais entéricas de camundongos, ratos e humanos

Para investigar o envolvimento do receptor CSPG4 na resposta da glia entérica às toxinas de *C. difficile*. Primeiramente avaliamos se a glia entérica de camundongos ratos e humanos expressam CSPG4, bem como outros receptores conhecidos para toxinas do *C. difficile* (*Cspg4*, *Pvrl3*, *Fzd1*, *Lrp1*, *Fzd2*, *Tfpi*, *Fzd7* e *Ldlr*).

A expressão gênica desses receptores em células gliais entéricas de camundongos e humanos foi identificada por meio de *Single-cell RNA sequencing*, na qual é disponível publicamente no *Single Cell Portal*, realizado em células do plexo mioentérico de amostras colônicas saudáveis (https://singlecell.broadinstitute.org/single_cell) (DROKHLYANSKY *et al.*, 2020). As células gliais entéricas foram selecionadas por meio da expressão gênica de marcadores específicos para essas células (*GFAP*, *SOX10*, *S100B* e *PLP1*).

A avaliação da expressão gênica desses receptores em células gliais entéricas de ratos foi realizado via PCR em tempo real (qPCR) conforme descrito em 4.4.2.

4.2 Avaliação da expressão proteica de CSPG4 e GFAP em ceco e cólon de camundongos e humanos por imunofluorescência

Para essa análise foram utilizados segmentos do intestino grosso de humanos e do ceco e cólon de camundongos (C57BL/6) infectados e não infectados por *C. difficile* (3º dia pós-infecção), armazenados em blocos de parafina que foram cedidos gentilmente pela Universidade de Virginia, Estados Unidos da América (EUA). A metodologia do modelo de infecção em camundongos foi anteriormente descrita por Costa e colaboradores (2021).

Utilizou-se seguimentos intestinais de animais sacrificados três dias após a infecção porque é onde há o pico da inflamação (maior liberação de mediadores inflamatórios), há maior perda de peso e injúria (COSTA *et al.*, 2021).

Segmentos intestinais do ceco e do cólon de camundongos infectados e não infectados por *C. difficile*, bem como do cólon de humanos não infectados, inclusos em parafina, foram cortados em micrótomo, obtendo-se espessuras de 4µm que foram inseridas em lâminas histológicas. Na etapa seguinte, as lâminas contendo os cortes dos tecidos intestinais foram submetidas à desparafinização: inseridas em estufa a 60°C overnight e três banhos em xilog

por 5 min cada. Em seguida, os cortes intestinais foram hidratados com dois banhos de etanol absoluto, um banho em etanol a 95% um banho em etanol a 85%, um banho em etanol a 75% e um banho com etanol 50%, por 3min cada. Ao final desta etapa, os cortes intestinais foram submersos a um banho com PBS 1X por 5 min e foi realizada a recuperação antigênica com tampão citrato (Abcam, pH 6,0) por 10 min em banho Maria (95°C) e logo em seguida as amostras foram incubadas com solução de bloqueio (5%) soro de burro + 0,1% Triton X-100) por 1 h em temperatura ambiente. As amostras foram lavadas em tampão de lavagem (PBS 1X contendo Tween20) por 5 min e em seguida incubadas com anticorpos primário anti-CSPG4 (Abcam, ab275024, 1:400) e anti-GFAP (Abcam, ab4674, 1:500), para colocalizar com as células gliais entéricas, overnight a 4 °C. Decorrido a incubação, as amostras foram lavadas com tampão de lavagem por 5 min, 2 vezes, em temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a incubação com anticorpo secundário anti-coelho 594 (Abcam, ab150064, 1:400) e anti-galinha 488 (Abcam, ab150169, 1:400) por 2 h em temperatura ambiente. Logo, as amostras foram lavadas com PBS 1 X por 5 min e então incubadas com DAPI (Invitrogen, D1306, 1:1000 em PBS 1x) por 5 min. Decorrido o tempo, um novo DAPI foi adicionado e incubado por mais 5 min. Em seguida, as lâminas foram lavadas três com PBS por 5 min. Por fim, as amostras foram montadas com lamínulas usando 30 µL de meio de montagem (um componente do kit de supressão de autofluorescência Vector TrueVIEW).

As imagens foram capturadas por meio de um microscópio de fluorescência acoplado a uma câmera com sistema de aquisição LAZ 3,5 (LEICA DM1000, Alemanha).

Para quantificar a intensidade de fluorescência da proteína de interesse, foi utilizado o programa *ImageJ*.

4.3 Avaliação da expressão proteica de CSPG4 em ceco e cólon de camundongos infectados e não infectados por *C. difficile* por Imunohistoquímica

Segmentos intestinais do ceco e do cólon de camundongos, infectados e não infectados por *C. difficile* (dia 3 após infecção), foram obtidos a partir de blocos de parafina gentilmente cedidos pela Universidade de Virginia (EUA). Os tecidos foram submetidos à desparafinização por meio de três banhos de 5 minutos em xitol, seguidos por hidratação sequencial em soluções de etanol: dois banhos em etanol absoluto, e um banho em etanol a 95%, 85%, 75% e 50%, respectivamente, todos com duração de 3 minutos cada. Após a hidratação, os cortes intestinais foram submersos em PBS 1X por 5 minutos. Em seguida, realizou-se a recuperação antigênica em tampão citrato (DAKO, pH 9,0) por 10 minutos em

banho-maria a 95 °C. Por fim, os tecidos foram lavados novamente com PBS 1X por 5 minutos. Na etapa seguinte, realizou-se o bloqueio da peroxidase com peróxido de hidrogênio a 3% (Sigma) por 30 min. Decorrido este tempo, as lâminas foram lavadas com PBS e foram incubadas com os anticorpos primários anti-CSPG4 por 4h em temperatura ambiente. Para confecção dos controles negativos, os anticorpos primários foram omitidos. Após este período, os cortes foram lavados três vezes com PBS 1X e incubados com polímero (DAKO) por 30 min, exceto no caso do anticorpo anti-CSPG4 que foi incubado como anticorpo secundário anti-rabbit (1:400). Após aincubação com anticorpo secundário, incubou-se os cortes intestinais com o reagente A (biotina) e reagente B (estreptavidina) por 30 min. Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS 1X durante 3 min cada, secadas e aplicado o DAB (DAKO, 3,3-diaminobenzidina, uma gota de DAB para um mL dediluente). DAB é um cromógeno que reage com aperoxidase do antígeno alvo resultando em coloração marrom. Dessa forma, observou-se as lâminas até aparecer uma coloração marrom, após este evento a reação foi parada imediatamente mergulhando-as em água destilada. Enfim, as lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Mayer e processadas para inserir a lamínula.

Imagens das lâminas foram capturadas em um microscópio de luz acoplado a uma câmera com sistema de aquisição LAZ 3,5 (LEICA DM1000, Alemanha).

Para quantificar a área imunomarcada para CSPG4, utilizou-se o programa Adobe Photoshop 8.0 para obter a área total do tecido e a área imunomarcada. Em seguida, para mensurar a porcentagem (%) de área marcada, efetuou-se o seguinte cálculo:

$$\frac{\text{Área imunomarcada (pixels)} \times 100}{\text{Área total (pixels)}}$$

4.4 Estudos *in vitro*

4.4.1 Cultura de células da glia entérica

Os estudos *in vitro* foram realizados com a linhagem de células gliais entéricas imortalizadas obtidas da ATCC (PK060399egfr, CRL 2690). Essas células são aderentes e foram isoladas do plexo mioentérico do jejuno de rato (*Rattus norvegicus*) adulto. Essas células apresentam morfologia e propriedades funcionais semelhantes às células gliais

entéricas primárias de humanos e camundongos (RÜHL, TROTTER, STREMMEL, 2001), o que justifica o seu uso nesse estudo.

As células foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de antibiótico (100 µg/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina) e piruvato de sódio (na concentração final de 1mM), sendo mantidas em incubadora a 37°C e 5% CO². As células que foram utilizadas para a avaliação dos parâmetros deste estudo encontravam-se entre as passagens 10 a 20. Para todos os experimentos, as células foram liberadas dos frascos de cultura por meio da incubação com 0,05% tripsina-EDTA por 5 minutos.

Para todos os ensaios com as toxinas A e B do *C. difficile* foram utilizadas as seguintes concentrações: TcdA (50 ng/mL) e TcdB (1 ng/mL), baseadas em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa (COSTA *et al.*, 2022, 2023; LOUREIRO *et al.*, 2022). Ambas as toxinas são provenientes da TechLab (Virgínia, Estados Unidos), que por sua vez, produzem e purificam essas toxinas produzidas pela cepa de *C. difficile* VPI10463.

Após 2, 12 ou 18 horas de incubação com as toxinas, as células foram coletadas para análise dos parâmetros deste estudo. Para investigar a modulação do CSPG4 na resposta das células à TcdA ou TcdB, as células foram pré-tratadas por 1 hora com 0,001 µg/mL de anticorpo anti-CSPG4 (Abcam, ab275024). A concentração do anticorpo anti-CSPG4 (0.001, 0.01 or 1 µg/mL) foi previamente selecionada com base em um ensaio de ligação Fosfatidilserina-Anexina V em tempo real conforme descrito no item 4.4.4. pelo fabricante (ensaio em tempo real Glo-anexina V apoptosis, Promega, JA1011).

4.4.2 qPCR

Para avaliar como a exposição à TcdA (50 ng/mL) ou TcdB (1 ng/mL) afeta a expressão gênica de diversos receptores dessas toxinas (Cspg4, Pvrl3, Fzd1, Lrp1, Fzd2, Tfpi, Fzd7, Ldlr) em células da glia entérica, realizou-se qPCR, em diferentes tempos de incubação (2, 12 e 18 horas). Para isso, as células gliais (6×10^6 células/poço) foram distribuídas em placas de 6 poços e, após 24 horas, expostas às toxinas nas concentrações indicadas.

Adicionalmente, avaliou-se o envolvimento de CSPG4 na regulação da expressão de *Bcl-2*, *S100B* e *IL-6* em células expostas à TcdA (50 ng/mL) ou TcdB (1 ng/mL). Para esse ensaio, as células foram pré-tratadas com anticorpo anti-CSPG4 (0,001 µg/mL) ou controle isótipo por 1 hora, seguidas da incubação com TcdA ou TcdB por 18 horas.

Após os tratamentos, o RNA total foi extraído usando o kit RNeasy® Mini Handbook por meio do QIAcube (Qiagen). O RNA foi quantificado, tratado com DNase e convertido em cDNA. Para a síntese do cDNA, 1000 ng de RNA foi transcrita reversamente usando o kit de síntese de cDNA iScript (BioRad) após remoção da contaminação do DNA genômico por meio do tratamento das amostras com DNase I (Invitrogen). A amplificação dos genes de interesse (*Cspg4*, *Pvrl3*, *Fzd1*, *Lrp1*, *Fzd2*, *Tfpi*, *Fzd7*, *Ldlr*, *Bcl-2*, *S100B* and *IL-6*) e controle (*Gapdh*) foi realizada por meio do sistema CFX Connect (BioRad), com as seguintes condições: 95 °C por 30 segundos, seguido por 40 ciclos a 95 °C por 5 segundos e 60 °C por 30 segundos. Todas as reações foram realizadas com Supermix iTaquniversal Syber (BioRad). Os conjuntos de *primers* utilizados foram listados na Tabela 1 (ANEXO 1). A expressão relativa de cada gene de interesse foi mensurada pelo método $\Delta\Delta Ct$ (LIVAK E SCHMITTGEN, 2001).

4.4.3 Imunofluorescência

Para avaliar a ativação dos fatores de transcrição NFκB e pSTAT3 (STAT3 fosforilada) e a expressão de CSPG4 na glia entérica exposta à TcdA ou TcdB, realizaram-se ensaios de imunofluorescência para as proteínas de interesse. Células gliais entéricas (4×10^4 células/poço) foram plaqueadas em lâmina de vidro de poliestireno para cultura de células contendo 8 poços. Para investigar o papel de CSPG4, as células foram pré-tratadas com anticorpo anti-CSPG4 (0,001 µg/mL) ou controle (isotipo) uma hora antes da incubação com TcdA (50 ng/mL) ou TcdB (1 ng/mL) por 18h. Após esse tempo, as células foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% diluído em PBS por 30 min em temperatura ambiente e permeabilizadas com solução de permeabilização (Triton X-100 a 0,5% e albumina sérica bovina (BSA) a 3%, em PBS 1X) durante 5 min a 4°C. Em seguida, realizou-se o bloqueio com soro de burro a 5% em PBS 1X durante 30 min em temperatura ambiente e a incubação com os anticorpos primários: anti-CSPG4 (Abcam, ab275024, 1:400), anti-NFκB p65 (Santa Cruz Biotechnology, sc-372, 1:100) ou anti-pSTAT3 (*R&D system*, AF4607, 1:100) overnight a 4°C. Após três lavagens com tampão de lavagem (PBS com 0,01% de Tween20), as células foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com fluoróforo (Jackson Immuno Research, 711-165-152 ou Novus Bio, NB7606) por 2h. Decorrido o tempo, as células foram lavadas com tampão de lavagem e incubadas com o marcador nuclear DAPI (1:1000 em PBS) por 10 min, em temperatura ambiente. Em seguidas as células foram lavadas com PBS 1X e logo as amostras foram montadas com o reagente Antifade Mount Media, contendo faloidina.

As células foram visualizadas por microscopia de fluorescência (Zeiss). Para os ensaios com NFkB e pSTAT3 foram contadas 100 células e a porcentagem de células (%) com imunomarcação nuclear positiva para cada proteína de interesse foi mensurada.

4.4.4 Ensaio de ligação Fosfatidilserina-Anexina V

Foi realizado o ensaio de ligação Fosfatidilserina-Anexina V em tempo real em células vivas conforme descrito pelo fabricante (ensaio em tempo real Glo-anexina V apoptose, Promega, JA1011). Primeiramente, células gliais entéricas (10^4 células/poço) foram cultivadas e plaqueadas em placas brancas e opacas de 96 poços (Falcon). Após 24h, as células foram tratadas com o anticorpo Anti-CSPG4 (0.001 µg/mL). Após 1h de incubação, foram adicionadas as toxinas TcdA (50 ng/mL) ou TcdB (1 ng/mL). Em seguida, adicionaram-se 100 µL de reagente de detecção 2x (2 µL do substrato de anexina NanoBit, 2 µL CaCl₂, 2 µL anexina V-SmBit e 2 µL anexina V-LgBit em 1000 µL de DMEM suplementado pré-aquecido a 37 °C) a cada poço, sendo incubadas a 37 °C numa incubadora umidificada sob 5% CO₂ condição por 18 horas. A luminescência foi mensurada por meio de um luminômetro (Biotek Epoch, PROMEGA). Para a obtenção da Unidade de Luminescência Relativa (URL), o sinal de luminescência de todas as amostras foi subtraído pela luminescência intrínseca do reagente de detecção (poço apenas com DMEM suplementado sem células) e normalizado com o grupo controle (células expostas apenas ao meio de cultivo suplementado).

4.4.5 Atividade das Caspases 3/7

Para avaliar a ativação das Caspases 3 e 7 nas células da glia entérica desafiadas com TcdA ou TcdB, realizou-se um ensaio com um kit de Caspases 3/7 conforme descrito pelo fabricante (Caspase-Glo 3/7, Promega, G8090). Primeiramente, células gliais entéricas (10^4 células/ poço) foram cultivadas e plaqueadas em placas brancas e opacas de 96 poços (Falcon). Após 24 horas, as células foram tratadas com 0.001 µg/mL de Anti-CSPG4 ou meio. Após 1 hora de incubação, a TcdA (50 ng/mL) ou TcdB (1 ng/mL) foram adicionadas. Após 18 horas de desafio com as toxinas do *C. difficile*, adicionaram-se 100 µL de reagente de Caspase-Glo 3/7 (substrato de Caspase-Glo 3/7 reconstituído em tampão de Caspase-Glo 3/7, equilibrado em temperatura ambiente antes do uso) a cada poço, agitou-se a placa num agitador de placas por 30s em 500 rpm e incubou-se por 2 horas em temperatura ambiente,

protegido da luz. A luminescência foi mensurada por meio de um luminômetro (Biotek Epoch, PROMEGA). Para a obtenção da unidade de luminescência relativa (ULR), o sinal de luminescência de todas as amostras foi subtraído pela luminescência intrínseca do reagente de Caspase-Glo 3/7 (poço incubado apenas com DMEM suplementado e reagente de CaspaseGlo 3/7 sem células).

4.4.6 Dosagem dos níveis de S100B

A secreção de S100B por células gliais entéricas expostas à TcdA ou TcdB (na presença ou não de 0,001 µg/mL de Anti-CSPG4) foi investigada com o kit DuoSet S100B (R&D system) por ELISA de acordo com o protocolo do fabricante. Células gliais entéricas (6×10^5 células/poços) foram cultivadas em placas de 6 poços e incubadas com TcdA ou TcdB por 18h. O sobrenadante das células foi coletado (armazenado a -80°C até o uso) e centrifugado (10.000 rpm, 10 min, 4 °C). Após sensibilizar a placa de alta ligação para proteínas (Greiner Bio-One) com o anticorpo de captura overnight e bloquear com solução de bloqueio (BSA 1% em PBS) por 1h, a placa foi incubada com 100 µL de amostra ou proteína S100B, padrão diluído em reagente diluente (50mMTris, 10 mM CaCl₂, 0,15M NaCl, 0,05% Brij35, pH 7,5), por 2h. Após lavagem da placa com tampão de lavagem (Tween 20 0,05% em PBS), foi realizada incubação com 100µL de anticorpo de detecção diluído em reagente diluente por 2h. Em seguida, foi lavada novamente e incubada por 20 min com 100 µL de estreptavidina-HRP. Na etapa seguinte, adicionaram-se 100 µL da mistura de H₂O₂(reagente A) etetrametilbenzidina (reagente B), sendo incubado por 20 min. Após a reação com essa solução, 50 µL de 2NH₂SO₄ (solução de parada) foi acrescentado a cada poço e a absorbância da reação foi mensurada em 450 nm utilizando um leitor de placas Epoch (Biotek). A faixa de detecção da proteína S100B presente nas amostras foi de 397,64 a 1.601,21 pg/mL.

4.4.7 Atividade de β-galactosidase (senescência)

Para avaliar a senescência na glia entérica desafiada com TcdA e TcdB, bem como o papel da modulação do CSPG4 nessa condição, realizou-se ensaios usando o kit CellEvent™ Senescence Green Detection e seguiu-se o protocolo sugerido pelo fabricante.

Células gliais entéricas (4×10^4 células/poço) foram plaqueadas em lâmina de vidro de poliestireno para cultura de células contendo 8 poços. Para investigar o papel de CSPG4, as

células foram pré-tratadas com anticorpo anti-CSPG4 (0,001 µg/mL) ou controle (isotipo) uma hora antes da incubação com TcdA (50 ng/mL) ou TcdB (1 ng/mL). Após uma hora, as células foram desafiadas com as toxinas 24 h. Decorrido o tempo, as toxinas foram removidas dos poços e um novo meio foi adicionado. A cada dois dias foi realizada a troca de meio das células. Foram estudados cinco grupos: 48h após a retirada das toxinas, 72h, 96h, 120h e 6 dias, com o objetivo de investigar a presença de células senescentes em cada um dos tempo. Além disso, foi realizado ensaio com a modulação do CSPG4 para investigar a sua participação no processo de senescência provocado pela TcdA e a TcdB, onde as células foram incubadas com 0,001 µg/mL de Anti-CSPG4 1h antes da incubação com as toxinas.

Para a imunomarcação com o marcador de senescência, β -galactosidase, cada amostra foi incubada com 200 µL da Solução de Trabalho para Detecção de Senescência por 2 horas a 37°C e ao abrigo de luz. Após a incubação, a Solução de Trabalho foi removida e as amostras lavadas com 500 µL de PBS, 3 vezes de 5 min. Posteriormente, as amostras foram incubadas com DAPI (Invitrogen, D1306, 1:1000 em PBS 1x) por 5 min. Decorrido o tempo, um novo DAPI foi adicionado e incubado por mais 5 min. Em seguida, as lâminas foram lavadas três com PBS por 5 min. Por fim, as amostras foram montadas com lamínulas, usando 30 µL de meio de montagem (um componente do kit de supressão de autofluorescência Vector TrueVIEW).

As imagens da imunofluorescência foram capturadas por meio de um microscópio de fluorescência acoplado a uma câmera com sistema de aquisição LAZ 3,5 (LEICA DM1000, Alemanha).

Para quantificar a intensidade de fluoreescênciia para β -galactosidase, foi utilizado o programa *ImageJ*.

4.5 Análise estatística

Todos os resultados quantitativos foram expressos como média aritmética \pm erro padrão da média (EPM). A análise estatística dos dados foi realizada por meio do software GraphPad Prism, versão 10. Para a realização da análise estatística entre os grupos foram utilizados os seguintes testes: Teste T de Student não pareado para a comparação de dois grupos; teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey para comparar mais de dois grupos. O nível de significância adotado foi de 0,05 ($\alpha = 5\%$) e níveis descritivos (p) inferiores a esse valor foram considerados significantes.

5 RESULTADOS

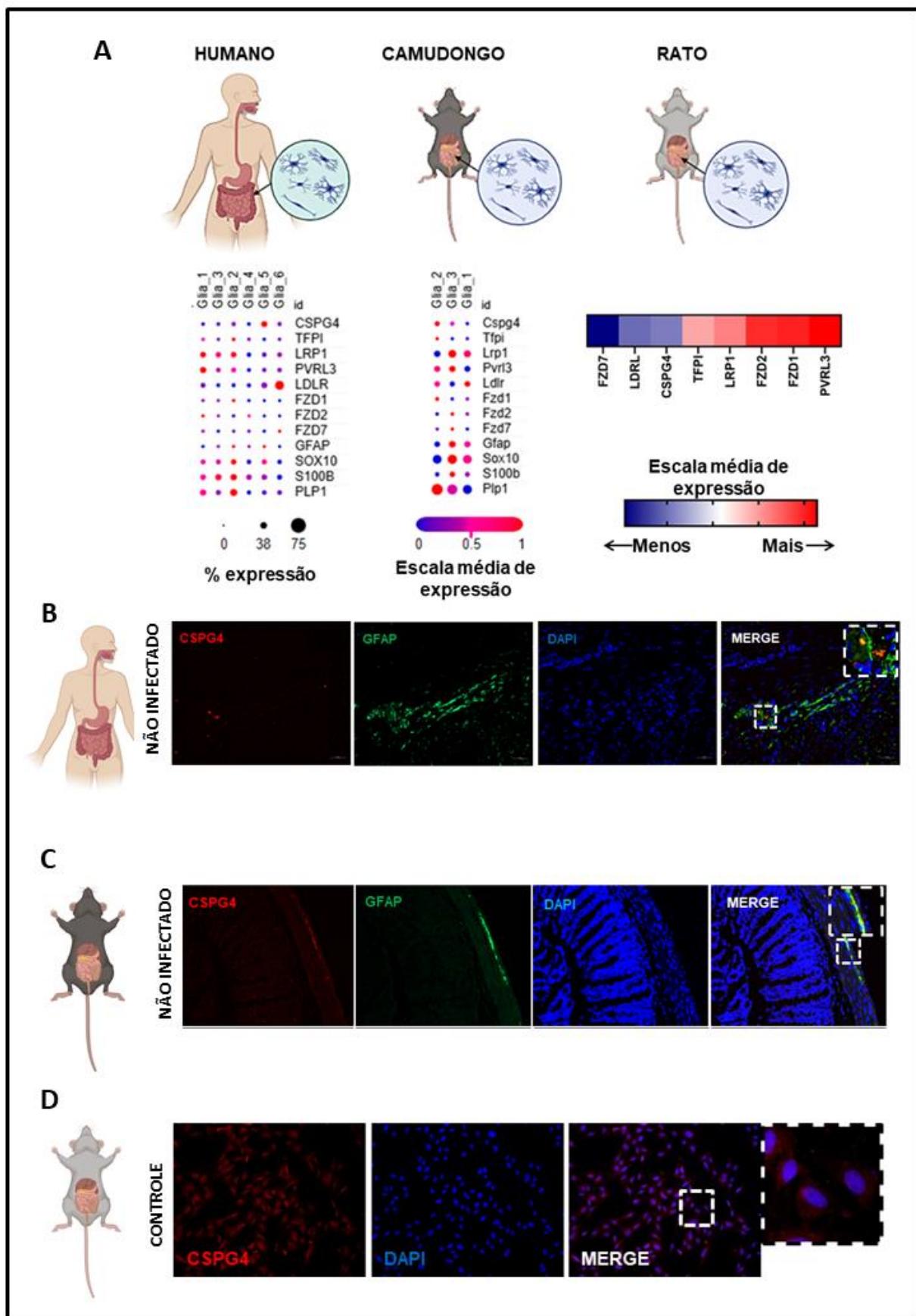
A Figura 11A apresenta a expressão gênica de todos os receptores conhecidos de TcdA (Ldlr) e TcdB (Cspg4, Tfpi, Pvrl3, Lrp1, Fzd1, Fzd2 e Fzd7) na glia entérica de três organismos diferentes: humano, camundongo e rato. Para identificar as células gliais foram utilizados os marcadores *Gfap*, *Sox10*, *S100B* e *Plp1*.

O portal usado para verificar a expressão gênica desses receptores, mostra que em humano há uma maior variedade de células gliais em relação ao camundongo, como podemos ver ainda na Figura 11A que em humanos há 6 tipos de glia, enquanto em camundongos há 3 tipos.

Os 3 organismos, humano, camundongo e rato, expressam todos receptores de TcdA e TcdB. Apesar de variarem na distribuição e no nível de expressão. Os receptores mais expressos em células gliais entéricas de humanos e camundongos são o Cspg4, Lrp1, Pvrl3 e o Ldlr. Em linhagem de células gliais de ratos, os mais expressos são o Pvrl3, Fzd1, Fzd2 e o Lrp1.

Para validar os dados de expressão gênica, foi realizado o ensaio de imunofluorescência (Figura 11B). Conforme apresentado na Figura 11B, CSPG4 é de fato identificado em células gliais entéricas do plexo mioentérico, as quais foram identificadas por meio do seu marcador GFAP, do cólon de camundongos e humanos, assim como em linhagem de células gliais entéricas de ratos. A Figura 11B apresenta a expressão de CSPG4, representada em vermelho, no plexo mioentérico, representado em verde, do cólon humano saudável. A Figura 11C mostra que o CSPG4 (vermelho) também é expresso no plexo mioentérico (verde) do cólon de camundongos. A Figura 11D representa a expressão do CSPG4 (vermelho) em linhagens de células gliais de ratos cultivadas in vitro, na qual se confirma a presença desse receptor.

Figura 11. A glia entérica de humano, camundongo e de rato expressa todos os receptores de toxinas do *C. difficile* atualmente conhecidos

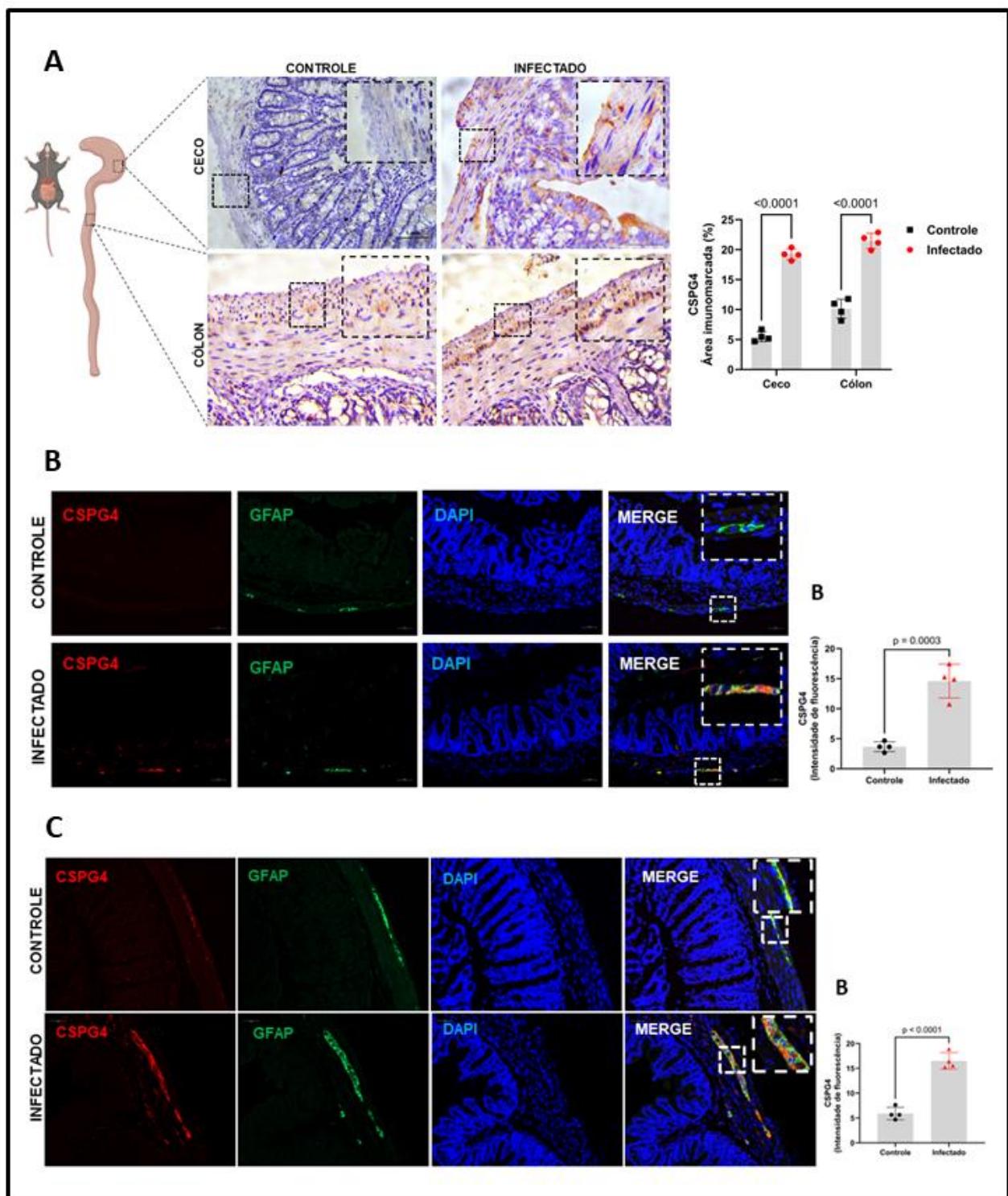


(A) Expressão gênica dos receptores da toxina *C. difficile*: Cspg4, Tfpi, Lrp1, Pvrl3, Fzd1, Fzd3, Fzd7 e Ldlr em células gliais entéricas humanas e de camundongo, obtidas através do Single-Cell Portal. A imagem também mostra a expressão desses receptores em linhagens de células gliais entéricas de ratos cultivadas *in vitro*. (B) Imunofluorescência mostrando a marcação de CSPG4 (vermelho) no plexo mioentérico (verde), onde as células gliais entéricas estão localizadas, do cólon humano. (C) Imunofluorescência mostrando a marcação de CSPG4 (vermelho) no plexo mioentérico (verde) do cólon de camundongos. (D) Imunofluorescência mostrando a marcação de CSPG4 (vermelho) em linhagens de células gliais entéricas (EGC/PK060399) cultivadas *in vitro*. As imagens foram obtidas em uma escala de 50 μ m (o zoom das imagens tem uma ampliação de 400x).

As análises imunohistoquímicas de tecidos do ceco e do cólon de camundongos, infectados ou não por *C. difficile*, revelam a presença de células imunopositivas para CSPG4 no plexo mioentérico, mesmo na ausência de infecção. No entanto, a imunomarcação é acentuadamente aumentada nos animais submetidos à ICD (Figura 12A). No ceco, a expressão do receptor aumenta cerca de 3x mais no grupo infectado em relação ao grupo controle. No cólon, a expressão proteica aumenta cerca de 2x mais.

Para verificar se a expressão de CSPG4 está aumentada em células gliais entéricas, que é um dos componentes celulares do plexo mioentérico, *in vivo* durante a infecção realizou-se imunofluorescência em amostras do ceco (Figura 12B) e do cólon (Figura 12D) confirmam esses achados. Conforme observado na Figura 12B e 12C, glia entérica positiva GFAP e CSGP4 são identificadas no plexo mioentérico de animais infectados pelo *C. difficile*.

Figura 12. A ICD aumenta a imunocoloração de CSPG4 no plexo mioentérico do ceco e cólon de camundongos



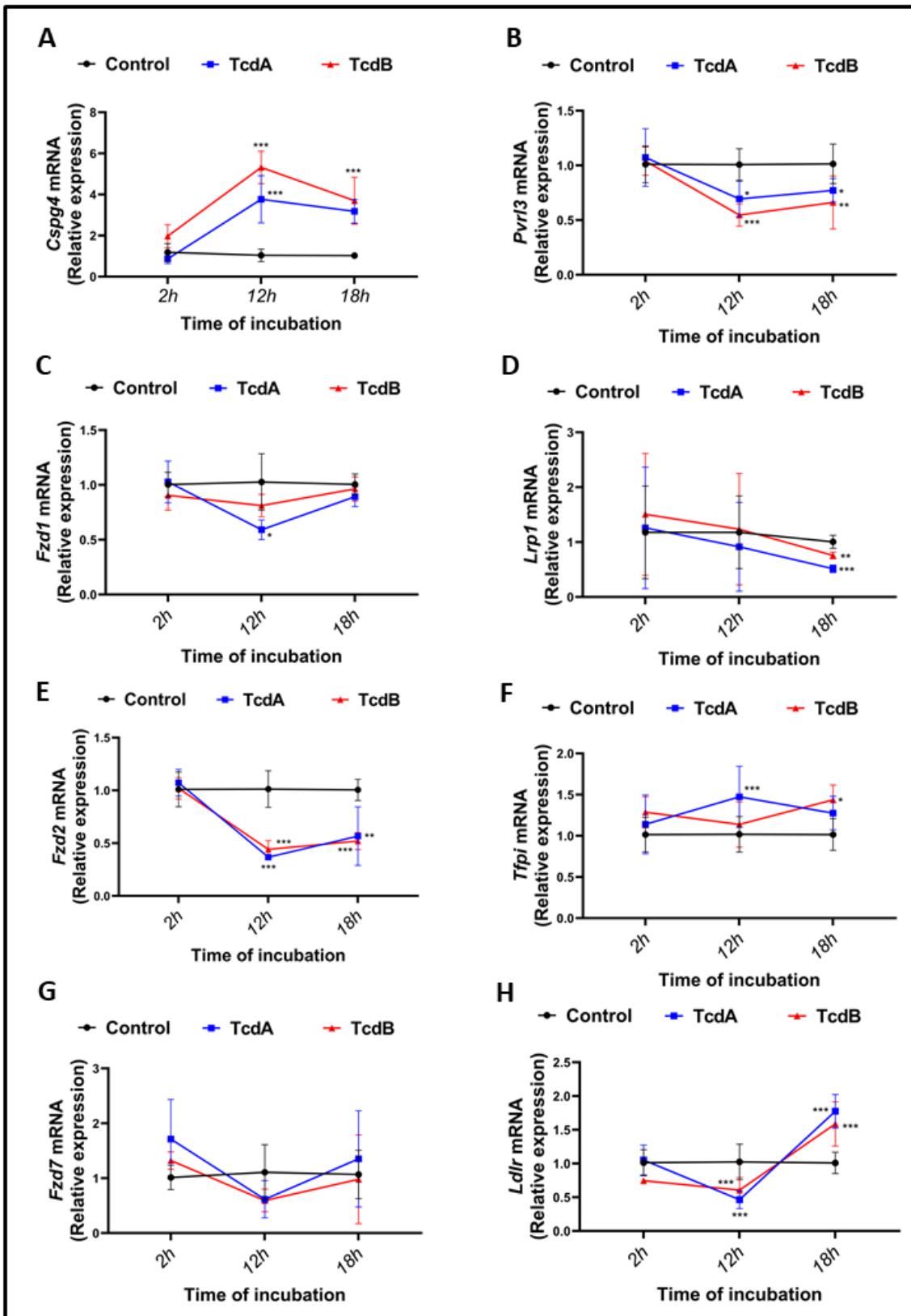
A imunocoloração de CSPG4 foi avaliada por imuno-histoquímica e imunofluorescência no plexo mioentérico do ceco e cólon de camundongos infectados com *C. difficile* (3º dia pós-infecção). (A) Imuno-histoquímica com coloração de CSPG4 no ceco e cólon de camundongos não infectados e infectados por *C. difficile*. Observamos nas imagens que a infecção promove um aumento na imunocoloração de CSPG4 (marrom) no plexo mioentérico

(área quadriculada), tanto no ceco quanto no cólon dos camundongos. As imagens foram obtidas em uma escala de 50 μ m (o zoom das imagens tem uma ampliação de 400x). (B) Imunofluorescência do ceco de camundongos não infectados e infectados por *C. difficile*, mostrando aumento da marcação de CSPG4 (vermelho) no plexo mioentérico (verde). (C) Imunofluorescência do cólon de camundongos não infectados e infectados com *C. difficile*, mostrando aumento da marcação de CSPG4 (vermelho) no plexo mioentérico (verde). Para análise estatística, foi utilizado o teste ANOVA unidirecional seguido pelo teste de Tukey.

A Figura 13 mostra a expressão gênica de diversos receptores de TcdA e TcdB (Cspg4, Pvrl3, Fzd1, Lrp1, Fzd2, Tfpi, Fzd7, Ldlr) na glia entérica após a incubação com TcdA (50ng/mL) e TcdB (1ng/mL) por 2h, 12h and 18h. O grupo controle corresponde às células incubadas apenas com o meio de cultura.

Podemos observar que a expressão gênica dos receptores muda dependendo do tempo de incubação com as toxinas e que nenhum deles sofre alterações na expressão com 2h de incubação. O receptor CSPG4, mostrado na Figura 13A, aumenta consideravelmente a sua expressão após 12h de incubação com ambas as toxinas e diminui após 18h, mas ainda continua aumentada em relação ao grupo controle. Em contrapartida, o receptor Pvrl3 (Figura 13B) diminui sua expressão com 12h e permanece diminuída após 18h de incubação com ambas as toxinas. O Fzd1 (Figura 14C) tem a sua expressão diminuída após 12h de incubação com a TcdA e não aumenta mesmo após 18h. A TcdB não provoca nenhum efeito significativo. A expressão do Lrp1 (Figura 13D) permanece inalterada com 2h e 12h, mas com 18h as toxinas A e B diminuem a sua expressão. Similar ao Pvrl3, o Fzd2 (Figura 13E) tem a sua expressão diminuída com a incubação com ambas as toxinas por 12h e permanece diminuída com 18h. A TcdA induz a superexpressão do Tfpi (Figura 13F) com 12h, mas não com 18h de incubação. Já a TcdB influencia na sua expressão apenas com 18h. O receptor Fzd7 (Figura 13G) não sofre alterações de expressão com nenhuma das toxinas e em nenhum tempo de incubação. Por fim, o Ldlr (Figura 13H) diminui a expressão com as duas toxinas no tempo de incubação de 12h e aumenta, em relação ao controle, com 18h, com ambas as toxinas.

Figura 13. A expressão gênica dos receptores do *C. difficile* muda de acordo com o tempo de incubação com a TcdA e TcdB na glia entérica

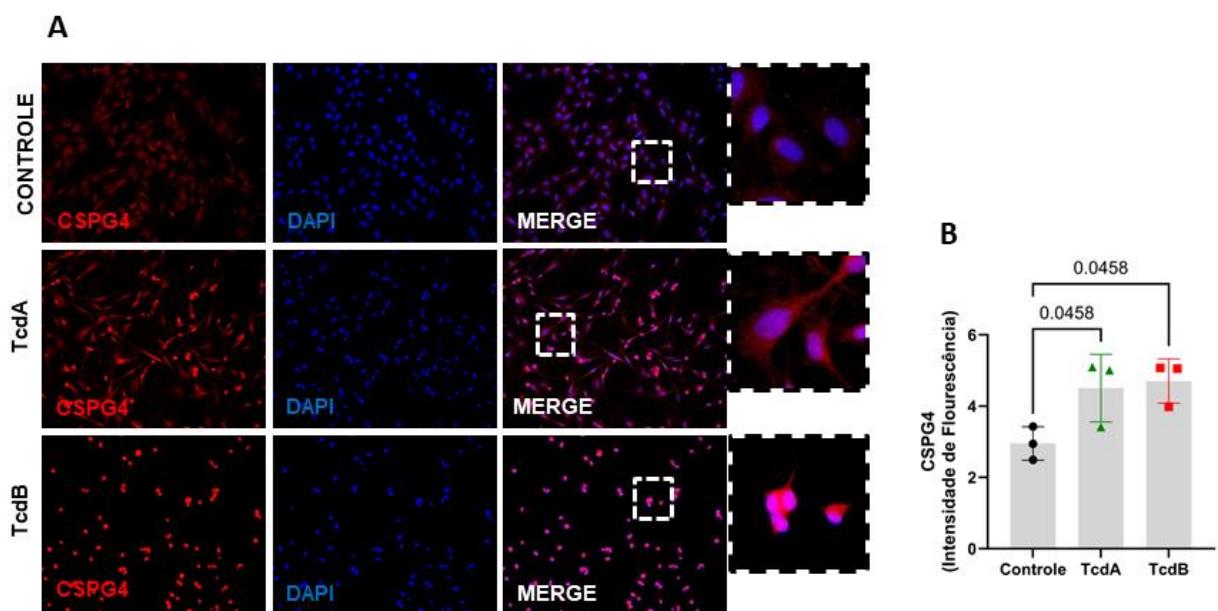


Expressão gênica dos receptores de toxina do *C. difficile*: Cspg4, Tfpi, Lrp1, Pvrl3, Fzd1, Fzd3, Fzd7 e Ldlr em linhagens de células gliais entéricas (EGC/PK060399) cultivadas in vitro, não desafiadas (células incubadas apenas com meio) e desafiadas com toxina TcdA (50 ng/mL) e TcdB (1 ng/mL) por 2h, 12h e 18h. (A) Cspg4. (B) Pvrl3. (C) Fzd1. (D) Lrp1. (E) Fzd2. (F) Tfpi. (G) Fzf7. (H) Ldlr. Gapdh foi usado como controle. Para análise estatística, foi usado o teste ANOVA unidirecional seguido do teste de Tukey. * $p<0,05$, ** $p<0,001$ e *** $p<0,0001$.

A expressão proteica do CSPG4 (Figura 14A) confirma que a glia entérica expressa o receptor CSPG4 de forma constitutiva. No entanto, essa expressão é acentuada quando as células são expostas tanto à TcdA quanto à TcdB.

Em consonância com os dados qualitativos apresentados na Figura 14A, a quantificação da intensidade de fluorescência da imunomarcação do CSPG4 (Figura 14B), demonstrou que a TcdA e a TcdB aumentam de forma significativa os níveis do CSPG4 em células gliais entéricas quando comparado ao grupo controle.

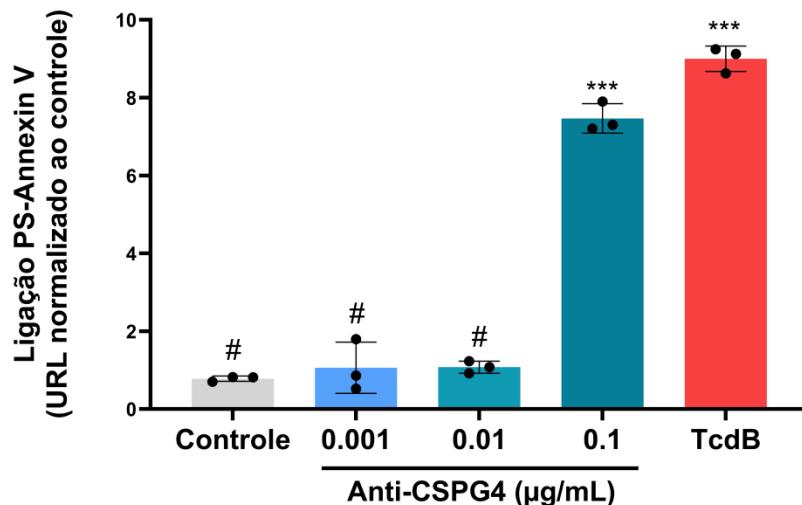
Figura 14. As toxinas A e B do *C. difficile* induzem aumento da imunocoloração de CSPG4 na glia entérica



As toxinas A (50 ng/mL) e B (1 ng/mL) do *C. difficile* induzem aumento da expressão proteica de Cspg4 em células gliais entéricas (EGC/PK060399) por um período de incubação de 18 h. (A) Representa a análise qualitativa da imunocoloração de CSPG4 (vermelho) em células gliais entéricas cultivadas in vitro e DAPI (azul) usada para coloração nuclear. (B) Representa a quantificação da intensidade média de fluorescência da imunocoloração de CSPG4, medida usando o software Zeiss. As imagens sobrepostas (MERGE) são mostradas nos painéis da direita, onde foram obtidas em uma escala de 50 μm (o zoom das imagens tem uma ampliação de 400x). ANOVA unidirecional seguida pelo teste de Tukey foram usadas para análise estatística.

A Figura 15 apresenta os resultados do experimento realizado para determinar a concentração adequada do anticorpo anti-CSPG4 a ser utilizada nos ensaios subsequentes. Células gliais entéricas foram incubadas com diferentes concentrações do anticorpo, e a viabilidade celular foi avaliada. Observou-se que as concentrações de 0,001 e 0,01 µg/mL não induziram morte celular, enquanto a concentração de 0,1 µg/mL promoveu morte significativa das células. Com base nesses dados, a concentração de 0,001 µg/mL foi escolhida para os experimentos posteriores.

Figura 15. Avaliação da morte celular de células gliais entéricas incubadas com diferentes concentrações de Anti-CSPG4



As células gliais entéricas foram tratadas com anticorpo anti-CSPG4 (0,001, 0,01 ou 0,1 µg/mL) and TcdB (1 ng/mL) por 18 horas. O TcdB foi usado como controle positivo para morte celular. Unidade relativa de luminescência (URL). Para análise estatística, utilizou-se o teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey. ***p<0,0001 comparado ao grupo controle e #p<0,0001 versus o grupo TcdB.

Em seguida, investigou-se se o CSPG4 contribui para a expressão de *IL-6* (interleucina-6) e S100B, aos quais são importantes mediadores associados a patogênese da ICD e produzidos pela glia entérica, promovidos pelas toxinas do *C. difficile* (TcdA e TcdB) (COSTA *et al.*, 2021).

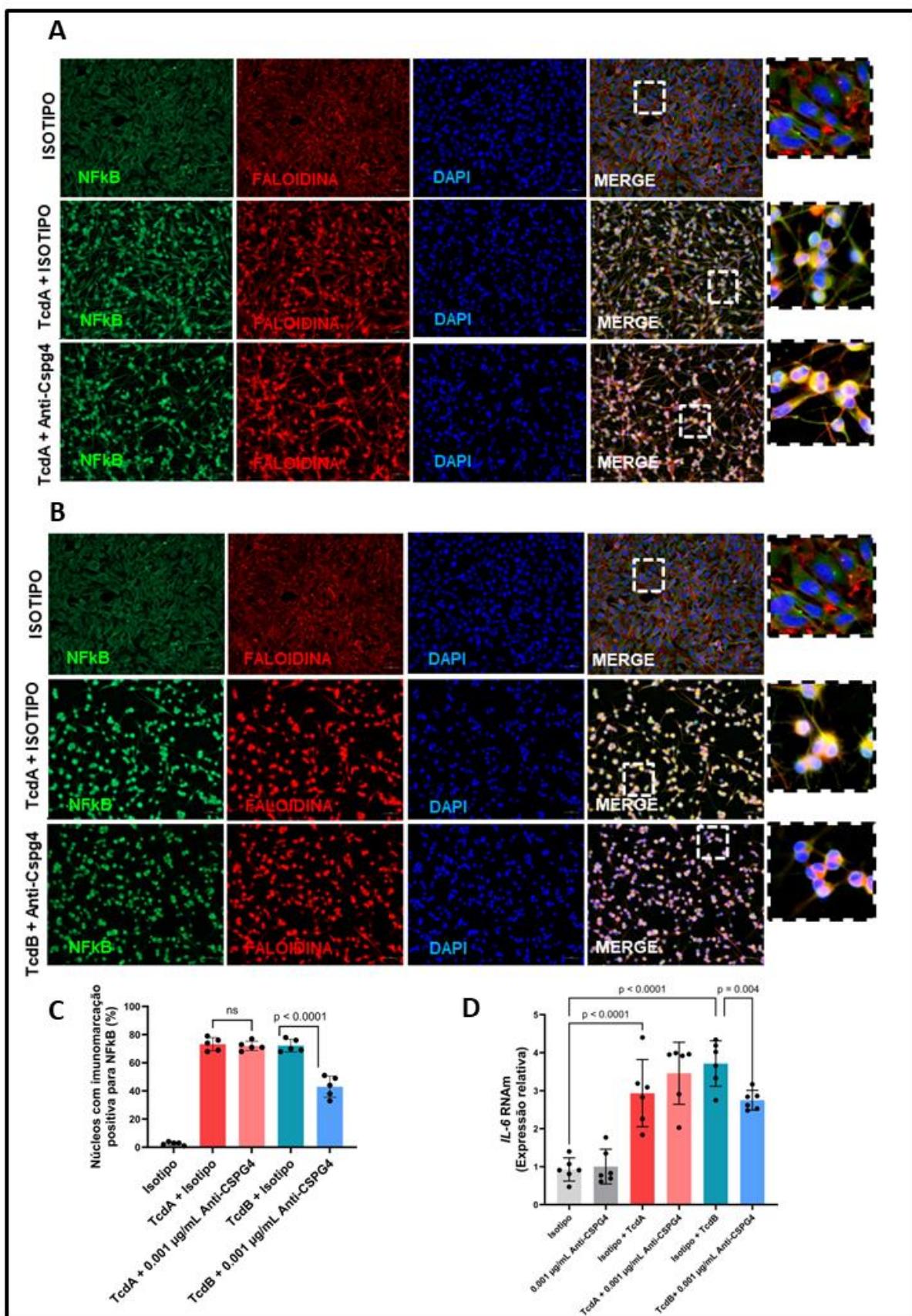
O presente estudo demonstrou um aumento significativo da translocação nuclear do fator de transcrição NFκB (Fator Nuclear Kappa B) em células gliais entéricas em resposta à exposição às toxinas TcdA e TcdB (Figuras 16A e 16B).

A Figura 16A e C mostram que o bloqueio do receptor CSPG4 não interfere na translocação de NFκB induzida por TcdA. Em contraste, a Figura 16B e C revelam que a

inibição de CSPG4 reduz parcialmente a translocação nuclear de NF κ B em células expostas à TcdB, sugerindo que esse receptor participa da ativação dessa via de sinalização especificamente em resposta à TcdB.

Além disso, o bloqueio de CSPG4 resultou em regulação negativa da expressão de IL-6 nas células tratadas com TcdB, mas não naquelas expostas à TcdA (Figura 16D).

Figura 16. O bloqueio do CSPG4 promove a diminuição da translocação nuclear do NFkB induzida por TcdB e a diminuição da expressão gênica de IL-6

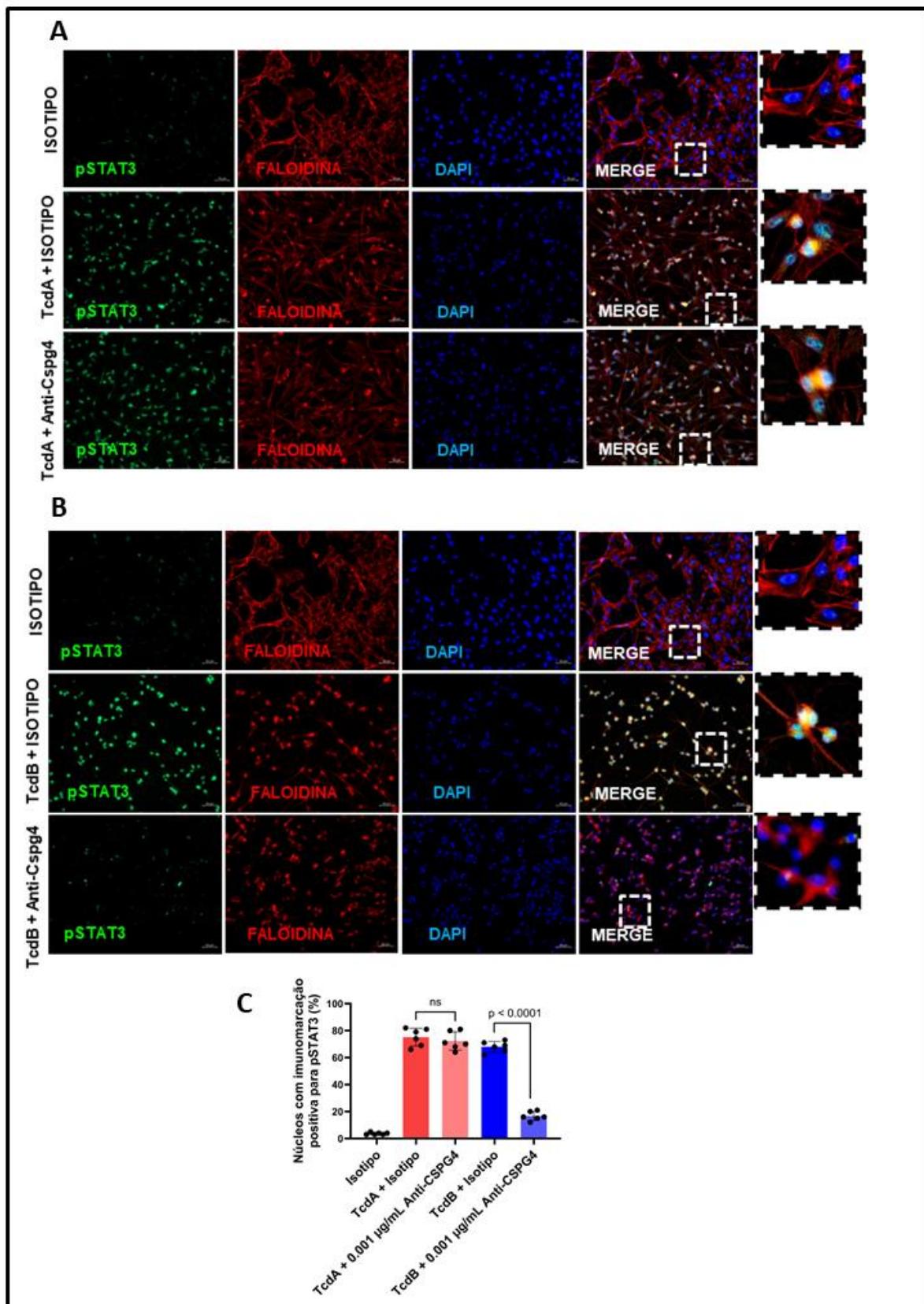


O bloqueio de CSPG4 previne parcialmente a ativação de NFκB induzida por TcdB de *C. difficile*, mas não por TcdA, na glia entérica. (A) Imunofluorescência para NFκB (verde) em célula glia entérica (EGC/PK060399) em três grupos diferentes: isótipo, usado como controle; grupo TcdA + isótipo, incubado com 50 ng/mL de toxina A; e grupo TcdA + Anti-CSPG4, incubado com 50 ng/mL de toxina e 0,001 µg/mL de Anti-CSPG4. Podemos observar que TcdA promove a translocação nuclear de NFκB e que o bloqueio do receptor CSPG4 não é capaz de impedir a translocação desse fator de transcrição para o núcleo. O citoplasma é corado com faloidina (vermelho) e o núcleo é corado com DAPI (azul). A MERGE representa a sobreposição das imagens. (B) Imunofluorescência para NFκB (verde) em célula glia entérica (EGC/PK060399) em três grupos diferentes: isótipo, usado como controle; grupo TcdB + isótipo, incubado com 1 ng/mL de toxina A; e grupo TcdB + Anti-CSPG4, incubado com 1 ng/mL de toxina e 0,001 µg/mL de Anti-CSPG4. Podemos observar que o TcdB promove a translocação nuclear do NFκB e que o bloqueio do receptor CSPG4 é capaz de impedir parcialmente a translocação desse fator de transcrição para o núcleo. O citoplasma é corado com faloidina (vermelho) e o núcleo é corado com DAPI (azul). A MERGE representa a sobreposição das imagens. (C) Análise quantitativa da translocação nuclear de NFκB (D) Expressão gênica de IL-6 avaliada por qPCR em células gliais entéricas (EGC/PK060399) incubadas com TcdA (50 ng/mL) e TcdB (1 ng/mL) por 18 h, na presença ou ausência de 0,001 µg/mL de anti-CSPG4. GAPDH foi usado como controle. Podemos observar que o anti-CSPG4 diminui a expressão gênica de IL-6 promovida por TcdB. Para análise estatística, foi utilizado o teste ANOVA unidirecional seguido do teste de Tukey. As imagens foram obtidas em uma escala de 50 µm (o zoom das imagens tem uma ampliação de 400x).

De forma semelhante ao observado para o NFκB, a ativação do fator de transcrição STAT3 também foi avaliada. As Figuras 17A e 17B mostram um aumento na imunomarcação nuclear de STAT3 nos grupos expostos à TcdA e TcdB, em comparação ao controle (isótipo).

O bloqueio do receptor CSPG4 não interferiu na translocação nuclear de STAT3 induzida pela TcdA (Figura 17A e C). Por outro lado, nas células tratadas com TcdB, a inibição de CSPG4 resultou em uma redução considerável no número de núcleos STAT3-positivos (Figura 17B e C), sugerindo que esse receptor também atua como modulador da via do STAT3, especificamente em resposta à TcdB, na glia entérica.

Figura 17. O bloqueio do CSPG4 promove a diminuição da translocação nuclear do pSTAT3 induzida por TcdB



O bloqueio de CSPG4 previne significativamente a ativação de pSTAT3 induzida por TcdB, mas não induzida por TcdA, em células gliais entéricas de *C. difficile*. (A) Imunofluorescência para pSTAT3 (verde) em células gliais entéricas (EGC/PK060399) em três grupos diferentes: isotipo, usado como controle; grupo TcdA + isotipo, incubado com 50 ng/mL de toxina A; e grupo TcdA + Anti-CSPG4, incubado com 50 ng/mL de toxina e 0,001 µg/mL de Anti-CSPG4. Podemos observar que TcdA promove a translocação nuclear de pSTAT3 e que o bloqueio do receptor CSPG4 não é capaz de impedir a translocação desse fator de transcrição para o núcleo. O citoplasma é corado com faloidina (vermelho) e o núcleo é corado com DAPI (azul). MERGE representa a sobreposição das imagens. (B) Imunofluorescência para célula glia entérica pSTAT3 (verde) (EGC/PK060399) em três grupos diferentes: isotipo, usado como controle; grupo TcdB + isotipo, incubado com 1 ng/mL de toxina A; e grupo TcdB + Anti-CSPG4, incubado com 1 ng/mL de toxina e 0,001 µg/mL de Anti-CSPG4. Podemos observar que o TcdB promove a translocação nuclear do pSTAT3 e que o bloqueio do receptor CSPG4 é capaz de impedir consideravelmente a translocação desse fator de transcrição para o núcleo. O citoplasma é corado com faloidina (vermelho) e o núcleo é corado com DAPI (azul). O MERGE representa a sobreposição das imagens. (C) Análise quantitativa. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA unidirecional seguido do teste de Tukey. As imagens foram obtidas em uma escala de 50 µm (o zoom das imagens tem uma ampliação de 400x).

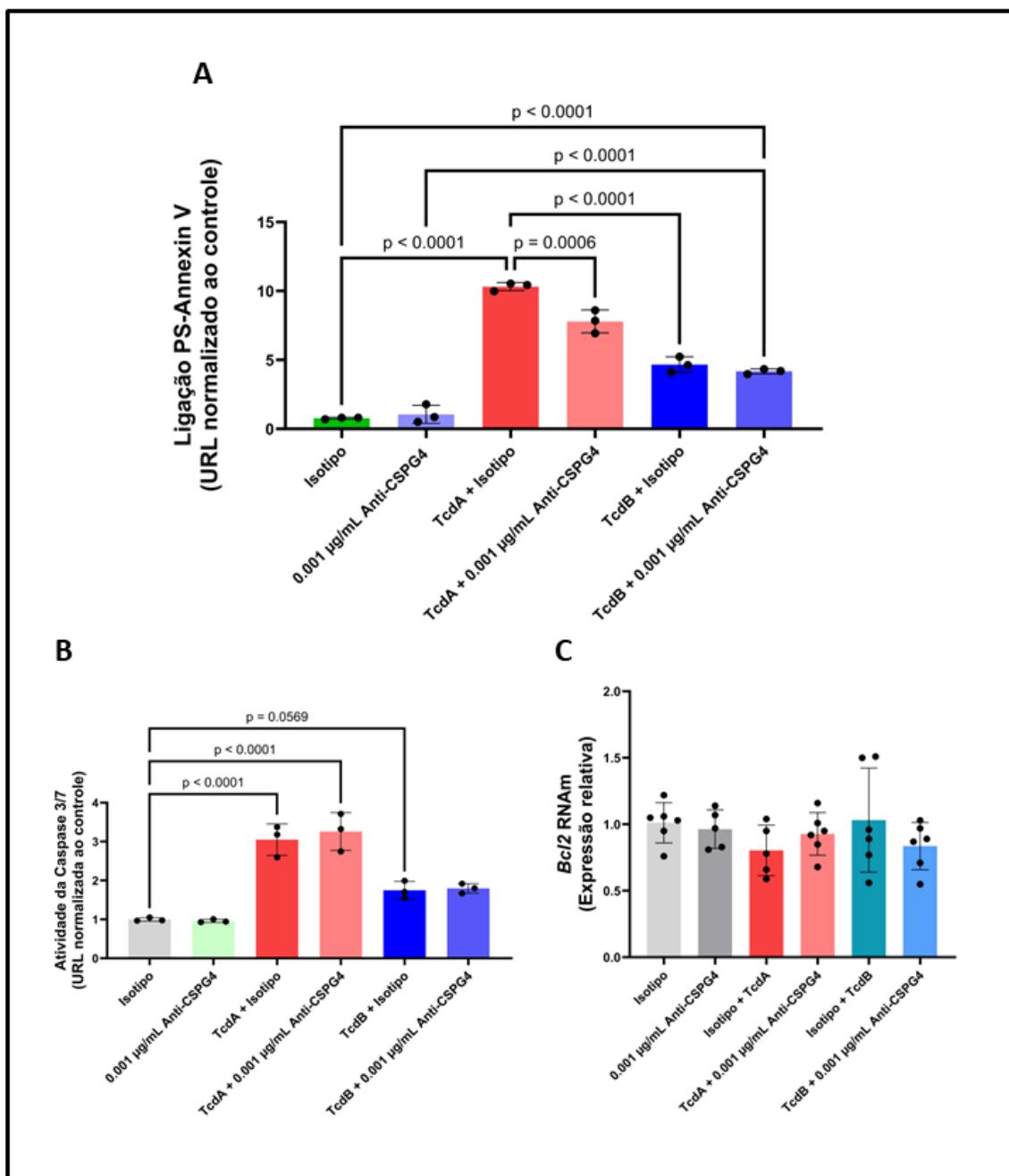
Além da ativação de vias inflamatórias, avaliou-se também o impacto das toxinas na viabilidade celular. Conforme mostrado na Figura 18A, ambas as toxinas de *C. difficile* aumentaram a ligação de FS-Anexina V nas células da glia entérica, em comparação ao grupo controle (isótipo), indicando maior ocorrência de morte celular. Notavelmente, o bloqueio do receptor CSPG4 atenuou a morte celular induzida pela TcdA, mas não teve efeito sobre a induzida pela TcdB, sugerindo um papel diferencial desse receptor na mediação da apoptose frente às toxinas.

Dando continuidade à análise da morte celular induzida pelas toxinas, foram avaliadas proteínas reguladoras da via apoptótica, com o objetivo de investigar se esse processo envolve a ativação de caspases e se o receptor CSPG4 participa dessas vias. Especificamente, analisaram-se as caspases 3 e 7, que promovem apoptose quando ativadas, e a proteína Bcl-2, de ação antiapoptótica (QIAN *et al.*, 2022; SVANDOVA *et al.*, 2024).

Conforme demonstrado na Figura 18B, ambas as toxinas aumentaram a atividade das caspases 3 e 7 em células da glia entérica. No entanto, o bloqueio do CSPG4 não influenciou essa ativação, indicando que esse receptor não está envolvido na indução da via apoptótica mediada por essas proteases.

Para avaliar se o CSPG4 poderia exercer algum papel na regulação antiapoptótica, foi analisada a expressão relativa do gene *Bcl-2* em células expostas às toxinas. Como mostra a Figura 18C, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, sugerindo que o CSPG4 também não modula a expressão de *Bcl-2* nessas condições.

Figura 18. O bloqueio do CSPG4 não diminui a morte celular induzida pela TcdB, mas diminui a morte pela TcdA



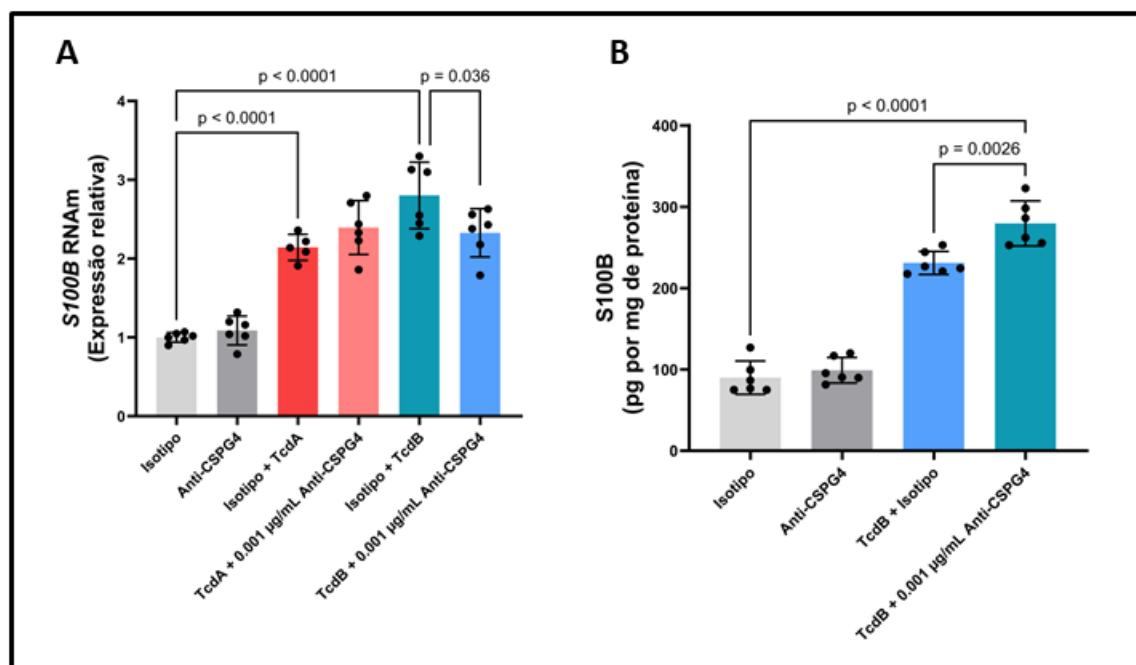
(A) Morte celular analisada pelo ensaio de apoptose de anexina V RealTime-Glo em célula glia entérica (EGC/PK060399) desafiada com TcdA e TcdB por 18 h na presença ou ausência de 0,001 µg/mL de anti-CSPG4. (B) Atividade da caspase 3/7 analisada pelo ensaio de luminescência (média ± s.e.m, n=6) em célula glia entérica (EGC/PK060399) desafiada com TcdA (50 ng/mL) e TcdB (1 ng/mL) por 18 h. (C) Expressão do gene Bcl2 avaliada por qPCR em células da glia entérica (EGC/PK060399) incubadas com TcdA (50 ng/mL) e TcdB (1 ng/mL) por 18 h, na presença ou ausência de 0,001 µg/mL de anti-CSPG4. GAPDH foi usado como controle. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA unidirecional seguido pelo teste de Tukey. URL: Unidade de Luminescência Relativa.

Considerando que os resultados anteriores indicaram a participação do CSPG4 na modulação da inflamação induzidas pela TcdB, investigou-se a expressão da proteína S100B, um marcador glial amplamente associado à neuroinflamação e à senescência em diversos contextos fisiopatológicos. O objetivo foi avaliar se o CSPG4 também regula a expressão do S100B em células da glia entérica desafiadas com toxinas de *C. difficile*.

A Figura 19A apresenta os dados de expressão gênica e proteica de S100B após 18 horas de exposição às toxinas, na presença ou ausência de anticorpo anti-CSPG4. Observa-se que o bloqueio do CSPG4 reduz a expressão gênica de S100B nas células tratadas com TcdB, em comparação ao grupo controle, enquanto no grupo exposto à TcdA não há diferença significativa.

Em relação à expressão proteica, ilustrada na Figura 19B, o bloqueio do CSPG4 nas células tratadas com TcdB resulta em um aumento nos níveis de S100B, sugerindo um possível efeito compensatório e reforçando a complexidade do papel desse receptor na regulação dessa proteína na glia entérica.

Figura 19. O bloqueio do CSPG4 promove diminuição da expressão do gene S100B, mas aumento da expressão proteica em células gliais entéricas desafiadas com TcdB



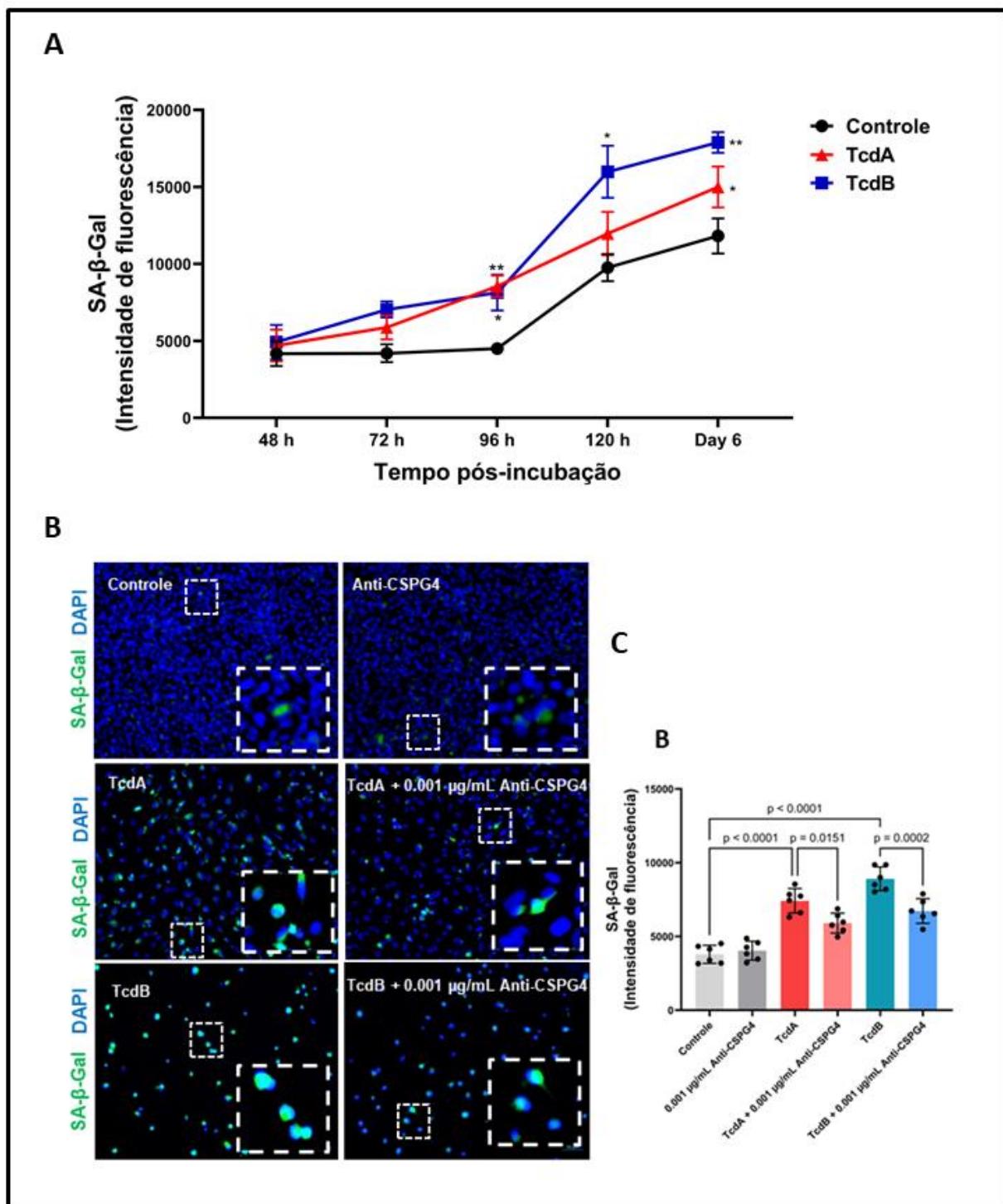
Efeito do bloqueio do receptor CSPG4 na glia entérica desafiada com TcdA e TcdB. (A) Expressão do gene S100B avaliada por qPCR em células gliais entéricas (EGC/PK060399) incubadas com TcdA (50 ng/mL) e TcdB (1 ng/mL) por 18 h, na presença ou ausência de 0,001 µg/mL de anti-CSPG4. GAPDH foi usado como controle. (B) Níveis de S100B (média ± erro padrão) liberados por ELISA e expressos em pg por mg de proteína. Para análise estatística, foi utilizado o teste ANOVA unidirecional seguido pelo teste de Tukey.

Dando continuidade à investigação dos efeitos tardios das toxinas de *C. difficile* sobre a glia entérica, avaliou-se o desenvolvimento de senescência celular por meio da atividade da β -galactosidase associada à senescência (SA- β -Gal). Esse marcador foi utilizado para detectar o acúmulo de células senescentes após exposição prolongada às toxinas TcdA e TcdB.

A Figura 20A apresenta uma análise temporal (48 h, 72 h, 96 h, 120 h e 6 dias) da marcação de SA- β -Gal em células gliais desafiadas com TcdA ou TcdB. Observa-se que ambas as toxinas aumentaram significativamente a atividade de SA- β -Gal a partir de 96 h, em comparação ao grupo controle. No entanto, enquanto o efeito da TcdA diminui em 120 h, tornando-se semelhante ao controle, a TcdB mantém níveis elevados de senescência. Após 6 dias de incubação, ambas as toxinas promoveram aumento da marcação de células senescentes.

Com base nesses resultados, o tempo de 96 h foi selecionado para avaliar a possível modulação da senescência pelo receptor CSPG4. As Figuras 20B e 20C apresentam, respectivamente, a análise qualitativa e quantitativa da imunofluorescência para SA- β -Gal (em verde). Os dados indicam que o bloqueio de CSPG4 reduz significativamente a senescência celular induzida por TcdA e por TcdB. Esses achados reforçam o papel do CSPG4 como modulador-chave da resposta da glia entérica aos efeitos tardios das toxinas, com potencial relevância na regulação da senescência celular.

Figura 20. TcdA e TcdB promovem o aumento do marcador de senescência, β -galactosidase (SA- β -Gal) na glia entérica e a modulação do receptor CSPG4 diminui a imunocoloração



Estudo de senescência usando o marcador β -galactosidase (SA- β -Gal) em glia entérica desafiada por TcdA e TcdB de *C. difficile*. (A) Representação da quantificação da intensidade média de fluorescência da imunocoloração de SA- β -Gal, medida usando o programa *ImageJ*, em diferentes tempos (48h, 72h, 96h, 120h e 6 dias) após incubação com TcdA (50ng/mL) e TcdB (1ng/mL) por 18h em glia entérica cultivada in vitro. (B) Representa a análise qualitativa da imunocoloração de SA- β -Gal (verde) em glia entérica 96h após incubação com

TcdA (50ng/mL) e TcdB (1ng/mL) por 18h. A figura também mostra o tratamento das células com Anti-CSPG4 na concentração de 0,001 µg/mL; DAPI (azul) foi usado para coloração nuclear. (C) Representação da quantificação da intensidade média de fluorescência da imunocoloração de SA- β -Gal, medida pelo programa ImageJ, 96h após incubação com TcdA (50ng/mL) e TcdB (1ng/mL) por 18h em glia entérica. Podemos observar que a modulação de CSPG4 (0,001 µg/mL Anti-CSPG4) diminui a senescência causada por ambas as toxinas. Para análise estatística, foi usada ANOVA unidirecional seguida do teste de Tukey.

6 DISCUSSÃO

Em nossa pesquisa evidenciamos que o receptor CSPG4 é expresso tanto na glia entérica de humano, camundongos e de ratos. Em camundongos infectados por *C. difficile* a expressão proteica desse receptor é aumentada. O mesmo é observado em linhagens de células gliais entéricas cultivadas *in vitro* desafiadas pelas TcdA e TcdB. Evidenciamos ainda que a modulação do CSPG4 é capaz de diminuir a translocação nuclear dos fatores de transcrição NF-kB e pSTAT3, bem como a expressão gênica de IL-6 e S100B na glia entérica desafiada pelas toxinas. Mostramos ainda, de maneira inédita, que a TcdA e TcdB são capazes de causar senescência na glia entérica e que a modulação do CSPG4 diminui essa senescência.

Como ficou bem esclarecido no nosso estudo, a glia entérica, tanto de humano, quanto de camundongos e ratos, expressam todos os receptores atualmente conhecidos para as toxinas A e B do *C. difficile*, que são: LDLR, receptor da TcdA (TAO *et al.*, 2019), e os receptores de TcdB: CSPG4, FRIZZLED (1, 2 e 7), PVRL3, TFPI e o LRP1 (KINSOLVING *et al.*, 2024).

O SNE desempenha um papel central no controle de funções do intestino constantemente, como motilidade, troca de fluidos da mucosa e homeostase imunológica (SHARKEY; MAWE, 2023). As células do SNE, especificamente os neurônios entéricos e a glia entérica, são profundamente afetadas pelas toxinas do *C. difficile* (COSTA *et al.*, 2025). Na fase aguda da doença, a resposta pró-inflamatória da glia entérica contribui para a inflamação, diarreia secretória e lesão do tecido intestinal (COSTA *et al.*, 2025).

As células gliais entéricas são fortemente reconhecidas como reguladoras diversas funções intestinais, incluindo motilidade, secreção, integridade da barreira epitelial e equilíbrio intestinal geral em condições saudáveis e patológicas (LÓPEZ-GÓMEZ *et al.*, 2021). Quando essas células passam por uma transição para um fenótipo glial reativo em resposta à inflamação intestinal, essas células contribuem para a gliose entérica, podendo sofrer mudanças na sua estrutura celular, e, consequentemente na sua função (LINAN-RICO *et al.*, 2023). Em estudos recentes com o *C. difficile* e as células gliais evidenciaram a reatividade dessas células quando expostas as toxinas A e B (COSTA *et al.*, 2021).

Uma das principais mudanças estruturais nas células gliais entéricas provocadas pelas toxinas do *C. difficile* é o arredondamento celular, associado pela inibição das RhoGTPases dessas células, causando um desarranjo no citoesqueleto de actina. Além de provocar parada do ciclo celular e morte por necrose precoce ou apoptose (BASSOTTI *et al.*, 2020).

As alterações fenotípicas e funcionais na glia entérica fazem com que elas expressem

diferentes subpopulações de receptores e mediadores perante os estímulos inflamatórios presentes no microambiente entérico. Isso acontece durante a ICD quando as toxinas têm como um dos alvos as células gliais entéricas (PACÍFICO *et al.*, 2025).

Conforme apresentado nessa pesquisa, entre todos os receptores conhecidos para a TcdB, o CSPG4 destaca-se por ser um dos mais abundantemente expressos nas células intestinais, configurando-se como um alvo estratégico para a ICD, e, portanto, como um objeto de estudo relevante para a investigação dos efeitos mediados pela TcdB durante a ICD (CHEN *et al.*, 2021).

Na presente pesquisa, evidenciamos que o receptor CSPG4 é naturalmente expresso nas células gliais entéricas, porém, a sua expressão é aumentada quando as células são desafiadas com a TcdA e a TcdB. Também mostramos que o CSPG4 tem a sua expressão aumentada no ceco e no cólon de camundongos infectados por *C. difficile*. Outros estudos também demonstraram que ambas as toxinas alteram a expressão de receptores de membrana da glia entérica. Pacífico e colaboradores (2025), por exemplo, estudaram o papel do Receptor Potencial Transitório Vaniloide 4 (TRPV4) e demonstraram que a expressão de TRPV4 também aumenta, tanto no ceco quanto no cólon de camundongos infectados por *C. difficile*. O estudo também mostra a regulação positiva de TRPV4 em linhagens de células gliais entéricas cultivadas *in vitro*.

Um estudo realizado por Costa e Colaboradores (2023), também em células gliais entéricas cultivadas *in vitro*, mostrou que a TcdA e a TcdB aumentam a expressão dos receptores de adenosina anti-inflamatórios (A2A e A3) e diminuem a expressão do receptor de adenosina pró-inflamatório (A2B).

Chen e colaboradores (2021) estudaram o papel do CSPG4 na ICD em células epiteliais do ceco e cólon de camundongos infectados. Eles mostraram que a infecção induziu extensa ruptura do epitélio e infiltração de células inflamatórias, bem como congestão hemorrágica grave e edema da mucosa em camundongos WT. Entretanto, camundongos CSPG4-KO apresentaram apenas níveis moderados de dano epitelial e infiltração de células inflamatórias, e congestão hemorrágica e edema submucoso leves ou ausentes, sugerindo que o CSPG4 tem um papel muito importante na ICD.

López-Gómez e colaboradores (2021) já haviam reportado que quando as células gliais entéricas adquirem fenótipo pró-inflamatório em resposta a estímulos patológicos, como por exemplo produtos bacterianos, essas células passam a expressar receptores, canais iônicos de membranas, mediadores gliais como o GFAP, S100B e o SOX10, bem como citocinas inflamatórias, principalmente a IL-6, TNF- α e IL-1 β .

A IL-6 é uma das citocinas pró-inflamatórias mais relevantes por desempenhar papel significativo na regulação de diferentes processos fisiológicos e patológicos, principalmente na inflamação aguda e crônica, doenças infecciosas e neoplásicas (KAUR *et al.*, 2020). A regulação positiva de IL-6 ocorre, principalmente, por meio da ativação da via NF-κB. Essa via é ativada por diversos estímulos, como infecções, danos teciduais e por sinais inflamatórios. Uma vez ativado, o NF-κB migra para o núcleo da célula e se liga ao promotor do gene da IL-6, fazendo com que se inicie a transcrição dessa interleucina e, consequentemente, resultando no aumento da sua produção (GUO *et al.*, 2024).

No presente estudo, mostramos que a TcdA e a TcdB aumentam a translocação nuclear de NF-κB nas células gliais entéricas, por conseguinte, a IL-6 também sofreu regulação positiva, ao passo que quando o CSPG4 é bloqueado, a migração do NF-κB e a expressão de IL-6 provadas pela TcdB diminuem, sugerindo esse receptor como um importante alvo para essa via de sinalização inflamatória na ICD.

No estudo de Pacífico e colaboradores (2025) foi relatado que ambas as toxinas do *C. difficile* aumentaram a expressão gênica de IL-6 na glia entérica via NKκB, mas o bloqueio do receptor TRPV4 pelo antagonista RN-1734 não interferiu no efeito da TcdB, ao contrário do nosso estudo.

Um outro estudo realizado por nosso grupo de pesquisa evidenciou que tanto a TcdA quanto a TcdB induziu regulação positiva de IL-6 através da ativação do receptor P2X7, via NKκB na glia entérica (LOUREIRO *et al.*, 2022).

No nosso estudo, além do NKκB, o bloqueio do receptor CSPG4 em células gliais entéricas desafiadas com TcdB também diminuiu a translocação do fator de transcrição STAT3 para o núcleo, sugerindo o CSPG4 como um importante modulador para esse fator de transcrição na glia entérica também. Esses achados vão de encontro ao estudo de Nezhadi e colaboradores (2025), na qual argumentaram que as toxinas de *C. difficile* ativam as vias de sinalização inflamatórias, NF-κB e STAT3, e que essas vias são acompanhadas pela produção extensiva de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias como a IL-6, a IL-8 e o TNF-α. Os autores mostraram também que a inflamação crônica causada por essas citocinas não apenas garante a sobrevivência de células danificadas, mas também acelera a proliferação de células mutadas. Esses achados levantam a hipótese de que essas citocinas, bem como as vias NF-κB e STAT3 estejam relacionadas ao processo de senescência celular, uma vez que células que sobrevivem a processos patológicos, assim como infecção, podem se tornar senescentes (FETTUCCIARI *et al.*, 2018).

Grivennikov e Karin (2010) relataram que o NF-κB e STAT3 são expressos ubliquamente e são rapidamente ativados em resposta a vários estímulos, incluindo estresses e inflamação. Quando ativados, o NF-κB e o STAT3 controlam a transcrição de citocinas pro-inflamatórias no núcleo e podem atuar de forma individual ou mútua (YOON *et al.*, 2010; BASU *et al.*, 2017). A IL-6, por exemplo, cuja expressão é induzida em resposta ao NF-κB, leva à ativação de STAT3. Uma vez ativado, o STAT3 pode levar à produção de mais IL-6, criando um ciclo de *feedback* positivo que pode amplificar ainda mais a resposta inflamatória (GRIVENNIKOV E KARIN, 2010). Partindo desse pressuposto, Yoon e colaboradores (2010) alegaram ainda que o STAT3 pode colaborar com a indução adequada de IL-6 pelo NF-κB, por desempenhar papéis críticos na ligação aos promotores de IL-6, bem como na retenção nuclear de NF-κB.

O envolvimento do receptor CSPG4 na produção de IL-6 e a via do NF-κB e do STAT3 nos mecanismos inflamatórios oriundos das toxinas do *C. difficile*, sobretudo da TcdB, oferece uma oportunidade de encontrar um novo modo de enfretamento da ICD por meio da inibição ou atenuação dessas vias inflamatórias, seja pelo bloqueio do CSPG4 ou pela sua modulação.

Outro marcador inflamatório importante em doenças intestinais é o S100B, uma proteína de ligação ao cálcio que em concentrações elevadas participa de processos inflamatórios e apresenta efeitos tóxicos, comportando-se como uma molécula de padrão molecular associada a danos/perigo (DAMP) (DI LIDDO *et al.*, 2020).

A S100B é superexpressa na glia entérica e correlaciona-se com o estado inflamatório intestinal e estimula ainda a produção de NO na colite ulcerativa humana (CIRILLO *et al.*, 2009). Esposito e colaboradores (2012) realizaram um estudo com o inibidor da S100B, pentamidina, e demonstraram melhora na gravidade da colite aguda induzida experimentalmente por sulfato de sódio de dextrana (DSS) em camundongos.

Costa e colaboradores (2021) também estudaram a modulação de S100B. Os autores descobriram que a inibição de S100B por pentamidina reduz a síntese de marcadores inflamatórios como a IL-1b, IL-18, IL-6, TNF-a, IL-17, IL-23 e IL-2 e diminui a expressão de diversos genes relacionados ao NFkB, aumentou a transcrição (SOCS2 e Bcl-2) de mediadores protetores, reduziu o recrutamento de neutrófilos e amenizou os danos intestinais e a gravidade da diarreia em camundongos infectados por *C. difficile* e em células gliais entéricas a TcdA e TcdB aumentaram a expressão de IL-6 mediada por S100B por meio da ativação de RAGE/PI3K/NFkB. Demostrando que a CDI parece aumentar a sinalização colônica de S100B na glia entérica, o que, por sua vez, aumenta a resposta inflamatória.

No nosso estudo o CSPG4 demonstrou-se ser muito importante para modular a expressão gênica de S100B na glia entérica desafiada com TcdB, o seu bloqueio promoveu a regulação negativa da expressão de S100B após 18h de desafio. No entanto, o bloqueio do CSPG4 não previu o aumento de secreção de S100B promovidos por TcdB no tempo de 18 h. No estudo realizado por Costa e colaboradores (2021), a expressão gênica e proteica de S100B no meio extracelular já começa a aumentar a partir de 6 h de incubação com a TcdB nas células gliais entéricas. Esses achados podem explicar o motivo pelo qual o S100B está aumentado, uma vez que o quantificamos do sobrenadante celular após 18 h incubação com a toxina, mas a proteína pode estar acumulada em tempos mais precoces, como apontou a trabalho supracitado.

Segundo Fettucciari e colaboradores (2017), as células gliais entéricas têm uma alta suscetibilidade aos efeitos da TcdA e da TcdB. Esta última promove de forma precoce danos celulares e apoptose nessas células (MACCHIONI *et al.*, 2017; COSTA *et al.*, 2024). Essa suscetibilidade pode estar relacionada com a persistência de funções alteradas nas células sobreviventes que sugerem um importante papel da glia entérica na patogênese da infecção por *C. difficile*.

No nosso estudo, o CSPG4 não foi determinante na apoptose das células gliais entérica provocada pela TcdB, tendo vista que o seu bloqueio não causou a diminuição da morte celular, sugerindo que outros receptores de TcdB podem estar mais envolvidos com esse mecanismo, dentre eles o Frizzled (1, 2 and 7), PVRL3, TFPI ou o LRP1 (KINSOLVING *et al.*, 2024) já que a célula glial entérica expressa todos esses outros receptores. Por outro lado, curiosamente, o bloqueio do CSPG4 causou diminuição da apoptose induzida pela TcdA.

O CSPG4 é conhecido por se associar a integrinas e outros componentes da matriz extracelular, que pode influenciar em processos como migração celular e organização da matriz extracelular. Essas interações podem modificar a arquitetura celular, potencialmente afetando a acessibilidade e a eficiência da internalização de proteínas (JORDaan *et al.*, 2017). Nós hipotetizamos que o CSPG4 exerce um efeito indireto na internalização da TcdA por meio de suas interações com a matriz extracelular e proteínas de adesão celular. Ademais, são necessários mais estudos para sustentar tal hipótese.

Uma outra hipótese é de que a IL-6, aumentada no grupo das células desafiadas com TcdA juntamente com o anti-CSPG4, possa ter exercido sua função pleiotrópica, provocando um efeito anti-apoptótico sobre as células (SAPPINGTON; CHAN; CALKINS, 2006; GU *et al.*, 2016).

A apoptose é regulada por uma família de proteínas chamadas caspases, que são

enzimas proteolíticas que pertencem à família das cisteína proteases. As caspases são amplamente classificadas por seus papéis conhecidos na apoptose (caspase-3, caspase-6, caspase-7, caspase-8 e caspase-9 em mamíferos) e na inflamação (caspase-1, caspase-4, caspase-5 e caspase-12 em humanos e caspase-1, caspase-11 e caspase-12 em camundongos) (SAHOO *et al.*, 2023). As enzimas envolvidas na apoptose são subclassificadas de acordo com o mecanismo de ação como caspases iniciadoras (caspase-8 e caspase-9) ou caspases executoras (caspase-3, caspase-6 e caspase-7) (SVANDOVA *et al.*, 2024).

Além das caspases, as proteínas da família linfoma de células B antiapoptótico 2 (BCL-2) são reguladores-chave da apoptose mitocondrial, atuando principalmente como supressoras da morte celular programada (QIAN *et al.*, 2022). A apoptose de células gliais entéricas induzida por TcdB é essencialmente mediada pela ativação da caspase-3 e pela ativação tardia da caspase-7 (FETTUCCIARI *et al.*, 2022), como foi demonstrado nesse estudo. Em adição, nem sempre haverá a participação de Bcl-2, podendo sua expressão ser inalterada, como mostrou Matte e colaboradores (2009) e como foi demonstrado nesse estudo.

Apesar de o CSPG4 não exercer um papel significativo na morte celular induzida pela TcdB na glia entérica, o nosso estudo evidenciou, de maneira inédita, que esse receptor pode ser alvo importante para o processo de senescência presente nas células da glia entérica provocada pela TcdB. A senescência celular refere-se a um estado estável e não proliferativo em que as células entram em resposta a diversos estresses. Esse processo é caracterizado por parada irreversível do ciclo celular, alterações no metabolismo celular e morfologia (ZHANG *et al.*, 2023) e pode ser causada por medicamentos antitumorais, irradiação, estresse oxidativo e envelhecimento que danificam o DNA (ZHU, WU , YANG, 2024). A senescência pode ainda ser causada por toxinas produzidas por bactérias como a colibactina de *Escherichia coli* (SECHER *et al.*, 2013) e a piocianina de *Pseudomonas aeruginosa* (GRASSO; FRISAN, 2015).

O principal marcador usado para identificar células senescentes é a enzima β -galactosidase (SA- β -Gal). Essa enzima reside nos lisossomos e é ativa na maioria das células em pH 4 (acidificação lisossomal), indicando seu estado normal. Células em estado de senescência acumulam SA- β -Gal ativa em pH 6, sofrem parada do ciclo celular e obtêm fenótipo secretor associado à senescência (SASP) e superexpressão do gene GLB1, que codifica essa enzima (VALIEVA *et al.*, 2022). A SA- β -Gal converte β -galactosídeos em monossacarídeos em condições de pH ácido. O produto clivado enzimaticamente é retido dentro da célula devido à ligação covalente de proteínas intracelulares e emite um sinal fluorogênico, podendo ser facilmente identificado por ensaios de fluorescência (VALIEVA *et*

al., 2022; KHAN *et al.*, 2024). Inclusive, nos ensaios *in vitro* com células é normal que o grupo controle apresente alguma marcação de SA- β -Gal, como foi mostrado no presente estudo, mesmo que não tenha sido desafiado com toxina, pois segundo Debacq-Chainiaux e colaboradores (2009), células mantidas em confluência podem apresentar atividade relacionada à senescência pelo próprio envelhecimento celular mimetizado *in vitro*.

A literatura mostra que a senescência celular está envolvida em diversas doenças gastrointestinais, como doenças inflamatórias intestinais (DII) e carcinogênese colorretal (PENFIELD *et al.*, 2013; FREY *et al.*, 2018) até síndrome do intestino irritável (SII) (ZHANG *et al.*, 2022).

Fettucciari e colaboradores (2018) demonstraram que a TcdB na concentração de 10 ng/mL, após 6 dias de exposição, induz a senescência em células gliais entéricas que sobrevivem à ação da toxina, o que induz predominantemente a morte por apoptose/necrose. Segundo os autores, a senescência induzida pelo TcdB na glia entérica desencadeia principalmente a parada irreversível do ciclo celular em G0/G1 e G2/M, mediada pela superexpressão de p27 associada à regulação negativa da cinase 1 dependente de ciclina (CDK1) e da ciclina B1, danos persistentes ao DNA, regulação negativa de c-myc e hipofosforilação da proteína fosforilada do retinoblastoma (pRb).

Ademais, as sirtuínas contribuem para a maturação, manutenção e estabilização do estado de senescência induzido por TcdB, antagonizando os efeitos letais de altos níveis de ROS por meio de uma resposta antioxidante e desta forma favorecendo a sobrevivência de células senescentes, que, consequentemente, apresentam funções reduzidas (FETTUCCIARI *et al.*, 2018).

A infecção por *C. difficile* pode acarretar ainda diversas complicações intestinais como possíveis sequelas, incluindo síndrome do intestino irritável (SII), doença do refluxo gastroesofágico (DRGE), diarreia funcional, dispepsia e constipação, sendo a SII e a constipação as complicações mais comuns (GUTIÉRREZ *et al.*, 2015). Além disso, sintomas como dor abdominal, constipação, diarreia, SII e dispepsia podem persistir por até dois anos após a resolução da infecção (BERLAM *et al.*, 2018). Essas alterações patológicas podem estar diretamente relacionadas com a senescência celular, uma vez que segundo Fettucciari e colaboradores (2023), os efeitos patológicos da senescência celular relacionados à inflamação persistente podem contribuir para o desenvolvimento de diversas condições inflamatórias intestinais, bem como imunossupressão e indução tumoral.

No nosso estudo confirmamos que a TcdB promove a senescência nas células gliais entéricas e que uma baixa concentração da toxina (1 ng/mL), após 4 dias de incubação, já é o

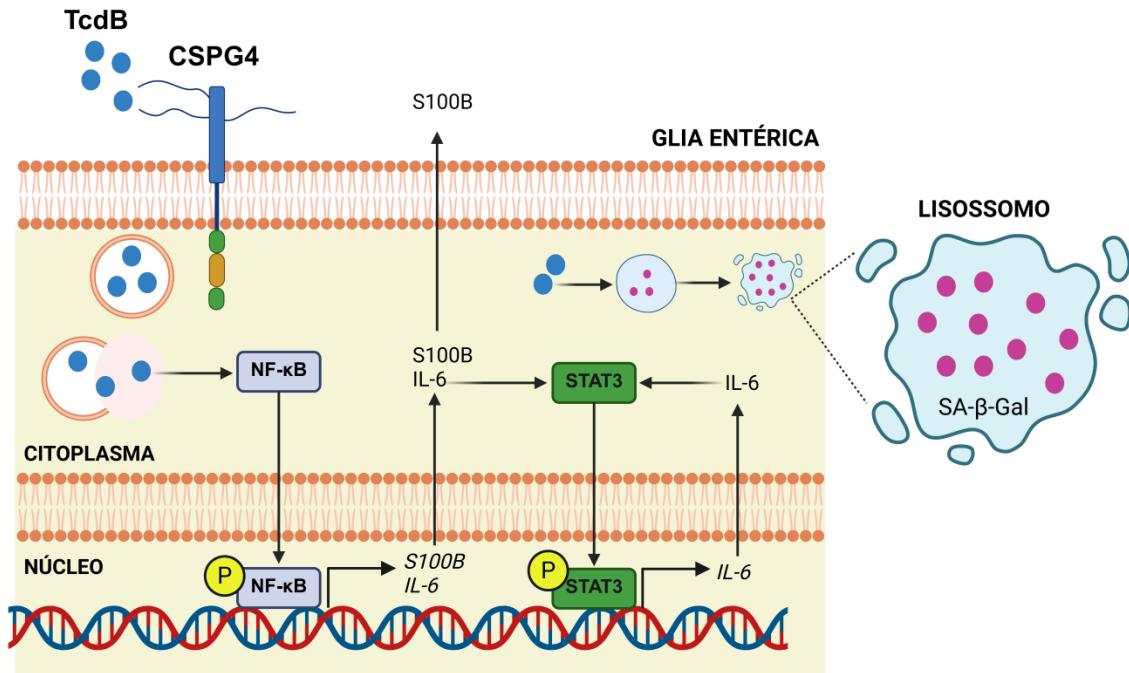
suficiente para tornar as células senescentes. O bloqueio do receptor CSPG4 promoveu a diminuição do marcador de senescência provocada pela TcdB. Também demostramos de maneira inédita que a TcdA também promove o aumento de SA- β -Gal na glia entérica e o bloqueio do CSPG4 também foi capaz de diminuir a marcação dessa enzima.

Diante desses achados, estudos de modulação com o CSPG4 se tornam extremamente relevantes, tendo em vista a sua interação direta com a TcdB que possibilita os efeitos danosos dessa toxina nas células gliais entéricas. Nossa pesquisa foi muito importante para esclarecimento do papel do CSPG4 na mediação da resposta inflamatória e senescência desencadeada pelas toxinas A e B do *C. difficile* e seu papel significativo na patogênese da ICD, marcando-o como um alvo terapêutico promissor.

Ademais, é necessário realizar uma investigação mais aprofundada sobre os efeitos da inibição do receptor CSPG4 na ICD *in vivo*, a fim de compreender plenamente sua atividade e implicações, tanto na fase aguda da doença quanto pós-infecção, uma vez que pacientes que foram infectados por *C. difficile* apresentam sequelas importantes.

O resumo do envolvimento do CSPG4 na ação das toxinas A e B do *C. difficile* nas células gliais entéricas está apresentado na Figura 21.

Figura 21. Modelo esquemático do envolvimento do CSPG4 na ação das toxinas A e B do *C. difficile* nas células gliais entéricas



Fonte: Elaborado pelo autor. O receptor CSPG4 possibilita a entrada de TcdB por endocitose nas células gliais entéricas. Uma vez no citoplasma, a TcdB ativa o NF-κB, que migra para o núcleo e induz a transcrição de S100B e IL-6. O S100B é secretado, principalmente, para o meio extracelular. A IL-6 ativa o fator de transcrição STAT3, que é translocado para o núcleo e induz a transcrição de mais IL-6, causando um *feedback* positivo com essa citocina. A TcdB provoca ainda a senescência celular, com um aumento da atividade da enzima SA-β-Gal no lisossomo.

7 CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que o CSPG4 exerce um papel relevante na mediação da resposta inflamatória induzida pela TcdB, uma vez que seu bloqueio foi capaz de reduzir a translocação nuclear dos fatores de transcrição NFκB e STAT3, além de regular negativamente a expressão de IL-6 e de S100B, marcador glial associado à neuroinflamação. Por fim, foi evidenciado que o CSPG4 também participa da modulação do processo de senescência celular induzido pela TcdB em células da glia entérica, reforçando seu papel como um possível alvo terapêutico para mitigar os efeitos tardios e inflamatórios da infecção por *C. difficile* sobre o sistema nervoso entérico.

Ademais, futuras investigações podem explorar intervenções farmacológicas ou genéticas voltadas ao bloqueio de CSPG4.

REFERÊNCIAS

- ABHYANKAR, Mayuresh M. *et al.* Immune profiling to predict outcome of *Clostridioides difficile* infection. **MBio**, v. 11, n. 3, p. 10.1128/mbio.00905-20, 2020.
- AKTORIES, K. *et al.* Bacterial toxins that target Rho proteins. **The Journal of clinical investigation**, v. 99, n. 5, p. 827-829, 1997.
- ÁLVAREZ-VILLALOBOS, Neri Alejandro *et al.* Epidemiologic profile of community-acquired *Clostridioides difficile* infections: a systematic review and meta-analysis. **Epidemiology & Infection**, v. 153, p. e46, 2025.
- BARLAM, Tamar F. *et al.* Retrospective analysis of long-term gastrointestinal symptoms after *Clostridium difficile* infection in a nonelderly cohort. **Plos one**, v. 13, n. 12, p. e0209152, 2018.
- BASSOTTI, G. *et al.* The cytotoxic synergy between *Clostridioides difficile*toxin B and proinflammatorycytokines:anunholyalliancefavoringtheonsetof *Clostridioides difficile* infection and relapses. **Microbiology**, v. 9, p. e1061, 2020.
- BASU, Anandita *et al.* STAT3 and NF-κB are common targets for kaempferol-mediated attenuation of COX-2 expression in IL-6-induced macrophages and carrageenan-induced mouse paw edema. **Biochemistry and biophysics reports**, v. 12, p. 54-61, 2017.
- BOUSTANY, Antoine; FEUERSTADT, Paul; TILLOTSON, Glenn. The 3 Ds: Depression, Dysbiosis, and *Clostridioides difficile*. **Advances in Therapy**, v. 41, n. 11, p. 3982-3995, 2024.
- BRAGA, Daniela S. *et al.* Incidence of healthcare-associated *Clostridioides difficile* infection in a quaternary referral university hospital in Brazil. **Anaerobe**, v. 79, p. 102672, 2023.
- BROWN, Isola AM *et al.* Enteric glia mediate neuron death in colitis through purinergic pathways that require connexin-43 and nitric oxide. **Cellular and molecular gastroenterology and hepatology**, v. 2, n. 1, p. 77-91, 2016.
- CHEN, Peng *et al.* Structural basis for CSPG4 as a receptor for TcdB and a therapeutic target in *Clostridioides difficile* infection. **Nature communications**, v. 12, n. 1, p. 3748, 2021.
- CHEN, Xinyi *et al.* Chondroitin Sulfate Proteoglycan 4 (CSPG4) as an Emerging Target for Immunotherapy to Treat Melanoma. **Cancers**, v. 16, n. 19, p. 3260, 2024.
- CIRILLO, Claudia *et al.* Increased mucosal nitric oxide production in ulcerative colitis is mediated in part by the enteroglial-derived S100B protein. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 21, n. 11, p. 1209-e112, 2009.
- ČOPIČ, Alenka; DIEUDONNÉ, Thibaud; LENOIR, Guillaume. Phosphatidylserine transport in cell life and death. **Current opinion in cell biology**, v. 83, p. 102192, 2023.
- COSTA, Deiziane VS *et al.* S100B inhibition attenuates intestinal damage and diarrhea

severity during *Clostridioides difficile* infection by modulating inflammatory response. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 11, p. 739874, 2021.

COSTA, Deiziane VS *et al.* Adenosine receptors differentially mediate enteric glial cell death induced by *Clostridioides difficile* Toxins A and B. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 956326, 2023.

COSTA, Deiziane VS *et al.* *Clostridioides difficile* infection promotes gastrointestinal dysfunction in human and mice post-acute phase of the disease. **Anaerobe**, v. 87, p. 102837, 2024.

COSTA, Deiziane VS *et al.* The role of the enteric nervous system in the pathogenesis of *Clostridioides difficile* infection. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, p. 1-17, 2025.

CUI, Yihong *et al.* An epidemiological surveillance study (2021–2022): detection of a high diversity of *Clostridioides difficile* isolates in one tertiary hospital in Chongqing, Southwest China. **BMC Infectious Diseases**, v. 23, n. 1, p. 703, 2023.

DEBACQ-CHAINIAUX, Florence *et al.* Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- β gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. **Nature protocols**, v. 4, n. 12, p. 1798-1806, 2009.

DI BELLA, S. *et al.* *Clostridium difficile* toxins A and B: Insights into pathogenic properties and extraintestinal effects. **Toxins.**, v. 8, n. 5, p. 1–25, 2016.

DI LIDDO, R.*et al.* S100B as a new fecal biomarker of inflammatory bowel diseases. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 24, n. 1, p. 323-332, 2020.

DUBBERKE, Erik R.; OLSEN, Margaret A. Burden of *Clostridium difficile* on the healthcare system. **Clinical infectious diseases**, v. 55, n. suppl_2, p. S88-S92, 2012.

DROKHLYANSKY, Eugene *et al.* The human and mouse enteric nervous system at single-cell resolution. **Cell**, v. 182, n. 6, p. 1606-1622. e23, 2020.

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

FETTUCCIARI, Katia *et al.* *Clostridioides difficile* toxin B alone and with pro-inflammatory cytokines induces apoptosis in enteric glial cells by activating three different signalling pathways mediated by caspases, calpains and cathepsin B. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 79, n. 8, p. 442, 2022.

FETTUCCIARI, Katia *et al.* *Clostridioides difficile* toxin B induced senescence: a new pathologic player for colorectal cancer?. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 9, p. 8155, 2023.

FETTUCCIARI, Katia *et al.* *Clostridium difficile* toxin B induces senescence in enteric glial cells: A potential new mechanism of *Clostridium difficile* pathogenesis. **Biochimica et**

Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, v. 1865, n. 12, p. 1945-1958, 2018.

FETTUCCIARI, Katia *et al.* Enteric glial cells are susceptible to Clostridium difficile toxin B. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, p. 1527-1551, 2017.

FEUERSTADT, Paul; THERIAULT, Nicolette; TILLOTSON, Glenn. The burden of CDI in the United States: a multifactorial challenge. **BMC Infectious Diseases**, v. 23, n. 1, p. 132, 2023.

FLEMING, Mark A. *et al.* The enteric nervous system and its emerging role as a therapeutic target. **Gastroenterology research and practice**, v. 2020, n. 1, p. 8024171, 2020.

FOSCHETTI, D. A. *et al.* *Clostridium difficile* toxins or infection induce upregulation of adenosine receptors and IL-6 with early pro-inflammatory and late anti-inflammatory pattern. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 53, p. e9877, 2020.

FREY, Nina *et al.* Cellular senescence in gastrointestinal diseases: from pathogenesis to therapeutics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 15, n. 2, p. 81-95, 2018.

GAWEY, Brent J.; KHANNA, Sahil. *Clostridioides difficile* infection: landscape and microbiome therapeutics. **Gastroenterology & Hepatology**, v. 19, n. 6, p. 319, 2023.

GIRÃO, Evelyne Santana *et al.* Prevalence of *Clostridioides difficile* associated diarrhea in hospitalized patients in five Brazilian centers: A multicenter, prospective study. **Anaerobe**, v. 66, p. 102267, 2020.

GOVIND, Revathi; FITZWATER, Leah; NICHOLS, Rebekah. Observations on the role of TcdE isoforms in *Clostridium difficile* toxin secretion. **Journal of bacteriology**, v. 197, n. 15, p. 2600-2609, 2015.

GRASSO, Francesca; FRISAN, Teresa. Bacterial genotoxins: merging the DNA damage response into infection biology. **Biomolecules**, v. 5, n. 3, p. 1762-1782, 2015.

GRIVENNIKOV, Sergei I.; KARIN, Michael. Dangerous liaisons: STAT3 and NF-κB collaboration and crosstalk in cancer. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 21, n. 1, p. 11-19, 2010.

GU, Yan *et al.* Endogenous IL-6 of mesenchymal stem cell improves behavioral outcome of hypoxic-ischemic brain damage neonatal rats by suppressing apoptosis in astrocyte. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 18587, 2016.

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

GUTIÉRREZ, Ramiro L.; RIDDLE, Mark S.; PORTER, Chad K. Increased risk of functional gastrointestinal sequelae after Clostridium difficile infection among active duty United States military personnel (1998–2010). **Gastroenterology**, v. 149, n. 6, p. 1408-1414, 2015.

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

HARRER, Dennis C.; DÖRRIE, Jan; SCHAFT, Niels. Cspg4 as target for CAR-T-cell therapy of various tumor entities—merits and challenges. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 23, p. 5942, 2019.

HENKEL, Daniel *et al.* Receptor binding domains of TcdB from *Clostridioides difficile* for chondroitin sulfate proteoglycan-4 and frizzled proteins are functionally independent and additive. **Toxins**, v. 12, n. 12, p. 736, 2020.

HILVERS, Ember *et al.* *Clostridioides difficile* infection following COVID-19: A nationwide analysis using routine surveillance data in Wales. **Journal of Hospital Infection**, 2024.

ILIEVA, Kristina M. *et al.* Chondroitin sulfate proteoglycan 4 and its potential as an antibody immunotherapy target across different tumor types. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 1911, 2018.

JAZMATI, Nathalie *et al.* Occurrence and trends of *Clostridioides difficile* infections in hospitalized patients: a prospective multi-centre cohort study in six German university hospitals, 2016–2020. **Journal of Hospital Infection**, v. 151, p. 161-172, 2024.

JIANG, Mengqiu *et al.* Structural dynamics of receptor recognition and pH-induced dissociation of full-length *Clostridioides difficile* Toxin B. **PLoS Biology**, v. 20, n. 3, p. e3001589, 2022.

JOHNSON, Stuart *et al.* Clinical practice guideline by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA): 2021 focused update guidelines on management of *Clostridioides difficile* infection in adults. **Clinical infectious diseases**, v. 73, n. 5, p. e1029-e1044, 2021.

JORDAAN, Sandra *et al.* CSPG4: a target for selective delivery of human cytolytic fusion proteins and TRAIL. **Biomedicines**, v. 5, n. 3, p. 37, 2017.

KAUR, Sukhvir *et al.* A panoramic review of IL-6: Structure, pathophysiological roles and inhibitors. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 28, n. 5, p. 115327, 2020.

KELLY, Colleen R. *et al.* ACG clinical guidelines: prevention, diagnosis, and treatment of *Clostridioides difficile* infections. **Official journal of the American College of Gastroenterology| ACG**, v. 116, n. 6, p. 1124-1147, 2021.

KHAN, Taukeer A. *et al.* β-Galactosidase-and Photo-Activatable Fluorescent Probes for Protein Labeling and Super-Resolution STED Microscopy in Living Cells. **Molecules**, v. 29, n. 15, p. 3596, 2024.

KIM, Jieun *et al.* Incidence of *Clostridioides difficile* infections in Republic of Korea: a prospective study with active surveillance vs. national data from Health Insurance Review & Assessment Service. **Journal of Korean Medical Science**, v. 39, n. 12, 2024.

KINSOLVING, Julia *et al.* Structural and functional insight into the interaction of *Clostridioides difficile* toxin B and FZD7. **Cell Reports**, v. 43, n. 2, 2024.

- KOCIOLEK, Larry K.; CREWS, Jonathan D.; SCHWENK, Hayden T. Recent advances in *Clostridioides difficile* infection epidemiology, diagnosis and treatment in children. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 34, n. 5, p. 527-532, 2021.
- KORDUS, Shannon L.; THOMAS, Audrey K.; LACY, D. Borden. *Clostridioides difficile* toxins: mechanisms of action and antitoxin therapeutics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 285-298, 2022.
- LI, Shan *et al.* Cytotoxicity of *Clostridium difficile* toxin B does not require cysteine protease-mediated autocleavage and release of the glucosyltransferase domain into the host cell cytosol. **Pathogens and disease**, v. 67, n. 1, p. 11-18, 2013.
- LINAN-RICO, Andromeda *et al.* Mini-review: Enteric glial cell reactions to inflammation and potential therapeutic implications for GI diseases, motility disorders, and abdominal pain. **Neuroscience letters**, v. 812, p. 137395, 2023.
- LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- LÓPEZ-GÓMEZ, Laura *et al.* Nutraceuticals and enteric glial cells. **Molecules**, v. 26, n. 12, p. 3762, 2021.
- MACCHIONI, Lara *et al.* Enteric glial cells counteract *Clostridium difficile* Toxin B through a NADPH oxidase/ROS/JNK/caspase-3 axis, without involving mitochondrial pathways. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 45569, 2017.
- MALHOTRA, Sanchi; MOHANDAS, Sindhu. Updates and opinions in diagnosis and treatment of *Clostridioides difficile* in pediatrics. **Current Treatment Options in Pediatrics**, v. 7, n. 4, p. 203-216, 2021.
- MANION, John *et al.* *C. difficile* intoxicates neurons and pericytes to drive neurogenic inflammation. **Nature**, v. 622, n. 7983, p. 611-618, 2023.
- MATTE, Isabelle *et al.* Antiapoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-XL inhibit *Clostridium difficile* toxin A-induced cell death in human epithelial cells. **Infection and immunity**, v. 77, n. 12, p. 5400-5410, 2009.
- NEZHADI, Javad *et al.* *Clostridium difficile* as a potent trigger of colorectal carcinogenesis. **Discover Oncology**, v. 16, n. 1, p. 1-6, 2025.
- NGUYEN, Tinh Thi *et al.* The aging enteric nervous system. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 11, p. 9471, 2023.
- NOGUEIRA, Hildenia Baltasar Ribeiro *et al.* Molecular epidemiology and antimicrobial resistance in *Clostridioides difficile* strains isolated from children and adolescents in a tertiary referral pediatric hospital in Fortaleza, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 28, n. 3, p. 103767, 2024.

- NORMINGTON, Charmaine; CHILTON, Caroline H.; BUCKLEY, Anthony M. *Clostridioides difficile* infections; new treatments and future perspectives. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 40, n. 1, p. 7-13, 2024.
- PACÍFICO, Dvison de Melo *et al.* TRPV4 modulates inflammatory responses and apoptosis in enteric glial cells triggered by *Clostridioides difficile* toxins A and B. **Journal of Inflammation**, v. 22, n. 1, p. 3, 2025.
- PAPARELLA, Ashleigh S. *et al.* *Clostridioides difficile* TcdB Toxin Glucosylates Rho GTPase by an SN i Mechanism and Ion Pair Transition State. **ACS Chemical Biology**, v. 17, n. 9, p. 2507-2518, 2022.
- PAPARELLA, Ashleigh S. *et al.* Inhibition of *Clostridium difficile* TcdA and TcdB toxins with transition state analogues. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 6285, 2021.
- PEERY, Anne F. *et al.* Burden and cost of gastrointestinal, liver, and pancreatic diseases in the United States: update 2021. **Gastroenterology**, v. 162, n. 2, p. 621-644, 2022.
- PENFIELD, Joshua D. *et al.* The role of cellular senescence in the gastrointestinal mucosa. **Gut and Liver**, v. 7, n. 3, p. 270, 2013.
- POURLIOTOPOULOU, Evdokia; KARAMPATAKIS, Theodoros; KACHRIMANIDOU, Melania. Exploring the Toxin-Mediated Mechanisms in *Clostridioides difficile* Infection. **Microorganisms**, v. 12, n. 5, p. 1004, 2024.
- QIAN, Shanna *et al.* The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy. **Frontiers in oncology**, v. 12, p. 985363, 2022.
- RISQUES, Rosa Ana *et al.* Ulcerative colitis–associated colorectal cancer arises in a field of short telomeres, senescence, and inflammation. **Cancer research**, v. 71, n. 5, p. 1669-1679, 2011.
- RÜHL, A.; TROTTER, J.; STREMMEL, W. Isolation of enteric glia and establishment of transformed enteroglial cell lines from the myenteric plexus of adult rat. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 13, n. 1, p. 95-106, 2001.
- SAHOO, Gayatri *et al.* A review on caspases: key regulators of biological activities and apoptosis. **Molecular neurobiology**, v. 60, n. 10, p. 5805-5837, 2023.
- SAPPINGTON, Rebecca M.; CHAN, Matilda; CALKINS, David J. Interleukin-6 protects retinal ganglion cells from pressure-induced death. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 47, n. 7, p. 2932-2942, 2006.
- SCHIFFER, Davide *et al.* The significance of chondroitin sulfate proteoglycan 4 (CSPG4) in human gliomas. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 9, p. 2724, 2018.
- SECHER, Thomas *et al.* *Escherichia coli* producing colibactin triggers premature and transmissible senescence in mammalian cells. **PloS one**, v. 8, n. 10, p. e77157, 2013.

- SEGUILLA, Luisa; GULBRANSEN, Brian D. Enteric glial biology, intercellular signalling and roles in gastrointestinal disease. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 18, n. 8, p. 571-587, 2021.
- SELGRAD, Michael *et al.* JC virus infects the enteric glia of patients with chronic idiopathic intestinal pseudo-obstruction. **Gut**, v. 58, n. 1, p. 25-32, 2009.
- SHARKEY, Keith A.; MAWE, Gary M. The enteric nervous system. **Physiological reviews**, v. 103, n. 2, p. 1487-1564, 2023.
- SMITS, Wiep Klaas *et al.* *Clostridium difficile* infection. **Nature reviews Disease primers**, v. 2, n. 1, p. 1-20, 2016.
- SOHN, Jane J. *et al.* Macrophages, nitric oxide and microRNAs are associated with DNA damage response pathway and senescence in inflammatory bowel disease. 2012.
- SPENCER, Nick J.; HU, Hongzhen. Enteric nervous system: sensory transduction, neural circuits and gastrointestinal motility. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 17, n. 6, p. 338-351, 2020.
- STERGACHIS, Andy *et al.* Antibiotic-associated colitis. **Western Journal of Medicine**, v. 140, n. 2, p. 217, 1984.
- STOIAN, Mircea *et al.* COVID-19 and *Clostridioides difficile* Coinfection Analysis in the Intensive Care Unit. **Antibiotics**, v. 13, n. 4, p. 367, 2024.
- SVANDOVA, Eva *et al.* Exploring caspase functions in mouse models. **Apoptosis**, v. 29, n. 7, p. 938-966, 2024.
- TAO, Liang *et al.* Sulfated glycosaminoglycans and low-density lipoprotein receptor contribute to *Clostridium difficile* toxin A entry into cells. **Nature microbiology**, v. 4, n. 10, p. 1760-1769, 2019.
- VALÈS, Simon *et al.* Tumor cells hijack enteric glia to activate colon cancer stem cells and stimulate tumorigenesis. **EBioMedicine**, v. 49, p. 172-188, 2019.
- VALIEVA, Yana *et al.* Senescence-associated β -galactosidase detection in pathology. **Diagnostics**, v. 12, n. 10, p. 2309, 2022.
- VIPREY, Virginie F. *et al.* European survey on the current surveillance practices, management guidelines, treatment pathways and heterogeneity of testing of *Clostridioides difficile*, 2018–2019: results from the Combatting Bacterial Resistance in Europe CDI (COMBACTE-CDI). **Journal of Hospital Infection**, v. 131, p. 213-220, 2023.
- WEN, Bao-Jiang *et al.* Prevalence and molecular characterization of *Clostridioides difficile* infection in China over the past 5 years: a systematic review and meta-analysis. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 130, p. 86-93, 2023.
- YOON, S. *et al.* NF- κ B and STAT3 cooperatively induce IL6 in starved cancer cells. **Oncogene**, v. 31, n. 29, p. 3467-3481, 2012.

YUAN, Pengfei *et al.* Chondroitin sulfate proteoglycan 4 functions as the cellular receptor for *Clostridium difficile* toxin B. **Cell research**, v. 25, n. 2, p. 157-168, 2015.

ZHANG, Dongmu; PRABHU, Vimalanand S.; MARCELLA, Stephen W. Attributable healthcare resource utilization and costs for patients with primary and recurrent *Clostridium difficile* infection in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 66, n. 9, p. 1326-1332, 2018.

ZHANG, Huantong *et al.* The role of cellular senescence in metabolic diseases and the potential for senotherapeutic interventions. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 11, p. 1276707, 2023.

ZHANG, Yuan *et al.* Telomere is shortened in patients with irritable bowel syndrome in the Chinese population. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 37, n. 9, p. 1749-1755, 2022.

ZHU, Jing; WU, Chongyun; YANG, Luodan. Cellular senescence in Alzheimer's disease: from physiology to pathology. **Translational Neurodegeneration**, v. 13, n. 1, p. 55, 2024.

ANEXO 1

Tabela 1 - Primers utilizados no qPCR

| | |
|--------------|---------------------------|
| <i>CSPG4</i> | |
| Forward | CAGCAATGGACGGATAGCCT |
| Reverse | GTACGCCATCAGAGAGGTCG |
| <i>Lrp1</i> | |
| Forward | GGAATGAGCTTCACCCAAGC |
| Reverse | CAATGTGGCGTCCGAGAAGT |
| <i>Pvrl3</i> | |
| Forward | TGGCGTCAGACAATACTCTTCATT |
| Reverse | TGGTG GTAGTGGGAGGATCT |
| <i>Ldlr</i> | |
| Forward | CACATGGACCCTCACACCAG |
| Reverse | CGGTCCAGGGTCATCTTACG |
| <i>Tfpi</i> | |
| Forward | AGAAAGACCACGCCCTCTGG |
| Reverse | CCTCGGGCAGAGCATTAAGA |
| <i>Fzd1</i> | |
| Forward | CTGAGGAGTTGCGCTTTCG |
| Reverse | GTACGTGAGCACCGTGAAGA |
| <i>Fzd2</i> | |
| Forward | TTTCTGGGTGAGCGCGATT |
| Reverse | GGATCCAGAGACGGGCAAAA |
| <i>Fzd7</i> | |
| Forward | CCATGAGCCCCGACTTTACA |
| Reverse | TAGAAGCGACGCCATGACTG |
| <i>GAPDH</i> | |
| Forward | AGACAGCCGCA TCTTCTTGT |
| Reverse | CTTGCCGTGGGT AGAGTCA T |
| <i>IL-6</i> | |
| Forward | GCCAGAGTCA TTCAGAGCAA T A |
| Reverse | GTTGGA TGGTCTGGTCCTT AG |

| | |
|--------------|-------------------------|
| <i>BCL-2</i> | |
| Forward | CAGCA TGCACCTCTGTTG |
| Reverse | CAGGT A TGCACCCAGAGTGA |
| <i>S100B</i> | |
| Forward | TTCAGGGAGAGAGGGTGACAA |
| Reverse | CTTCCTGCTCTTGA TTTCCTCC |

ANEXO 2

CSPG4 Modulates the Effects of *Clostridioides difficile* Toxins A and B on Enteric Glial Cells: Inflammatory Response, Cell Death, and Senescence

Francisco Maick dos Santos MARQUES^{1*}; Deiziane Viana da Silva COSTA^{2*}; Conceição Silva Martins REBOUÇAS¹; Gerly Anne de Castro BRITO¹; Cirle Alcantara WARREN^{2#}; Renata Ferreira de Carvalho LEITÃO^{1#}

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

²Division of Infectious Diseases and International Health, University of Virginia, Charlottesville, Virginia, VA, USA

*# These authors contributed equally to this work

ABSTRACT

Clostridioides difficile infection (CDI) is a growing public health problem characterized by severe colitis, a high recurrence rate, and significant costs to healthcare systems. Over the past ten years, a substantial increase in community-acquired cases and the pediatric population, a group previously considered less vulnerable, has been observed globally. Although most studies have focused on the acute effects of the Infection and its impact on intestinal epithelial cells, the effects of CDI on enteric glia, which are essential for intestinal homeostasis and Motility, as well as the long-term consequences of the Infection, remain poorly explored. This research investigates the role of the chondroitin sulfate proteoglycan receptor (CSPG4) in mediating the effects of *Clostridioides difficile* toxins A (TcdA) and B (TcdB) on enteric glial cells. The CRL2690 cell line (ATCC), derived from rat jejunum, was incubated with TcdA (50 ng/mL) and TcdB (1 ng/mL) in the presence or absence of a blocking anti-CSPG4 antibody, which was added one hour before toxin exposure. The impact of CSPG4 modulation was assessed across multiple parameters, including inflammatory response (evaluated by IL-6 and S100B gene expression via qPCR and extracellular S100B levels via ELISA), apoptosis (via NFκB and STAT3 activation), and cellular senescence (through SA-β-galactosidase

activity). All readouts were analyzed by immunofluorescence and quantitative assays. Mice infected with *C. difficile* were euthanized on day 3 post-infection to verify CSPG4 expression in the cecum and colon. The results show that enteric glial cells naturally express CSPG4, but its expression is increased by exposure to TcdA and TcdB. CDI significantly increases CSPG4 expression in the myenteric plexus of the cecum and colon of mice. CSPG4 mediates the release of IL-6 and S100B in enteric glia, as well as the nuclear translocation of NF κ B and STAT3. This receptor was not shown to be significant in TcdB-induced apoptosis. However, it is substantial in the senescence process caused by TcdB. Our findings suggest an essential role for CSPG4 in the pathogenesis of CDI and its potential as a therapeutic target to circumvent the detrimental effects of *C. difficile* toxins on enteric glia.

KEYWORDS: *Clostridioides difficile*; Enteric nervous system; Chondroitin sulfate proteoglycan

INTRODUCTION

Clostridioides difficile infection (CDI) represents a growing public health problem, traditionally associated with hospital settings, but with a significant increase in community-acquired cases observed in recent years (SALVATI et al., 2024). The condition, characterized by severe colitis and a high recurrence rate, is strongly linked to the indiscriminate use of antimicrobials and subsequent intestinal dysbiosis. The COVID-19 pandemic has exacerbated this situation, driving antibiotic use and, consequently, increasing the incidence of CDI (STOIAN et al., 2024). The clinical disease ranges from mild diarrhea to fulminant disease or death (COSTA et al. 2024).

C. difficile toxins A (TcdA) and B (TcdB) are the main virulence factors produced by *C. difficile* during CDI. These toxins promote gut inflammation and cell death, which can be exacerbated by a persistent immune response (ALAM; MADAN, 2024). Besides affecting intestinal epithelial cells, several studies showed evidences that TcdA and TcdB affects enteric nervous system (ENS) cells, such as enteric glia and neurons, which play an important role in regulating GI essential function such as intestinal motility, secretion and permeability (COSTA et al., 2025). As a result of these, several intestinal complications have been reported as possible sequelae of CDI, including irritable bowel syndrome (IBS), gastroesophageal reflux disease (GERD), functional diarrhea, dyspepsia, and constipation,

with IBS and constipation being the most common complications (GUTIÉRREZ et al. 2015). Furthermore, symptoms such as abdominal pain, constipation, diarrhea, IBS, and dyspepsia can persist for up to two years after the infection resolves (BERLAM et al. 2018). A previous study reported that enteric glia that survive the cytotoxic effects of TcdB can remain metabolically active and enter the senescence process (FETTUCCIARI et al., 2018). Senescence is characterized by irreversible cell cycle arrest and changes in metabolism, morphology, and gene expression, as well as the occurrence of DNA modifications and damage (LIU et al., 2025). There is no evidence that TcdA can promote a senescence state in enteric glia, and how the *C. difficile* toxins receptors contribute to this persistent damage post-*C. difficile* toxin exposure.

Recent findings indicate that TcdB is more strongly associated with the severity of CDI, exhibiting a cytotoxic potential 100- to 1,000-fold greater than that of TcdA. These findings highlight TcdB as a central factor in the clinical severity of CDI (POURLIOTOPOULOU et al., 2024). The difference in cytotoxic potential between the two toxins had already been suggested by Aktories (1997), who attributed it to differences in the density of toxin-specific receptors on the cell surface. Currently, known receptors for TcdB include Frizzled (1, 2, and 7), Poliovirus-Like Receptor 3 (PVRL3), Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI), Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein 1 (LRP1), and Chondroitin Sulfate Proteoglycan 4 (CSPG4) (TAO et al., 2019; KINSOLVING et al., 2024; QUTUB et al., 2025). Among these TcdB receptors, the loss of CSPG4 in vivo has been shown to protect the host against clinical aspects of CDI (Manion et al., 2023); however, the mechanism behind this protection remains to be elucidated.

In this context, the present study aimed to identify the distribution of *C. difficile* toxin receptors in enteric glia and investigate the role of the CSPG4 receptor in modulating the expression of inflammatory mediators, cell death, and senescence induced by *C. difficile* toxins A and B in these cells.

METHODS

Assessment of expression of *C. difficile* toxin receptors in enteric glial cells from mice, rats, and humans

To investigate the involvement of the CSPG4 receptor in enteric glia response to *C. difficile* toxins, we first evaluated whether enteric glia from mice, rats, and humans express CSPG4 as well as other known receptors for *C. difficile* toxins. An initial screening was conducted using the publicly available single-cell RNA sequencing database Single Cell Portal (https://singlecell.broadinstitute.org/single_cell) (DROKHLYANSKY et al. 2020), where we assessed the expression profiles of multiple *C. difficile* toxin receptors (*Cspg4*, *Pvrl3*, *Fzd1*, *Lrp1*, *Fzd2*, *Tfpi*, *Fzd7*, and *Ldlr*) across datasets of enteric nervous system cells. To validate the most expressed receptors, we performed immunofluorescence staining to evaluate CSPG4 protein expression in the myenteric plexus of colonic tissue from non-infected human and mice samples, as well as in the immortalized rat enteric glial cell line PK060399egfr (ATCC CRL-2690, VA, USA).

Samples from mice and humans

The paraffin-embedded samples from the large intestine of uninfected and infected humans and mice used in this study were previously described (COSTA et al., 2021).

Immunofluorescence in colonic and cecum tissues

Sections (4 µm thick) were prepared from paraffin-embedded cecum and colon tissues from uninfected and *C. difficile*-infected mice, as well as colonic tissues from humans (uninfected and infected with *C. difficile*). Following deparaffinization, antigen retrieval (sodium citrate pH 6.0) was performed by incubating the slides in citrate buffer solution at low pH (Abcam) for 10 min at 95°C. To reduce non-specific binding, slides were then incubated in a blocking solution containing 5% donkey serum and 0.1% Triton X-100 in PBS for 1 hour at room temperature. The sections were then incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies: anti-CSPG4 (Abcam, ab275024, 1:400), or anti-nectin 3 (Invitrogen, PA5-51095, 1:100) to assess colocalization in enteric glial cells. Following primary antibody incubation, the slides were washed twice in PBS with 0.05% Tween-20 for 5 minutes and then incubated for 2 hours at room temperature with species-specific secondary antibodies: donkey anti-rabbit 594 (Abcam, ab150064, 1:400) and donkey anti-chicken 488 (Abcam, ab150169, 1:400). Slides were washed with PBS (5 minutes) and incubated with DAPI (Invitrogen, D1306; 1:1000 in PBS) for 5 minutes. The DAPI solution was then refreshed and incubated for an additional 5 minutes. Finally, the slides were washed three times in PBS (5 minutes each) and

coverslipped using 30 µL of mounting medium (Vector Laboratories, Vector® TrueVIEW™ Autofluorescence Quenching Kit). Fluorescence images were captured using a Leica DM1000 fluorescence microscope equipped with a digital camera and LAS 3.5 acquisition software (Leica Microsystems, Germany).

Immunohistochemistry in cecum and colon tissues

Sections (4 µm thick) were prepared from paraffin-embedded mouse cecum and colon tissues. Following deparaffinization, antigen retrieval was performed by incubating the slides in citrate buffer Target retrieval solution at low pH (K8005, Dako) for 20 min at 95°C in PTLink (PT10027, Dako). To reduce non-specific binding, endogenous peroxidase was blocked by incubating with 3% H₂O₂ for 10 minutes. The sections were then incubated for 4 hours with an anti-GSPG4 (Abcam, ab275024, 1:400), followed by a 30-minute incubation with polymer HRP (K8000, Dako). The antibody binding sites were visualized by incubating the samples with diaminobenzidine-H₂O₂ (DAB, Dako) solution. Sections incubated with antibody diluent without a primary antibody were used as negative controls. The brown coloration identified positive staining. Immunohistochemistry images were captured using a light microscope equipped with a digital camera and the LAZ 3.5 acquisition system (LEICA DM1000, Germany). To quantify the CSPG4-immunostained area, Adobe Photoshop 8.0 was used to determine both the total tissue area and the immunostained area. The percentage (%) of the stained area was then calculated using the following formula: (Immunostained area [pixels] × 100) / Total area [pixels].

Rat Enteric Glial Cell Culture and Treatment

Immortalized rat enteric glial cell line PK060399egfr (ATCC CRL-2690, VA, USA) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco) and supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% antibiotics (100 µg/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin, Gibco), and 1 mM sodium pyruvate (Gibco) at 37°C in a humidified incubator under 5% CO₂ for no more than 24 passages. For all experiments, enteric glia cells were released using 0.05% trypsin-EDTA for 5 min.

To investigate the role of the CSPG4 receptor in the response of enteric glial cells (EGCs) to TcdA (50 ng/mL) or TcdB (1 ng/mL), cells were pretreated for 1 hour with 0.001 µg/mL of Anti-CSPG4. The Anti-CSPG4 concentration was selected based on a cell death assay (Additional File: Figure S1). After 18 hours of incubation with the TcdA or TcdB, the cells were harvested for analysis of the study

parameters. For senescence studies, cells were harvested for analysis after 8, 72, 96, 120, and 144 hours (6 days) post-toxin removal.

The concentrations of TcdA (50 ng/mL) and TcdB (1 ng/mL) were selected based on previous studies conducted by our research group (Costa et al., 2021, 2023; Loureiro et al., 2022). Purified TcdA and TcdB, derived from *C. difficile* strain VPI 10463, were obtained from TechLab (Virginia, USA).

qPCR analysis

Quantitative PCR (qPCR) was performed to assess how exposure to (50 ng/mL) or TcdB (1 ng/mL) affects the expression of Cspg4, Pvrl3, Fzd1, Lrp1, Fzd2, Tfpi, Fzd7, Ldlr, Bcl-2, S100B, and IL-6 in enteric glial cells at different incubation time points (2, 12, and 18 hours). For this time-course experiment, control cells were incubated with culture medium only. To evaluate the contribution of CSPG4 in the expression of *Bcl-2*, *S100B*, and *IL-6* in enteric glial cells exposed to TcdA (50 ng/mL) or TcdB (1 ng/mL), cells were then treated with anti-CSPG4 antibody (0.001 µg/mL) or isotype control for 1 hour, followed by incubation with TcdA (50 ng/mL) or TcdB (1 ng/mL) for 18 hours. After treatment, total RNA was extracted using the RNeasy® Mini Kit (Qiagen) on the QIAcube automated system. RNA concentration and purity were measured, and samples were treated with DNase I (Invitrogen) to eliminate genomic DNA contamination. Subsequently, RNA was reverse transcribed into cDNA using the iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad). qPCR amplification of *Bcl-2*, *S100B*, *IL-6*, and the reference gene *GAPDH* was performed using the CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) under the following conditions: initial denaturation at 95°C for 30 seconds, followed by 40 cycles of 95°C for 5 seconds and 60°C for 30 seconds. Reactions were carried out using iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad). Primer sequences are provided in Table S1. Relative gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (LIVAK E SCHMITTGEN, 2001).

Cell death (Phosphatidylserine-Annexin V binding assay)

To investigate the involvement of the CSPG4 receptor in *C. difficile* toxin-induced cell death, a real-time phosphatidylserine (PS)-Annexin V binding assay was performed on live enteric glial cells, following the manufacturer's instructions (Glo-Annexin V Apoptosis Real-Time Assay, Promega, JA1011). First, enteric glial cells (10^4 cells/well) were cultured and plated in white, opaque 96-well plates (Falcon). After 24 hours, the cells were treated with 0.001 µg/mL of Anti-CSPG4 or isotype control. After 1 hour of incubation, TcdA (50 ng/mL) or TcdB (1 ng/mL) were added. Control cells were

incubated with medium only with or without isotype control. Then, 100 µL of 2x detection reagent (2 µL of the annexin substrate NanoBit, 2 µL CaCl₂, 2 µL annexin V-SmBit and 2 µL annexin V-LgBit in 1000 µL of supplemented DMEM pre-warmed to 37°C) was added to each well, and incubated at 37°C in a humidified incubator under 5% CO₂ for 18 hours. Luminescence was measured using a luminometer (Biotek Epoch, PROMEGA). To obtain the Relative Luminescence Unit (RLU), the luminescence signal of all samples was subtracted from the intrinsic luminescence of the detection reagent (a well containing only DMEM supplemented without cells) and normalized to the control group (cells exposed only to the supplemented culture medium).

Caspase-3/7 Activity

Caspase-3/7 activity was measured using the Caspase-Glo® 3/7 Assay (Promega, G8090), according to the manufacturer's instructions. Briefly, enteric glial cells (1×10^4 cells/well) were seeded into white, opaque 96-well plates (Falcon) and cultured for 18 hours. Cells were then treated with anti-CSPG4 antibody (0.001 µg/mL) or isotype control (0.001 µg/mL) for 1 hour before the addition of TcdA (50 ng/mL) or TcdB (1 ng/mL). Control cells were incubated with medium only. After 18 hours of toxin exposure, 100 µL of Caspase-Glo 3/7 reagent (substrate reconstituted in buffer and equilibrated to room temperature) was added to each well. The plate was shaken for 30 seconds at 500 rpm and incubated for 2 hours at room temperature in the dark. Luminescence was measured using a microplate luminometer (BioTek Epoch, Promega). Relative luminescence units (RLU) were calculated by subtracting the background signal (wells containing only Caspase-Glo 3/7 reagent and supplemented DMEM, without cells) from the total signal of each sample.

Measurement of S100B

To evaluate the involvement of the CSPG4 receptor in S100B release, the concentration of S100B in the supernatant of enteric glial cells (6×10^5 cells seeded in 6-well plates) was measured after 18 hours of exposure to TcdA or TcdB, in the presence or absence of anti-CSPG4. The measurement was performed by ELISA using the DuoSet S100B kit (R&D Systems), according to the manufacturer's instructions and as previously described. Absorbance was read at 450 nm using an Epoch plate reader (BioTek).

Immunofluorescence Analysis

Immunofluorescence assays were performed to evaluate (i) the involvement of the CSPG4 receptor in the nuclear translocation of NF κ B p65 and phosphorylated STAT3 (pSTAT3), and (ii) cellular senescence in enteric glial cells following exposure to TcdA or TcdB.

For all assays, enteric glial cells (4×10^4 cells/well) were seeded on polystyrene glass chamber slides (8-well for NF κ B/pSTAT3 analysis and 4-well for senescence analysis). To investigate the role of CSPG4, cells were pretreated with anti-CSPG4 antibody (0.001 μ g/mL) or isotype control one hour prior to incubation with TcdA (50 ng/mL) or TcdB (1 ng/mL).

NF κ B and pSTAT3 Nuclear Translocation

Cells were treated with TcdA or TcdB for 18 hours, then fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 30 minutes at room temperature and permeabilized with 0.5% Triton X-100 and 3% BSA in PBS for 5 minutes at 4°C. Non-specific binding was blocked using 5% normal donkey serum in PBS for 30 minutes. Cells were incubated overnight at 4°C with primary antibodies against CSPG4, NF κ B p65 (Santa Cruz Biotechnology, sc-372), or pSTAT3 (R&D Systems, AF4607). After three washes with PBS containing 0.01% Tween-20, cells were incubated for 2 hours at room temperature with appropriate fluorophore-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch, 711-165-152 or NovusBio, NB7606). Nuclei were counterstained with DAPI (1:1000 in PBS) for 10 minutes. Slides were mounted using antifade mounting medium containing phalloidin to visualize the actin cytoskeleton. Fluorescent images were acquired using a Zeiss fluorescence microscope. For quantification, 100 cells per condition were counted, and the percentage of cells showing nuclear immunoreactivity for NF κ B p65 or pSTAT3 was calculated.

Cellular Senescence (β -galactosidase)

To assess senescence, cells were exposed to TcdA or TcdB for 24 hours. After toxin removal, fresh medium was added and replaced every two days. Senescence was assessed at five time points: 48, 72, 96, 120, and 144 hours post-toxin removal. Immunostaining for β -galactosidase was performed using the CellEvent™ Senescence Green Detection Kit (Thermo Fisher Scientific, C10850), following the manufacturer's protocol. Cells were fixed for 20 minutes, washed twice with PBS containing 1% BSA, and incubated with the detection solution for 2 hours at 37°C, protected from light. After three

washes, nuclei were stained with DAPI (Invitrogen, D1306, 1:1000 in PBS) for 10 minutes, followed by final washes. Slides were mounted with VECTASHIELD HardSet antifade mounting medium (Vector Laboratories, H-1400-10). Images were acquired with a Leica DM1000 fluorescence microscope equipped with a digital camera and LAS v3.5 software. Quantification of senescence-associated fluorescence was performed using ImageJ software at 200 \times magnification from three fields per sample.

Statistical Analysis

The data are presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Student's t-test or one- or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test was used to compare means. P<0.05 was considered to indicate significance.

RESULTS

Comparative Expression of *C. difficile* Toxin Receptors in Enteric Glial Cells Across Species

Figure 1A shows the gene expression of all known receptors for TcdA (*Ldlr*) and TcdB (*Cspg4*, *Tfpi*, *Pvrl3*, *Lrp1*, *Fzd1*, *Fzd2*, and *Fzd7*) in enteric glial cells from three different organisms: humans, mice, and rats. Glial cells were identified based on the expression of the markers *Gfap*, *Sox10*, *S100B*, and *Plp1*. All three species, human, mouse, and rat, express the full set of TcdA and TcdB receptors, although expression levels and distribution vary. The most highly expressed receptors in both humans and mice were *Cspg4*, *Lrp1*, *Pvrl3*, and *Ldlr*, while in rats, the most prominent were *Pvrl3*, *Fzd1*, *Fzd2*, and *Lrp1*.

Temporal Modulation of TcdA e TcdB Receptor Expression in Enteric Glial Cells

Next, we investigated whether *C. difficile* toxins could change the expression of their receptors in enteric glia. Figure 2 shows the expression patterns of various known receptors for TcdA and TcdB in enteric glial cells following incubation with TcdA (50 ng/mL) or TcdB (1 ng/mL) for 2, 12, and 18 hours. The control group consisted of cells incubated with culture medium only. Receptor expression varied depending on the duration of toxin exposure. No significant changes were observed after 2 hours of incubation with either toxin. CSPG4, shown in Figure 2A, exhibited a marked increase in both TcdA and TcdB expression after 12 hours of incubation, followed by a slight decrease at 18 hours. However,

CSPG4 gene expression remained elevated in the cells exposed to the toxins compared to the control cells. In contrast, Pvrl3 (Figure 2B) expression decreased at 12 hours and remained downregulated at 18 hours in response to both toxins. Fzd1 (Figure 2C) exhibited reduced expression after 12 hours of TcdA exposure, which persisted at a low level at 18 hours; in contrast, TcdB had no significant effect. Lrp1 (Figure 2D) expression remained unchanged at 2 and 12 hours but was downregulated by both toxins at 18 hours. Similarly, Fzd2 (Figure 2E) was downregulated after 12 hours of exposure to both toxins and remained suppressed at 18 hours. Tfpi (Figure 2F) was upregulated after 12 hours of TcdA exposure, but not after 18 hours; conversely, TcdB induced increased Tfpi expression only at 18 hours. Fzd7 (Figure 2G) showed no significant changes at any time point or in response to either toxin. Finally, Ldlr (Figure 2H) was downregulated by both toxins after 12 hours but showed increased expression at 18 hours compared to the control.

Figures 2I and 2J illustrate the impact of both TcdA and TcdB increasing CSPG4 protein expression in enteric glial cells compared to the control group.

In vivo CSPG4 data in infection model

Given that CSPG4 was the most upregulated *C. difficile* toxin receptor in enteric glia under challenge conditions and it is increased during CDI in vivo, we focused on understanding the role of this receptor in cell death, expression of inflammatory markers, and senescence induced by TcdA and TcdB in enteric glia.

Immunoexpression Evaluation of CSPG4 Expression in the Cecum and Colon of Animals

Infected with *C. difficile*

Figure 3A shows that CSPG4 is constitutively expressed in the myenteric plexus of the cecum and colon in mice, as observed in the control group of non-infected mice. Following *C. difficile* infection, CSPG4 immunostaining is markedly increased in both regions, where the receptor is visualized in brown. Immunofluorescence analyses of the cecum (Figure 3B) and colon (Figure 3C) confirmed these findings. In the images, CSPG4 is labeled in red, the myenteric plexus is shown in green using the GFAP marker, and nuclei are stained blue with DAPI.

CSPG4 Modulates NF κ B Nuclear Translocation in Enteric Glial Cells and IL-6 Expression in Response to TcdB, but Not TcdA

We have previously reported that both TcdA and TcdB activate the transcription factor NF κ B in enteric glial cells, and that this activation regulates the nuclear transcription of pro-inflammatory cytokines such as IL-6 (Costa et al., 2021), as confirmed in Figure 4C.

The increase in NF κ B nuclear translocation induced by toxin exposure is illustrated in Figures 4A and 4B. As shown in Figure 4B, quantification of enteric glial cells with NF κ B-positive nuclei revealed that CSPG4 blockade does not prevent or reduce NF κ B nuclear translocation induced by TcdA. In contrast, CSPG4 blockade partially inhibits NF κ B translocation to the nucleus in cells exposed to TcdB (Figure 4B), suggesting that this receptor plays a crucial role in activating the NF κ B pathway in response to TcdB. Consistently, CSPG4 blockade also downregulates IL-6 expression in cells challenged with TcdB (Figure 4C), but does not reduce IL-6 expression in cells exposed to TcdA. In line with these findings, CSPG4 also modulates the expression of S100B in response to TcdB, but not TcdA, as shown in Figure S3. Interestingly, CSPG4 selectively modulates TcdA-induced, but not TcdB-induced, apoptosis (Figure S4). Both toxins increased caspase-3/7 activation, but this was unaffected by CSPG4 blockade. Bcl-2 expression also remained unchanged across groups, indicating no modulation of anti-apoptotic pathways by CSPG4 (Figure S4).

CSPG4 Modulates STAT3 Nuclear Translocation in Enteric Glial Cells Exposed to TcdB, but Not TcdA.

Figures 5A and 5B show an increase in STAT3-immunopositive nuclei in both TcdA and TcdB groups compared to the control group (isotype). CSPG4 blockade does not prevent or attenuate STAT3 nuclear translocation induced by TcdA (Figure 5A). However, in the TcdB group, CSPG4 inhibition significantly reduces the number of STAT3-positive nuclei (Figure 5B), suggesting that CSPG4 acts as an important modulator of STAT3 activation in enteric glial cells exposed to toxin B.

CSPG4 Modulates TcdA- and TcdB-Induced Senescence in Enteric Glial Cells.

A senescence assay using the β -galactosidase marker (SA- β -Gal) was performed in enteric glial cells challenged with *C. difficile* toxins TcdA and TcdB. Figure 6A presents a time-course analysis (48 h, 72 h, 96 h, 120 h, and 6 days) of senescence in enteric glia following incubation with both toxins. SA- β -

Gal staining increased significantly after 96 hours of incubation with either TcdA or TcdB compared to the control group. At 120 hours, TcdA-treated cells no longer showed a significant difference from the control, while TcdB continued to increase SA- β -Gal staining. After 6 days, both toxins induced a notable increase in the number of senescent cells.

Since both toxins induced senescence after 96 hours, this time point was selected to study the modulatory role of CSPG4 in this process. Figures 6B and 6C present the qualitative and quantitative analyses, respectively, of SA- β -Gal immunofluorescence (green). The results show that CSPG4 modulation significantly reduced toxin-induced senescence in enteric glial cells, suggesting that this receptor plays a key role in mediating the cellular response to senescence.

DISCUSSION

In our research, we demonstrated that enteric glia, both in humans and in mice and rats, express all currently known receptors for *C. difficile* toxins A and B, namely LDLR, the toxin A receptor (TAO et al., 2019), and the receptors CSPG4, FRIZZLED (1, 2, and 7), PVRL3, TFPI, and LRP1 (KINSOLVING et al., 2024).

The ENS plays a central role in controlling gut functions at all times, such as Motility, mucosal fluid exchange, and immune homeostasis (SHARKEY; MAWE, 2023). ENS cells, specifically enteric neurons and enteric glia, are profoundly affected by *C. difficile* toxins. In the acute phase of the disease, the loss of enteric glia contributes to inflammation, secretory diarrhea, and intestinal tissue damage (COSTA et al., 2025).

Enteric glial cells are strongly recognized as regulators of various intestinal functions, including Motility, secretion, epithelial barrier integrity, and overall intestinal balance in both healthy and pathological conditions (LÓPEZ-GÓMEZ et al., 2021). When these cells transition to a reactive glial phenotype in response to intestinal inflammation, they contribute to enteric gliosis, potentially changing their cellular structure and, consequently, their function (LINAN-RICO et al., 2023). Recent studies with *C. difficile* and glial cells demonstrated the reactivity of these cells when exposed to toxins A and B (COSTA et al., 2021). One of the main structural changes in enteric glial cells caused by *C. difficile* toxins is cell rounding, associated with the inhibition of RhoGTPases in these cells, disrupting the actin cytoskeleton. This also causes cell cycle arrest and death by premature necrosis or apoptosis (BASSOTTI et al., 2020).

The phenotypic and functional changes in enteric glia cause them to express different subpopulations of receptors and mediators in response to inflammatory stimuli present in the enteric microenvironment. This occurs during CDI when toxins target enteric glial cells (PACÍFICO et al., 2025). As shown in this study, among all known TcdB receptors, CSPG4 stands out as one of the most abundantly expressed in intestinal cells, constituting a strategic target for CDI and, therefore, a relevant study object for investigating the effects mediated by TcdB during CDI (CHEN et al., 2021).

In this study, we demonstrated that the CSPG4 receptor is naturally expressed in enteric glial cells; however, its expression is increased when the cells are challenged with TcdA and TcdB. We also showed that CSPG4 expression is increased in the cecum and colon of mice infected with *C. difficile*. Other studies have also demonstrated that both toxins alter the expression of enteric glial membrane receptors. Pacífico and colleagues (2025), for example, studied the role of Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4) and demonstrated that TRPV4 expression also increases in both the cecum and colon of *C. difficile*-infected mice. The study also shows the upregulation of TRPV4 in enteric glial cell lines cultured in vitro.

A study by Costa and colleagues (2023), also in enteric glial cells cultured in vitro, showed that TcdA and TcdB increase the expression of anti-inflammatory adenosine receptors (A2A and A3) and decrease the expression of the proinflammatory adenosine receptor (A2B).

Chen and colleagues (2021) studied the role of CSPG4 in CDI in the cecal and colon epithelial cells of infected mice. They showed that the Infection induced extensive epithelial disruption and inflammatory cell infiltration, as well as severe hemorrhagic congestion and mucosal edema in WT mice. However, CSPG4-KO mice exhibited only moderate levels of epithelial damage and inflammatory cell infiltration and mild or absent hemorrhagic congestion and submucosal edema, suggesting that CSPG4 plays a vital role in CDI.

López-Gómez et al. (2021) had previously reported that when enteric glial cells acquire a proinflammatory phenotype in response to pathological stimuli, such as bacterial products, these cells begin to express receptors, membrane ion channels, glial mediators such as GFAP, S100B, and SOX10, as well as inflammatory cytokines, primarily IL-6, TNF- α , and IL-1 β . Interleukin-6 (IL-6) is one of the most relevant proinflammatory cytokines because it plays a significant role in the regulation of different physiological and pathological processes, mainly in acute and chronic inflammation and infectious and neoplastic diseases (KAUR et al., 2020). IL-6 upregulation occurs primarily through

activation of the NF- κ B (Nuclear Factor Kappa B) pathway. Various stimuli, such as infections, tissue damage, and inflammatory signals, activate this pathway. Once activated, NF- κ B migrates to the cell nucleus and binds to the IL-6 gene promoter, initiating transcription of this interleukin and, consequently, resulting in IL-6 production (GUO et al., 2024).

In the present study, we show that TcdA and TcdB increase the nuclear translocation of NF- κ B in enteric glial cells; consequently, IL-6 is also upregulated. When CSPG4 is blocked, NF- κ B migration and IL-6 expression, as spurred by TcdB, decrease, suggesting this receptor is an important target for this inflammatory signaling pathway in DHF. In the study by Pacífico et al. (2025), it was reported that both *C. difficile* toxins increased IL-6 gene expression in enteric glia via NK κ B, but blocking the TRPV4 receptor with the antagonist RN-1734 did not interfere with the effect of TcdB, unlike our study.

Another study conducted by our research group showed that both TcdA and TcdB induce upregulation of IL-6 through activation of the P2X7 receptor via NK κ B in enteric glia (LOUREIRO et al., 2022).

In our study, in addition to NK κ B, blocking the CSPG4 receptor in enteric glial cells challenged with TcdB also decreased the translocation of the transcription factor STAT3 to the nucleus, suggesting CSPG4 is also an important modulator of this transcription factor in enteric glia. These findings are consistent with the study by Nezhadi et al. (2025), in which they argued that *C. difficile* toxins activate the inflammatory signaling pathways, NF- κ B and STAT3, and that the extensive production of proinflammatory cytokines and chemokines, such as IL-6, IL-8, and TNF- α , accompanies these pathways. The authors also showed that chronic inflammation caused by these cytokines not only ensures the survival of damaged cells but also accelerates the proliferation of mutated cells. These findings raise the hypothesis that these cytokines, as well as the NF- κ B and STAT3 pathways, are related to the process of cellular senescence since cells that survive pathological processes, such as Infection, can become senescent (FETTUCCIARI et al., 2018). Grivennikov and Karin (2010) reported that NF- κ B and STAT3 are ubiquitously expressed and are rapidly activated in response to various stimuli, including stress and inflammation. When activated, NF- κ B and STAT3 control the transcription of proinflammatory cytokines in the nucleus and can act individually or mutually (YOON et al., 2010; BASU et al., 2017). IL-6, for example, whose expression is induced in response to NF- κ B, leads to the activation of STAT3. Once activated, STAT3 can lead to the production of more IL-6, creating a positive feedback loop that can further amplify the inflammatory response (GRIVENNIKOV AND KARIN, 2010). Based on this assumption, Yoon et al. (2010) further argued that STAT3 may

contribute to the adequate induction of IL-6 by NF-κB, as it plays critical roles in binding to IL-6 promoters, as well as in the nuclear retention of NF-κB.

The involvement of the CSPG4 receptor in IL-6 production and the NF-κB and STAT3 pathway in the inflammatory mechanisms arising from *C. difficile* toxins, especially TcdB, offers an opportunity to find a new way to address CDI through the inhibition or attenuation of these inflammatory pathways, either by blocking CSPG4 or by modulating it. Another important inflammatory marker in intestinal diseases is S100B, a calcium-binding protein that, at high concentrations, participates in inflammatory processes and exhibits toxic effects, behaving as a damage/danger-associated molecular pattern (DAMP) molecule (DI LIDDO et al., 2020).

S100B is overexpressed in enteric glia and correlates with the intestinal inflammatory state. It also stimulates NO production in human ulcerative colitis (CIRILLO et al., 2009). Esposito and colleagues (2012) conducted a study with the S100B inhibitor pentamidine and demonstrated improvement in the severity of acute colitis experimentally induced by dextran sodium sulfate (DSS) in mice.

Costa and collaborators (2021) also studied S100B modulation. The authors found that S100B inhibition by pentamidine reduces the synthesis of inflammatory markers such as IL-1 β , IL-18, IL-6, TNF- α , IL-17, IL-23, and IL-2, and decreases the expression of several NF κ B-related genes. It increased the transcription (SOCS2 and Bcl-2) of protective mediators, reduced neutrophil recruitment, and mitigated intestinal damage and diarrhea severity in *C. difficile*-infected mice. In enteric glial cells, TcdA and TcdB increased S100B-mediated IL-6 expression through RAGE/PI3K/NF κ B activation. This demonstrates that CDI appears to increase colonic S100B signaling in enteric glia, which in turn increases the inflammatory response. In our study, CSPG4 was shown to be very important for S100B activity in enteric glia challenged with TcdB; its blockade caused downregulation of the S100B gene. However, the protein expression of this marker increased slightly after 18 h of incubation with TcdB.

In the study by Costa and colleagues (2021), gene and protein expression of S100B in the extracellular medium began to increase after 6 h of incubation with TcdB in enteric glial cells. These findings may explain the increased S100B levels, as we quantified it in the cell supernatant after 18 h of incubation with the toxin. However, the protein may have accumulated earlier, as indicated in the aforementioned study.

According to Fettucciaro and colleagues (2017), enteric glial cells are highly susceptible to the effects of TcdA and TcdB, although toxin B causes more cellular damage and also induces apoptosis in these

cells, as demonstrated in previous studies (MACCHIONI et al., 2017; COSTA et al., 2024). This susceptibility is mainly due to inflammatory cytokines related to apoptosis, such as IFN- γ , IL-1 β , TNF- α , IL-6, among others, and the persistence of altered functions in surviving cells that suggest an important role for enteric glia in the pathogenesis of *C. difficile* infection.

Apoptosis, or programmed cell death, is a cellular process that controls various cellular activities, such as cell renewal and immune response function. However, when apoptosis occurs in a disordered manner, it can lead to damaging conditions in cells, such as immune system dysregulation and tissue degeneration, among others (GUO et al., 2024).

In our study, CSPG4 was not a determinant of enteric glial cell apoptosis caused by TcdB. Blocking it did not reduce cell death, suggesting that other TcdB receptors may be more involved in this mechanism, including Frizzled (1, 2, and 7), PVRL3, TFPI, or LRP1 (KINSOLVING et al., 2024). Interestingly, blocking CSPG4 reduced TcdA-induced apoptosis. CSPG4 is known to associate with integrins and other extracellular matrix components, which can influence processes such as cell migration and extracellular matrix organization. These interactions can modify cellular architecture, potentially affecting the accessibility and efficiency of protein internalization (JORDAAN et al., 2017). We hypothesize that CSPG4 exerts an indirect effect on TcdA internalization through its interactions with the extracellular matrix and cell adhesion proteins. Furthermore, further studies are needed to support this hypothesis.

In the study by Pacífico et al. (2025), blocking the TRPV4 receptor was able to reduce apoptosis caused by both TcdA and TcdB in enteric glia. Similarly, Costa et al. (2024) demonstrated that adenosine receptors play a regulatory role in enteric glial cell death and the pro-inflammatory response induced by TcdA and TcdB.

Apoptosis is regulated by a family of proteins called caspases, which are proteolytic enzymes belonging to the cysteine protease family. Caspases are broadly classified by their known roles in apoptosis (caspase-3, caspase-6, caspase-7, caspase-8, and caspase-9 in mammals) and inflammation (caspase-1, caspase-4, caspase-5, and caspase-12 in humans and caspase-1, caspase-11, and caspase-12 in mice) (SAHOO et al., 2023). Enzymes involved in apoptosis are subclassified according to the mechanism of action as initiator caspases (caspase-8 and caspase-9) or executioner caspases (caspase-3, caspase-6, and caspase-7) (Svandova et al., 2024).

In addition to caspases, proteins of the antiapoptotic B-cell lymphoma 2 (BCL-2) family are key

regulators of mitochondrial apoptosis, acting primarily as suppressors of programmed cell death (QIAN et al., 2022). TcdB-induced apoptosis of enteric glial cells is essentially mediated by the activation of caspase-3 and the late activation of caspase-7 (FETTUCCIARI et al., 2022), as demonstrated in this study. In addition, Bcl-2 is not always involved, and its expression may be unchanged, as shown by Matte and collaborators (2009) and as demonstrated in this study. Although CSPG4 does not play a significant role in TcdB-induced cell death in enteric glia, our study demonstrated, for the first time, that this receptor may be an important target for the senescence process present in enteric glial cells caused by TcdB.

Cellular senescence refers to a stable, non-proliferative state that cells enter in response to various stresses. This process is characterized by irreversible cell cycle arrest, changes in cellular metabolism, morphology, and gene expression (ZHANG et al., 2023) and can be caused by antitumor drugs, radiation, oxidative stress, and aging that damage DNA (ZHU, WU, YANG, 2024). Senescence can also be caused by toxins produced by bacteria such as colibactin from Escherichia coli (SECHER et al., 2013) and pyocyanin from Pseudomonas aeruginosa (GRASSO; FRISAN, 2015).

The main marker used to identify senescent cells is the enzyme β -galactosidase (SA β -Gal). This enzyme resides in lysosomes and is active in most cells at pH 4 (lysosomal acidification), indicating its normal state. Senescent cells accumulate active SA β -Gal at pH 6, undergo cell cycle arrest, and obtain a senescence-associated secretory phenotype (SASP) and overexpression of the GLB1 gene, which encodes this enzyme (VALIEVA et al., 2022). SA β -Gal converts β -galactosides to monosaccharides under acidic pH conditions. The enzymatically cleaved product is retained within the cell due to covalent binding of intracellular proteins and emits a fluorogenic signal, which can be easily identified by fluorescence assays (VALIEVA et al., 2022; KHAN et al., 2024). In fact, in *in vitro* cell assays, it is normal for the control group to present some SA β -Gal marking, as shown in the present study, even if it was not challenged with toxin, since according to Debacq-Chainiaux and collaborators (2009), cells maintained in confluence may present activity related to senescence due to the cellular aging itself mimicked *in vitro*.

The literature shows that cellular senescence is involved in several gastrointestinal diseases, such as inflammatory bowel disease (IBD) and colorectal carcinogenesis (PENFIELD et al., 2013; FREY et al., 2018) and even irritable bowel syndrome (IBS) (ZHANG et al., 2022).

When gastrointestinal cells experience pathological stress due to a strong and persistent inflammatory

response associated with a severely altered microbiota, continuous tissue repair processes can occur, eventually leading to the formation of senescent cells (RISQUES et al., 2011; SOHN et al., 2012). Fettucciari and collaborators (2018) demonstrated that TcdB at a concentration of 10 ng/mL, after 6 days of exposure, induces senescence in enteric glial cells that survive the action of the toxin, which predominantly induces death by apoptosis/necrosis. According to the authors, senescence induced by TcdB in enteric glia primarily triggers irreversible cell cycle arrest in G0/G1 and G2/M, mediated by the overexpression of p27 associated with the downregulation of cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) and cyclin B1, persistent DNA damage, downregulation of c-myc, and hypophosphorylation of phosphorylated retinoblastoma protein (pRb). Furthermore, sirtuins contribute to the maturation, maintenance and stabilization of the senescence state induced by TcdB, antagonizing the lethal effects of high levels of ROS through an antioxidant response and thus favoring the survival of senescent cells, which, consequently, present reduced functions (FETTUCCIARI et al., 2018).

C. difficile infection can also lead to several intestinal complications as possible sequelae, including irritable bowel syndrome (IBS), gastroesophageal reflux disease (GERD), functional diarrhea, dyspepsia, and constipation, with IBS and constipation being the most common complications (GUTIÉRREZ et al., 2015). Furthermore, symptoms such as abdominal pain, constipation, diarrhea, IBS, and dyspepsia can persist for up to two years after the infection resolves (BERLAM et al., 2018). These pathological changes may be directly related to cellular senescence, since according to Fettucciari and collaborators (2023), the pathological effects of cellular senescence related to persistent inflammation can contribute to the development of various intestinal inflammatory conditions, as well as immunosuppression and tumor induction. In our study, we confirmed that TcdB promotes senescence in enteric glial cells and that a low concentration of the toxin (1 ng/mL) after 3 days of incubation is sufficient to render the cells senescent. Blocking the CSPG4 receptor decreased the TcdB-induced senescence marker. We also demonstrated, for the first time, that TcdA also promotes an increase in SA β -Gal in enteric glia, but blocking CSPG4 was unable to reduce the level of this enzyme.

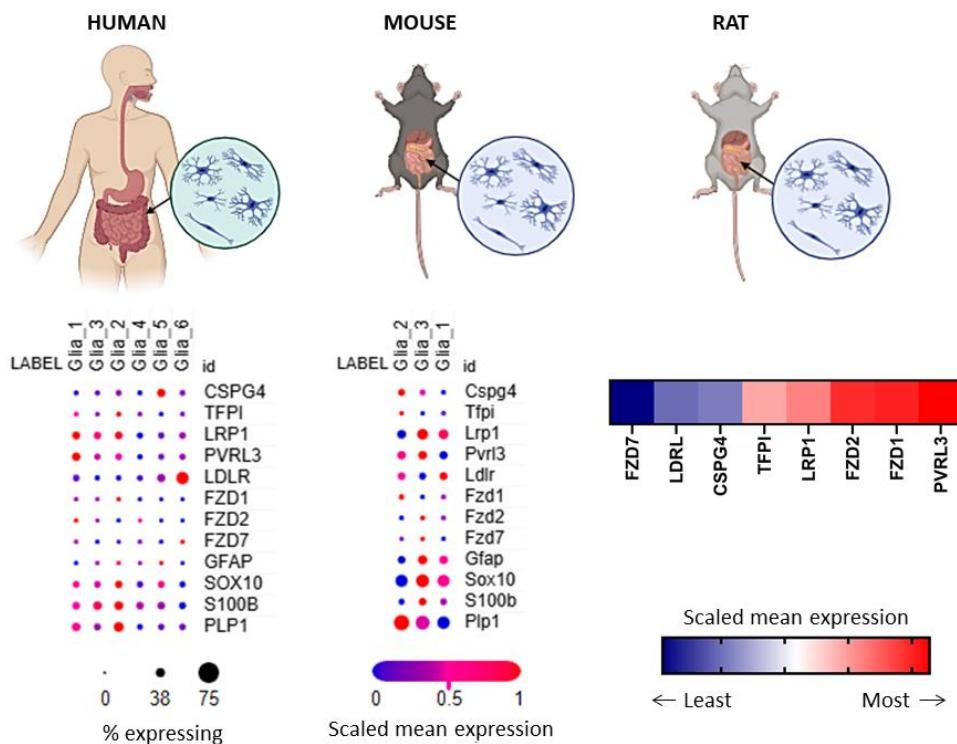
Given these findings, modulation studies with CSPG4 become extremely relevant, given its direct interaction with TcdB, which enables the damaging effects of this toxin on enteric glial cells. Our research was crucial in clarifying the role of CSPG4 in mediating the inflammatory response and

senescence triggered by *C. difficile* toxins A and B, as well as its significant role in the pathogenesis of CDI, marking it as a promising therapeutic target.

Furthermore, further investigation into the effects of CSPG4 receptor inhibition on CDI in vivo is needed to fully understand its activity and implications, both in the acute phase of the disease and post-infection, since patients infected with *C. difficile* experience significant sequelae.

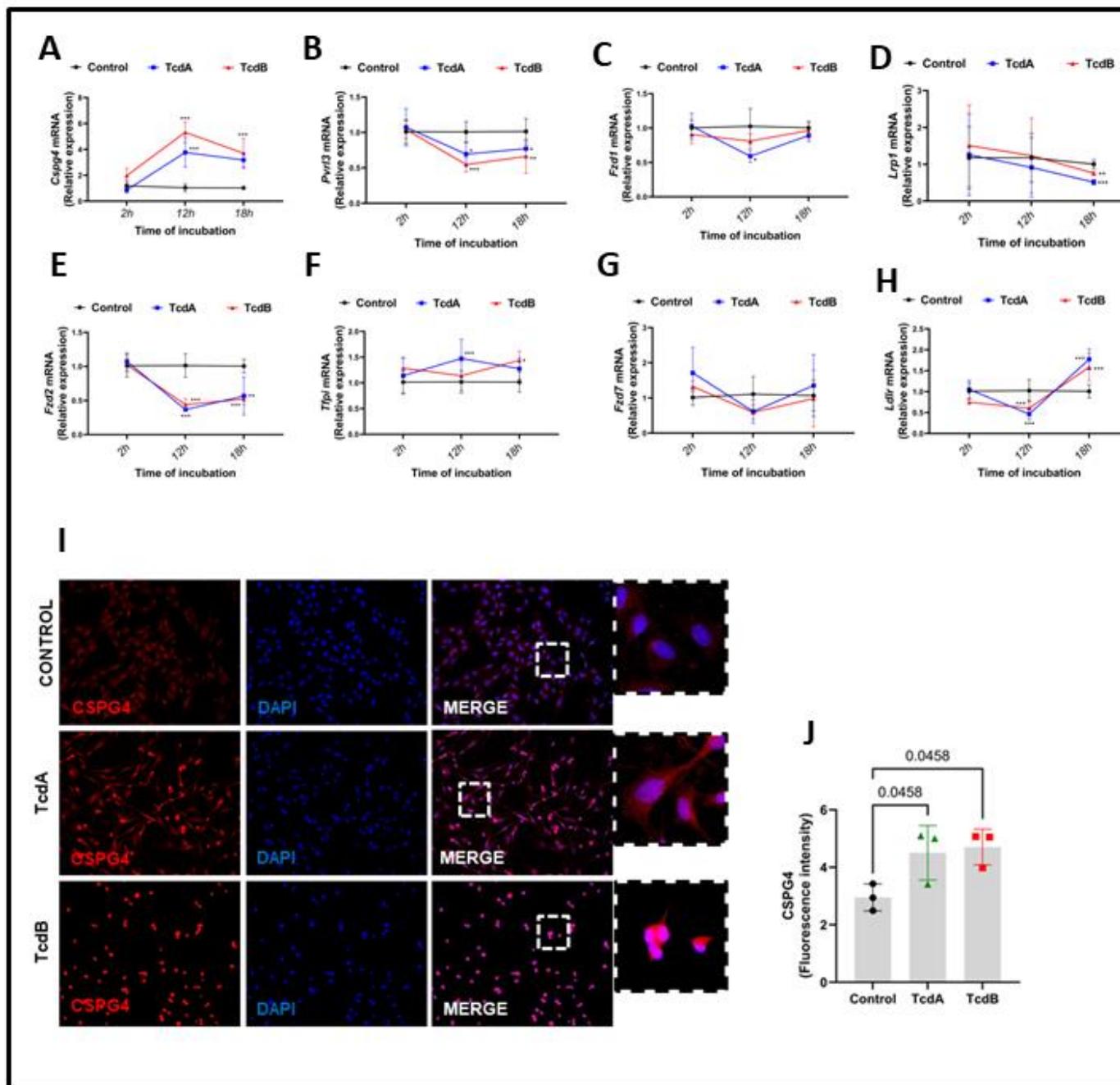
ANNEX 1

Figure 1. Human, mouse, and rat enteric glia express all the currently known *C. difficile* toxin receptors



(A) Gene expression of *C. difficile* toxin receptors: Cspg4, Tfp1, Lrp1, Pvrl3, Fzd1, Fzd3, Fzd7, and Ldrl in human and mouse enteric glia, obtained through the Single-Cell Portal. (B) Immunofluorescence showing CSPG4 labeling (red) in the myenteric plexus (green) of the human colon, where enteric glia cells are located. (C) Immunofluorescence showing CSPG4 labeling (red) in the myenteric plexus (green) of the mouse colon. (D) Immunofluorescence showing CSPG4 labeling (red) in cultured enteric glial cell line (EGC/PK060399).

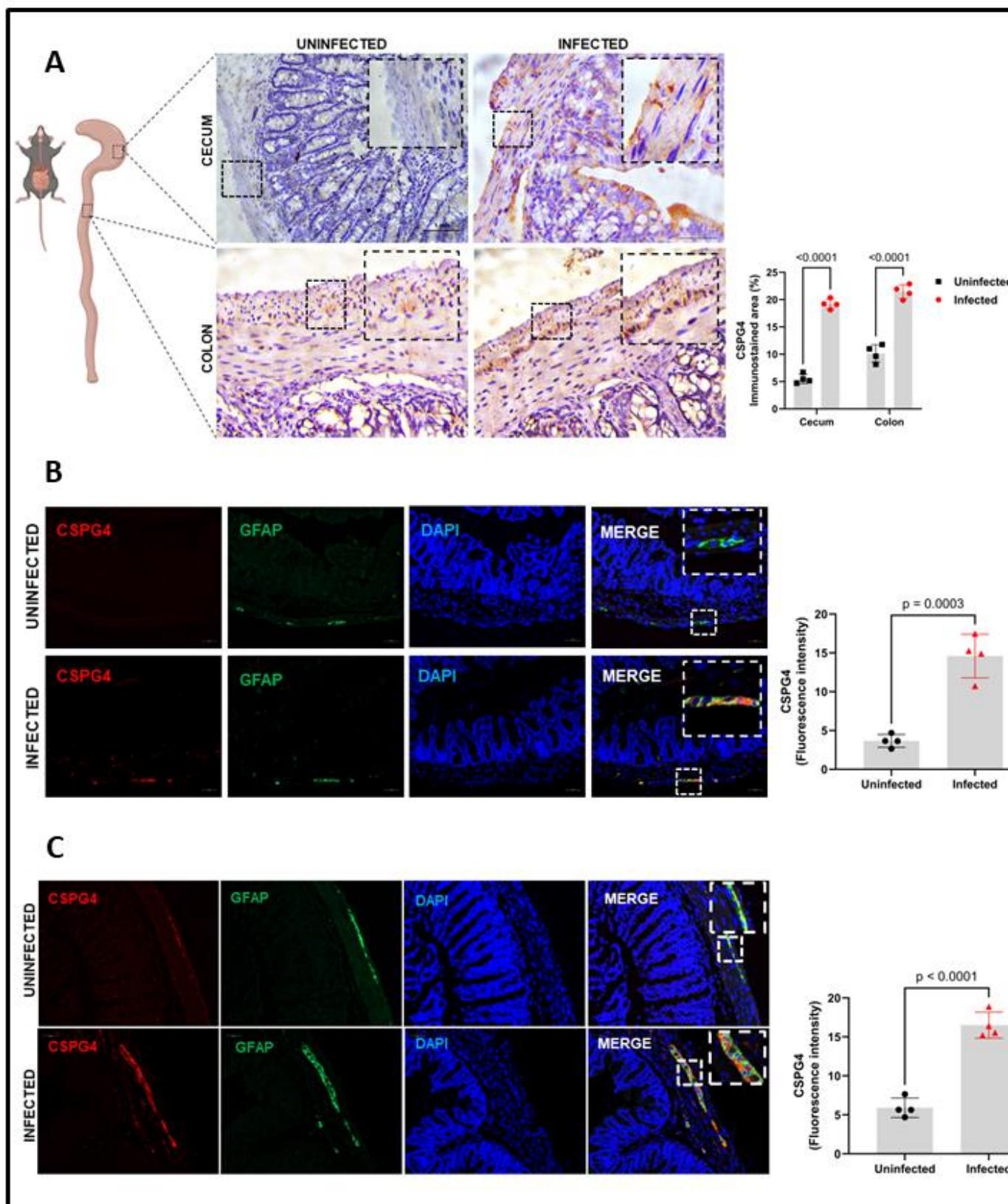
Figure 2. *C. difficile* receptors gene expression changes with different incubation times with TcdA and TcdB in enteric glia



Gene expression of *C. difficile* toxin receptors: Cspg4, Tfpi, Lrp1, Pvrl3, Fzd1, Fzd3, Fzd7, and Ldlr in enteric glial cell lines (EGC/PK060399) cultured in vitro, unchallenged (cells incubated with medium only) and toxin-challenged with TcdA (50ng/mL) and TcdB (1ng/mL) for 2h, 12h and 18h. (A) Cspg4. (B) Pvrl3. (C) Fzd1. (D) Lrp1. (E) Fzd2. (F) Tfpi. (G) Fzd7. (H) Ldlr. Gapdh was used as a control. (I) TcdA (50 ng/mL) and TcdB (1 ng/mL) induced an increase in CSPG4 protein expression in enteric glial

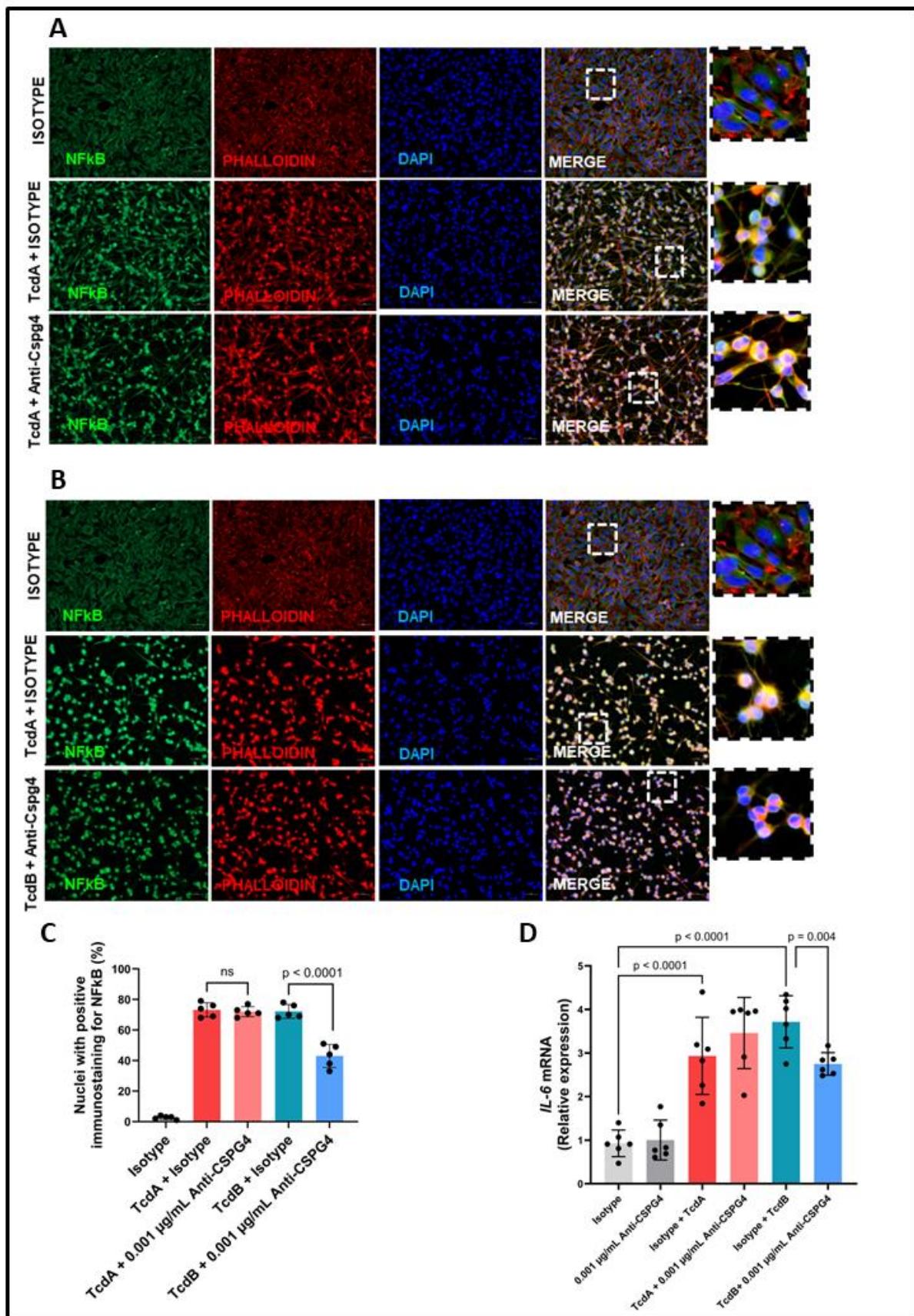
cells (EGC/PK060399) after 18 hours of incubation. Qualitative analysis of CSPG4 immunostaining (red) in cultured enteric glial cells, with DAPI (blue) used for nuclear staining. (J) Quantification of the mean fluorescence intensity of CSPG4 staining, measured using Zeiss software. Merged images (MERGE) are shown in the right panels. Scale bar: 50 μ m. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. * p <0.05, ** p <0.001 and *** p <0.0001.

Figure 3. *Clostridioides difficile* infection increases CSPG4 immunostaining in the myenteric plexus of mice cecum and colon



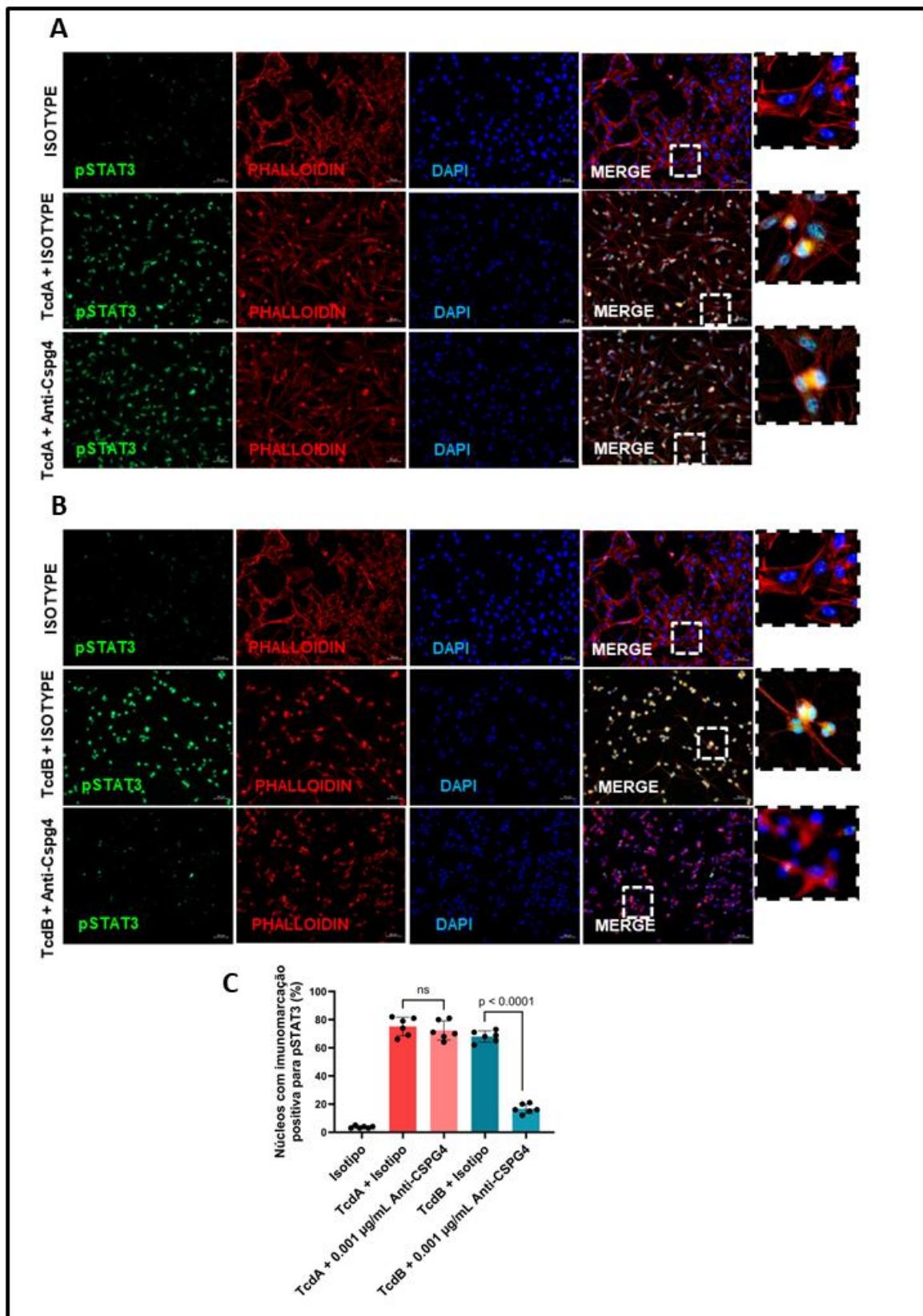
CSPG4 immunostaining was assessed by immunohistochemistry and immunofluorescence in the myenteric plexus of the cecum and colon of mice infected with *C. difficile*. (A) Immunohistochemistry with CSPG4 staining in the cecum and colon of uninfected and *C. difficile*-infected mice. The Infection promotes an increase in CSPG4 immunostaining (brown) in the myenteric plexus (indicated by the checkered area), both in the cecum and colon of the mice. The images were obtained at a scale of 50 μ m (B). Immunofluorescence of the cecum of uninfected and *C. difficile*-infected mice showed increased CSPG4 labeling (red) in the myenteric plexus (green). (C) Immunofluorescence of the colon of uninfected and *C. difficile*-infected mice showed increased CSPG4 labeling (red) in the myenteric plexus (green). For statistical analysis, a one-way ANOVA test was followed by the Tukey test.

Figure 4. CSPG4 blockade promotes decreased TcdB-induced NF κ B nuclear translocation and decreased *IL-6* gene expression



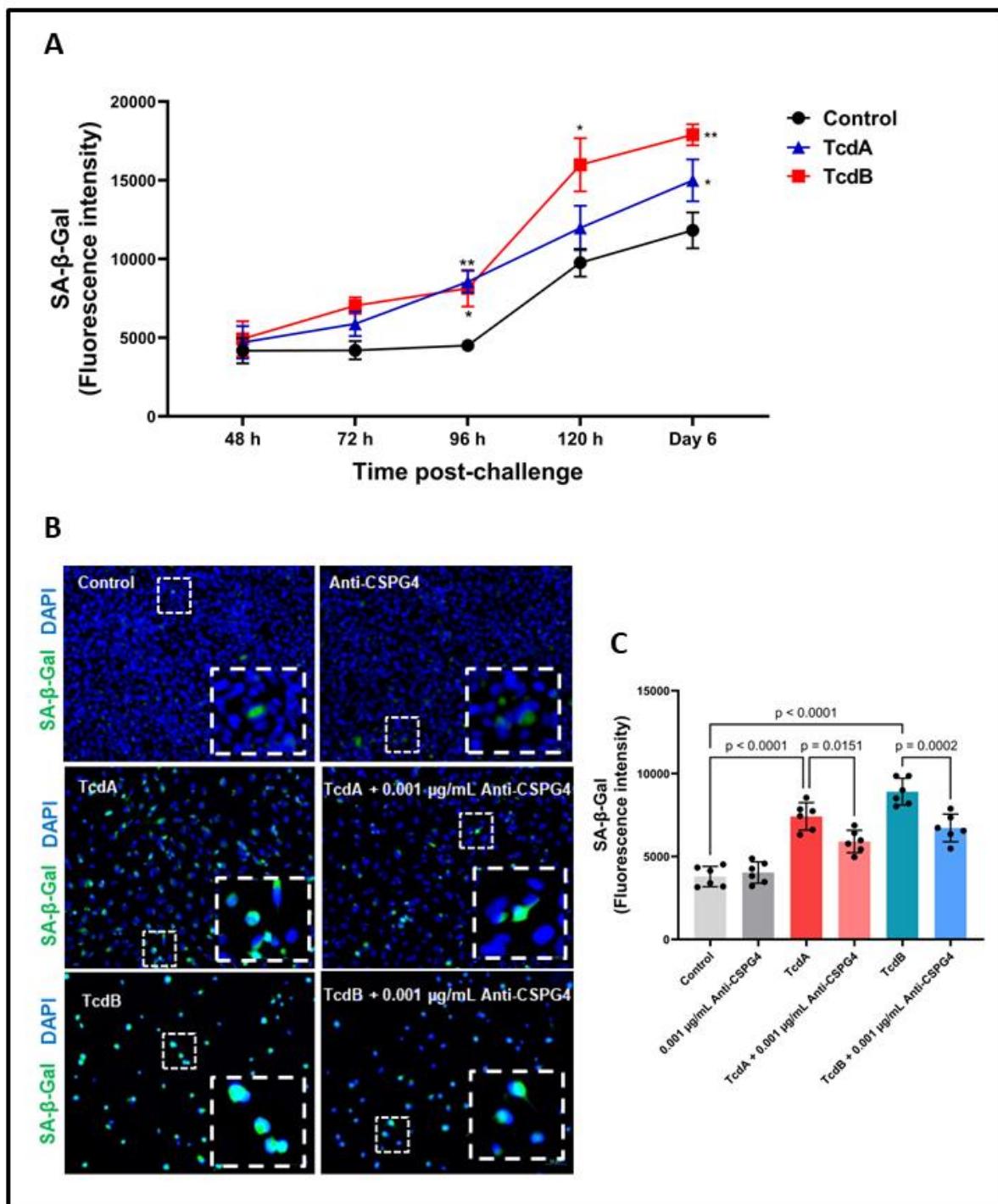
CSPG4 blockade partially prevents NF κ B activation induced by *C. difficile* TcdB, but not by TcdA, in enteric glia. (A) Immunofluorescence for NF κ B (green) in enteric glial cell (EGC/PK060399) in three different groups: isotype, used as control; TcdA + isotype group, incubated with 50ng/mL of toxin A; and TcdA + Anti-CSPG4 group, incubated with 50ng/mL of toxin and 0.001 μ g/mL of Anti-CSPG4. We can observe that TcdA promotes the nuclear translocation of NF κ B, and that blocking the CSPG4 receptor is unable to prevent the translocation of this transcription factor to the nucleus. The cytoplasm is stained with phalloidin (red), and the nucleus is stained with DAPI (blue). The MERGE represents the overlay of the images. (B) Immunofluorescence for NF κ B (green) in enteric glial cell (EGC/PK060399) in three different groups: isotype, used as control; TcdB + isotype group, incubated with 1ng/mL of toxin A; and TcdB + Anti-CSPG4 group, incubated with 1ng/mL of toxin and 0.001 μ g/mL of Anti-CSPG4. We can observe that TcdB promotes the nuclear translocation of NF κ B and that blocking the CSPG4 receptor can partially prevent the translocation of this transcription factor to the nucleus. The cytoplasm is stained with phalloidin (red), and the nucleus is stained with DAPI (blue). The MERGE represents the overlay of the images. (C) IL-6 gene expression assessed by qPCR in enteric glia cell (EGC/PK060399) incubated with TcdA (50 ng/mL) and TcdB (1 ng/mL) for 18h, in the presence or absence of 0.001 μ g/mL Anti-CSPG4. Gapdh was used as a control. We can see that Anti-CSPG4 decreases IL-6 gene expression promoted by TcdB. For statistical analysis, a one-way ANOVA test was followed by the Tukey test.

Figure 5. CSPG4 blockade reduces TcdB-induced pSTAT3 nuclear translocation in enteric glial cells



CSPG4 blockade significantly prevents *C. difficile* TcdB-induced, but not TcdA-induced, pSTAT3 activation in enteric glia. (A) Immunofluorescence for pSTAT3 (green) in enteric glia cell (EGC/PK060399) in three different groups: isotype, used as control; TcdA + isotype group, incubated with 50 ng/mL toxin A; and TcdA + Anti-CSPG4 group, incubated with 50 ng/mL toxin and 0.001 µg/mL Anti-CSPG4. We can observe that TcdA promotes nuclear translocation of pSTAT3 and that CSPG4 receptor blockade is not able to prevent the translocation of this transcription factor to the nucleus. The cytoplasm is stained with phalloidin (red), and the nucleus is stained with DAPI (blue). MERGE represents the overlay of the images. (B) Immunofluorescence for pSTAT3 (green) enteric glia cell (EGC/PK060399) in three different groups: isotype, used as control; TcdB + isotype group, incubated with 1 ng/mL of toxin A; and TcdB + Anti-CSPG4 group, incubated with 1 ng/mL of toxin and 0.001 µg/mL of Anti-CSPG4. We can observe that TcdB promotes the nuclear translocation of pSTAT3 and that blocking the CSPG4 receptor can considerably prevent the translocation of this transcription factor to the nucleus. The cytoplasm is stained with phalloidin (red), and the nucleus is stained with DAPI (blue). The MERGE represents the overlay of the images. For statistical analysis, one-way ANOVA followed by Tukey's test was used.

Figure 6. TcdA and TcdB promote an increase in the senescence marker β -galactosidase (SA- β -Gal) in enteric glial cells, and CSPG4 modulation reduces its immunoreactivity.



Senescence study using the β -galactosidase (SA- β -Gal) marker in enteric glia challenged by TcdA and TcdB of *C. difficile*. (A) Representation of the quantification of the mean fluorescence intensity of SA- β -Gal immunostaining, measured using the ImageJ program, at different times (48h, 72h, 96h, 120h, and 6 days) after incubation with TcdA (50ng/mL) and TcdB (1ng/mL) for 18h in enteric glia

cultured in vitro. (B) Represents the qualitative analysis of SA- β -Gal immunostaining (green) in enteric glia 96h after incubation with TcdA (50ng/mL) and TcdB (1ng/mL) for 18h. The figure also shows the treatment of cells with Anti-CSPG4 at a concentration of 0.001 μ g/mL; DAPI (blue) was used for nuclear staining. (C) Representation of the quantification of the mean fluorescence intensity of SA- β -Gal immunostaining, measured by the ImageJ program, 96h after incubation with TcdA (50ng/mL) and TcdB (1ng/mL) for 18h in enteric glia. We can observe that the modulation of CSPG4 (0.001 μ g/mL Anti-CSPG4) decreases the senescence caused by both toxins. For statistical analysis, one-way ANOVA followed by Tukey's test was used. **p<0.001 and ***p<0.0001.

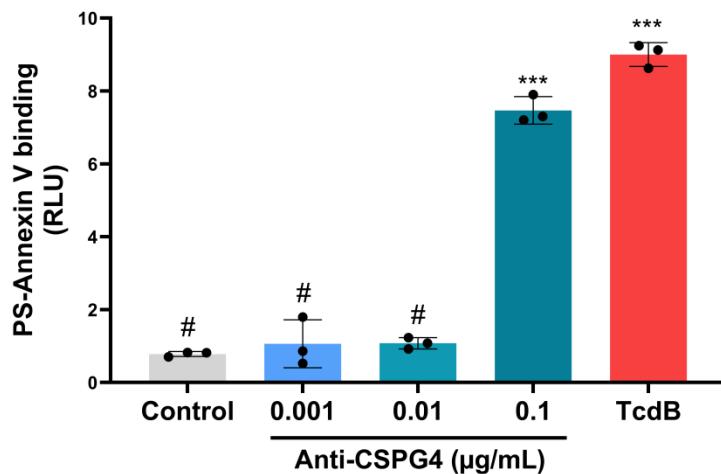
ANNEX 2 – ADDITIONAL FILES

Table S1: Primers used in the qPCR

| | |
|--------------|--------------------------|
| <i>CSPG4</i> | |
| Forward | CAGCAATGGACGGATAGCCT |
| Reverse | GTACGCCATCAGAGAGGTCG |
| <i>Lrp1</i> | |
| Forward | GGAATGAGCTTCACCCAAGC |
| Reverse | CAATGTGGCGTCCGAGAAGT |
| <i>Pvrl3</i> | |
| Forward | TGGCGTCAGACAATACTCTTCATT |
| Reverse | TGGTGGTAGTGGGAGGGATCT |
| <i>Ldlr</i> | |
| Forward | CACATGGACCCTCACACCAG |
| Reverse | CGGTCCAGGGTCATCTTACG |
| <i>Tfpi</i> | |
| Forward | AGAAAGACCACGCCTCTGG |
| Reverse | CCTCGGGCAGAGCATTAAGA |
| <i>Fzd1</i> | |
| Forward | CTGAGGAGTTGCGCTTTCG |
| Reverse | GTACGTGAGCACC GTGAAGA |
| <i>Fzd2</i> | |
| Forward | TTTCTGGGTGAGCGCGATT |
| Reverse | GGATCCAGAGACGGGCAAAA |
| <i>Fzd7</i> | |
| Forward | CCATGAGCCCCGACTTTACA |
| Reverse | TAGAAGCGACGCCATGACTG |
| <i>GAPDH</i> | |
| Forward | AGACAGCCGCA TCTTCTTGT |
| Reverse | CTTGCCGTGGGT AGAGTCA T |
| <i>IL-6</i> | |

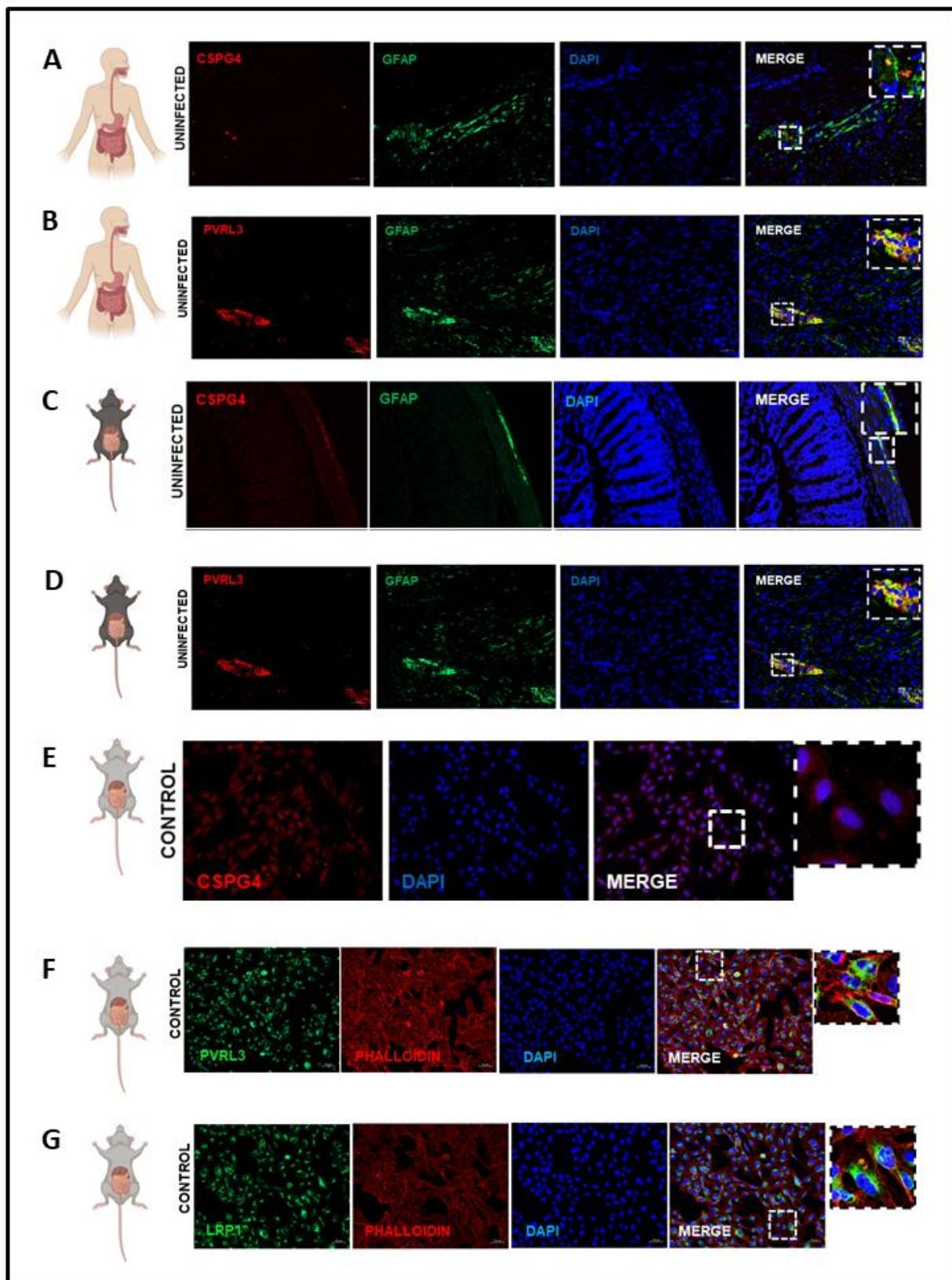
| | |
|--------------|---------------------------|
| Forward | GCCAGAGTCA TTCAGAGCAA T A |
| Reverse | GTTGGA TGGTCTTGGTCCTT AG |
| <i>BCL-2</i> | |
| Forward | CAGCA TGCGACCTCTGTTG |
| Reverse | CAGGT A TGCACCCAGAGTGA |
| <i>S100B</i> | |
| Forward | TTCAGGGAGAGAGGGTGACAA |
| Reverse | CTTCCTGCTCTTGA TTCCCTCC |

Figure S1. Evaluation of cell death of enteric glial cells incubated with different concentrations of Anti-CSPG4



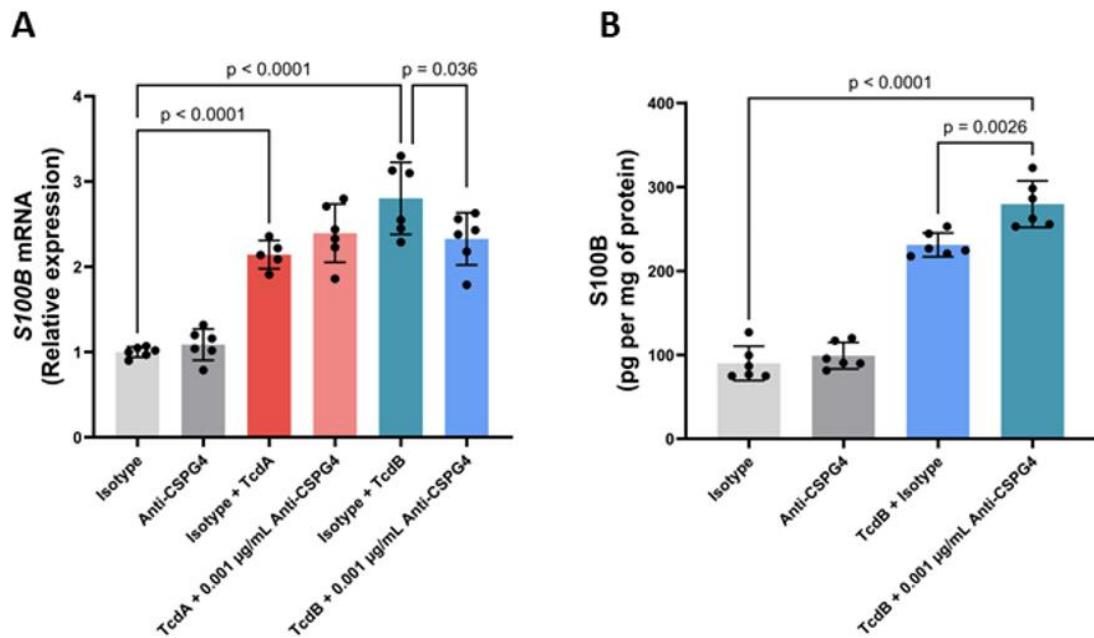
Enteric glial cells were pretreated for 1 hour with anti-CSPG4 antibody (0.001, 0.01, or 0.1 µg/mL) before exposure to TcdA (50 ng/mL) or TcdB (1 ng/mL) for 18 hours. Control cells were incubated with culture medium alone. TcdB was used as a positive control for cell death. Relative luminescence unit (RLU). For statistical analysis, one-way ANOVA followed by Tukey's test was used. ***p<0.0001 compared to control group and #p<0.0001 versus TcdB group.

Figure S2. Expression of CSPG4 and Nectin 3 (PVLR3) in the colon of humans, mice, and enteric glial cell lines, and expression of the LRP1 receptor in the cells



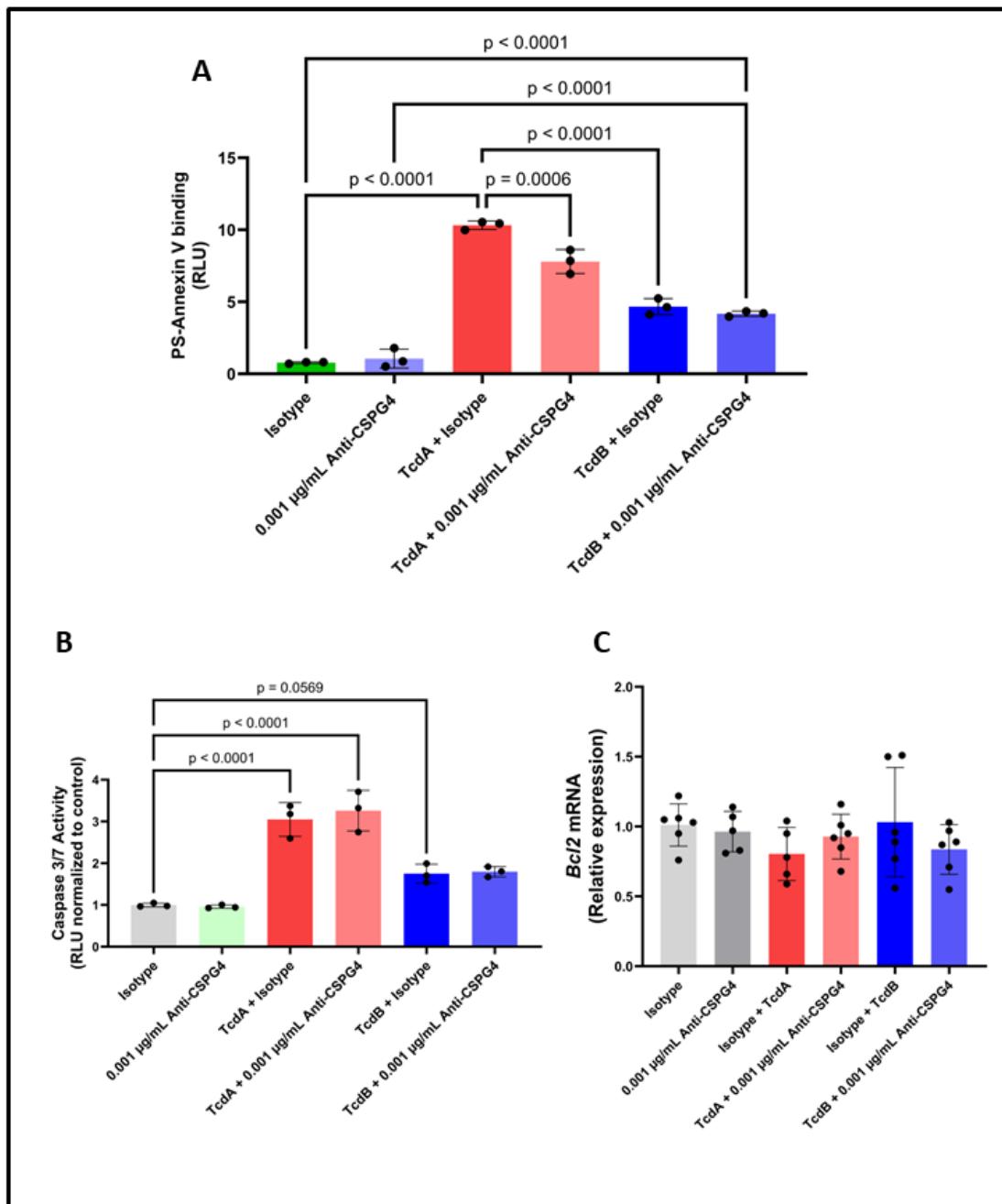
Immunofluorescence showing CSPG4 (red) labeling in the myenteric plexus (green) of human colon, where enteric glial cells are located. (B) Immunofluorescence to PVRL3 (red) labeling in the myenteric plexus (green) of human colon. (C) Immunofluorescence to CSPG4 (red) labeling in the myenteric plexus (green) of mouse colon. (D) Immunofluorescence to PVRL3 (red) labeling in the myenteric plexus (green) of mouse colon. (E) Immunofluorescence to CSPG4 (red) labeling in a cultured enteric glial cell line (EGC/PK060399). (F) Immunofluorescence to PVRL3 (red) labeling in a cultured enteric glial cell line (EGC/PK060399). (G) Immunofluorescence to LRP1 (red) labeling in cultured enteric glial cell line (EGC/PK060399).

Figure S3. CSPG4 blockade promotes decreased S100B gene expression but increased protein expression in enteric glial cells challenged with TcdB



Effect of CSPG4 Receptor Blockade on Enteric Glia Challenged with TcdA and TcdB (A) S100B gene expression assessed by qPCR in enteric glial cells (EGC/PK060399) incubated with TcdA (50 ng/mL) and TcdB (1 ng/mL) for 18 h, in the presence or absence of 0.001 µg/mL anti-CSPG4. Gapdh was used as a control. (B) S100B levels (mean ± s.e.m) released by ELISA and expressed in pg per mg protein. For statistical analysis, a one-way ANOVA test was followed by the Tukey test.

Figure S4. CSPG4 blockade does not reduce cell death induced by TcdB, but attenuates TcdA-induced cell death.



(A) Cell death analyzed by RealTime-Glo annexin V apoptosis assay in enteric glia cell (EGC/PK060399) challenged with TcdA and TcdB for 18 h in the presence or absence of 0.001 µg/mL Anti-CSPG4. (B) The activity of Caspase 3/7 analyzed by luminescence assay (mean ± s.e.m, n=6) in enteric glia cell (EGC/PK060399) challenged with TcdA (50 ng/mL) and TcdB (1 ng/mL) for 18 h. (C) Bcl2 gene expression assessed by qPCR in enteric glia cell (EGC/PK060399) incubated with TcdA (50 ng/mL) and TcdB (1 ng/mL) for 18 h, in the presence or absence of 0.001 µg/mL Anti-CSPG4.

Gapdh was used as a control. For statistical analysis, one-way ANOVA followed by Tukey's test was used.

REFERENCES

- ABHYANKAR, Mayuresh M. et al. Immune profiling to predict outcome of *Clostridioides difficile* infection. **MBio**, v. 11, n. 3, p. 10.1128/mbio. 00905-20, 2020.
- AKTORIES, K. et al. Bacterial toxins that target Rho proteins. **The Journal of clinical investigation**, v. 99, n. 5, p. 827-829, 1997.
- ALAM, Md Zahidul; MADAN, Rajat. *Clostridioides difficile* toxins: host cell interactions and their role in disease pathogenesis. **Toxins**, v. 16, n. 6, p. 241, 2024.
- BARLAM, Tamar F. et al. Retrospective analysis of long-term gastrointestinal symptoms after *Clostridium difficile* infection in a nonelderly cohort. **Plos one**, v. 13, n. 12, p. e0209152, 2018.
- BASSOTTI, G. et al. The cytotoxic synergy between *Clostridioides difficile* toxin B and proinflammatory cytokines: an unholy alliance favoring the onset of *Clostridioides difficile* infection and relapses. **Microbiology**, v. 9, p. e1061, 2020.
- BASU, Anandita et al. STAT3 and NF-κB are common targets for kaempferol-mediated attenuation of COX-2 expression in IL-6-induced macrophages and carrageenan-induced mouse paw edema. **Biochemistry and biophysics reports**, v. 12, p. 54-61, 2017.
- CHEN, Peng et al. Structural basis for CSPG4 as a receptor for TcdB and a therapeutic target in *Clostridioides difficile* infection. **Nature communications**, v. 12, n. 1, p. 3748, 2021.
- CIRILLO, Claudia et al. Increased mucosal nitric oxide production in ulcerative colitis is mediated in part by the enteroglial-derived S100B protein. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 21, n. 11, p. 1209-e112, 2009.
- ČOPIČ, Alenka; DIEUDONNÉ, Thibaud; LENOIR, Guillaume. Phosphatidylserine transport in cell life and death. **Current opinion in cell biology**, v. 83, p. 102192, 2023.
- COSTA, Deiziane VS et al. Adenosine receptors differentially mediate enteric glial cell death induced by *Clostridioides difficile* Toxins A and B. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 956326, 2023.

COSTA, Deiziane VS et al. S100B inhibition attenuates intestinal damage and diarrhea severity during *Clostridioides difficile* infection by modulating inflammatory response. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 11, p. 739874, 2021.

COSTA, Deiziane VS et al. The role of the enteric nervous system in the pathogenesis of *Clostridioides difficile* infection. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, p. 1-17, 2025.

DEBACQ-CHAINIAUX, Florence et al. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- β gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. **Nature protocols**, v. 4, n. 12, p. 1798-1806, 2009.

DI LIDDO, R. et al. S100B as a new fecal biomarker of inflammatory bowel diseases. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 24, n. 1, p. 323-332, 2020.

DROKHLYANSKY, Eugene et al. The human and mouse enteric nervous system at single-cell resolution. **Cell**, v. 182, n. 6, p. 1606-1622. e23, 2020.

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

FETTUCCIARI, Katia et al. *Clostridioides difficile* toxin B alone and with pro-inflammatory cytokines induces apoptosis in enteric glial cells by activating three different signalling pathways mediated by caspases, calpains and cathepsin B. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 79, n. 8, p. 442, 2022.

FETTUCCIARI, Katia et al. *Clostridioides difficile* toxin B induced senescence: a new pathologic player for colorectal cancer?. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 9, p. 8155, 2023.

FETTUCCIARI, Katia et al. *Clostridium difficile* toxin B induces senescence in enteric glial cells: A potential new mechanism of Clostridium difficile pathogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1865, n. 12, p. 1945-1958, 2018.

FETTUCCIARI, Katia et al. Enteric glial cells are susceptible to *Clostridium difficile* toxin B. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, p. 1527-1551, 2017.

FOSCHETTI, D. A. et al. *Clostridium difficile* toxins or infection induce upregulation of adenosine receptors and IL-6 with early pro-inflammatory and late anti-inflammatory pattern. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 53, p. e9877, 2020.

FREY, Nina et al. Cellular senescence in gastrointestinal diseases: from pathogenesis to therapeutics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 15, n. 2, p. 81-95, 2018.

GRASSO, Francesca; FRISAN, Teresa. Bacterial genotoxins: merging the DNA damage response into infection biology. **Biomolecules**, v. 5, n. 3, p. 1762-1782, 2015.

GRIVENNIKOV, Sergei I.; KARIN, Michael. Dangerous liaisons: STAT3 and NF-κB collaboration and crosstalk in cancer. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 21, n. 1, p. 11-19, 2010.

GUO, Dong et al. Significance of Programmed Cell Death Pathways in Neurodegenerative Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 18, p. 9947, 2024.

GUO, Qing et al. NF-κB in biology and targeted therapy: new insights and translational implications. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 9, n. 1, p. 53, 2024.

GUTIÉRREZ, Ramiro L.; RIDDLE, Mark S.; PORTER, Chad K. Increased risk of functional gastrointestinal sequelae after Clostridium difficile infection among active duty United States military personnel (1998–2010). **Gastroenterology**, v. 149, n. 6, p. 1408-1414, 2015.

JORDAAN, Sandra et al. CSPG4: a target for selective delivery of human cytolytic fusion proteins and TRAIL. **Biomedicines**, v. 5, n. 3, p. 37, 2017.

KAUR, Sukhvir et al. A panoramic review of IL-6: Structure, pathophysiological roles and inhibitors. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 28, n. 5, p. 115327, 2020.

KHAN, Taukeer A. et al. β-Galactosidase-and Photo-Activatable Fluorescent Probes for Protein Labeling and Super-Resolution STED Microscopy in Living Cells. **Molecules**, v. 29, n. 15, p. 3596, 2024.

KINSOLVING, Julia et al. Structural and functional insight into the interaction of *Clostridioides difficile* toxin B and FZD7. **Cell Reports**, v. 43, n. 2, 2024.

LINAN-RICO, Andromeda et al. Mini-review: Enteric glial cell reactions to inflammation and potential therapeutic implications for GI diseases, motility disorders, and abdominal pain. **Neuroscience letters**, v. 812, p. 137395, 2023.

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

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- ΔΔCT method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LÓPEZ-GÓMEZ, Laura et al. Nutraceuticals and enteric glial cells. **Molecules**, v. 26, n. 12, p. 3762, 2021.

MACCHIONI, Lara et al. Enteric glial cells counteract *Clostridium difficile* Toxin B through a NADPH oxidase/ROS/JNK/caspase-3 axis, without involving mitochondrial pathways. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 45569, 2017.

MATTE, Isabelle et al. Antiapoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-XL inhibit *Clostridium difficile* toxin A-induced cell death in human epithelial cells. **Infection and immunity**, v. 77, n. 12, p. 5400-5410, 2009.

NEZHADI, Javad et al. *Clostridium difficile* as a potent trigger of colorectal carcinogenesis. **Discover Oncology**, v. 16, n. 1, p. 1-6, 2025.

PACÍFICO, Dvison de Melo et al. TRPV4 modulates inflammatory responses and apoptosis in enteric glial cells triggered by *Clostridioides difficile* toxins A and B. **Journal of Inflammation**, v. 22, n. 1, p. 3, 2025.

PENFIELD, Joshua D. et al. The role of cellular senescence in the gastrointestinal mucosa. **Gut and Liver**, v. 7, n. 3, p. 270, 2013.

POURLIOTOPOLOU, Evdokia; KARAMPATAKIS, Theodoros; KACHRIMANIDOU, Melania. Exploring the Toxin-Mediated Mechanisms in *Clostridioides difficile* Infection. **Microorganisms**, v. 12, n. 5, p. 1004, 2024.

QIAN, Shanna et al. The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy. **Frontiers in oncology**, v. 12, p. 985363, 2022.

QUTUB, Mohammad et al. Deciphering the Structural and Functional Paradigms of *Clostridioides difficile* Toxins TcdA and TcdB. **Bacteria**, v. 4, n. 2, p. 21, 2025.

RISQUES, Rosa Ana et al. Ulcerative colitis–associated colorectal cancer arises in a field of short telomeres, senescence, and inflammation. **Cancer research**, v. 71, n. 5, p. 1669-1679, 2011.

SAHOO, Gayatri et al. A review on caspases: key regulators of biological activities and apoptosis. **Molecular neurobiology**, v. 60, n. 10, p. 5805-5837, 2023.

SECHER, Thomas et al. *Escherichia coli* producing colibactin triggers premature and transmissible senescence in mammalian cells. **PLoS one**, v. 8, n. 10, p. e77157, 2013.

SHARKEY, Keith A.; MAWE, Gary M. The enteric nervous system. **Physiological reviews**, v. 103, n. 2, p. 1487-1564, 2023.

SOHN, Jane J. et al. Macrophages, nitric oxide and microRNAs are associated with DNA damage response pathway and senescence in inflammatory bowel disease. 2012.

STOIAN, Mircea et al. COVID-19 and *Clostridioides difficile* Coinfection Analysis in the Intensive Care Unit. **Antibiotics**, v. 13, n. 4, p. 367, 2024.

SVANDOVA, Eva et al. Exploring caspase functions in mouse models. **Apoptosis**, v. 29, n. 7, p. 938-966, 2024.

TAO, Liang et al. Sulfated glycosaminoglycans and low-density lipoprotein receptor contribute to *Clostridium difficile* toxin A entry into cells. **Nature microbiology**, v. 4, n. 10, p. 1760-1769, 2019.

VALIEVA, Yana et al. Senescence-associated β-galactosidase detection in pathology. **Diagnostics**, v. 12, n. 10, p. 2309, 2022.

YOON, S. et al. NF-κB and STAT3 cooperatively induce IL6 in starved cancer cells. **Oncogene**, v. 31, n. 29, p. 3467-3481, 2012.

ZHANG, Huantong et al. The role of cellular senescence in metabolic diseases and the potential for senotherapeutic interventions. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 11, p. 1276707, 2023.

ZHANG, Yuan et al. Telomere is shortened in patients with irritable bowel syndrome in the Chinese population. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 37, n. 9, p. 1749-1755, 2022.

ZHU, Jing; WU, Chongyun; YANG, Luodan. Cellular senescence in Alzheimer's disease: from physiology to pathology. **Translational Neurodegeneration**, v. 13, n. 1, p. 55, 2024.