



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

ANDRÉA VIANA LOUREIRO

**EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM PROPIONATO NA INFECÇÃO POR
Clostridioides difficile E NA RESPOSTA DA GLIA ENTÉRICA ÀS TOXINAS A E B**

FORTALEZA

2026



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

ANDRÉA VIANA LOUREIRO

**EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM PROPIONATO NA INFECÇÃO POR
Clostridioides difficile E NA RESPOSTA DA GLIA ENTÉRICA ÀS TOXINAS A E B**

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

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

Coorientadora: Dra. Deiziane Viana da Silva Costa.

FORTALEZA

2026

ANDRÉA VIANA LOUREIRO

**EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM PROPIONATO NA INFECÇÃO POR
Clostridioides difficile E NA RESPOSTA DA GLIA ENTÉRICA ÀS TOXINAS A E B**

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

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

Coorientadora: Dra. Deiziane Viana da Silva Costa.

APROVADA EM __/__/____

BANCA EXAMIANDORA

Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Conceição da Silva Martins Rebouças
Universidade Federal do Ceará – Campus Sobral

Prof. Dr. Antonio José de Jesus Evangelista
Universidade Christus

Profa. Dra. Julliete Raulino Alcântara
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará - IFCE

Dra. Deiziane Viana da Silva Costa
University of Virginia

À Deus,

Fonte inesgotável de compaixão e amor.
Que me sustenta e renova minhas forças
diante dos desafios de cada dia.

Aos meus pais,

Apoio incondicional em todas as fases da
minha vida. Honrá-los a cada conquista é
um dos desejos mais genuínos do meu
coração.

Ao meu esposo e à minha filha,

Razão da minha perseverança e do meu
amor sem medidas. A força motriz
necessária para vencer qualquer batalha.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito, por me receber em sua linha de pesquisa, pelo acolhimento em seu laboratório e por todas as oportunidades que me foram concedidas. Sua relevância para a pesquisa científica é reflexo de sua generosidade e humanidade. Ter sido sua orientanda ao longo dos últimos seis anos, entre o mestrado e o doutorado, foi um verdadeiro privilégio.

À Dra. Deiziane Viana da Silva Costa, minha coorientadora, pelo empenho, dedicação e paciência em todas as etapas deste trabalho. Por sempre se fazer presente, apesar da distância física, e por ser uma inspiração na pesquisa científica.

À Dra. Cirle Alcantara Warren, pelo acolhimento e pela oportunidade de realizar parte deste doutorado na *University of Virginia*, experiência que levarei comigo para toda a vida.

À Profa. Dra. Conceição da Silva Martins (Josy), por toda a sua dedicação ao laboratório, pela partilha de experiências, pela competência na condução dos experimentos e pela alegria contagiante. Sua amizade é um grande presente para mim.

A todos os amigos que fiz no laboratório NEMPI, com quem compartilhei incontáveis e agora nostálgicos “cafés científicos”. Em especial, às amigas Luana Gaudêncio, Letícia Terceiro, Arkila Pinheiro e Lucianny Lima, pela amizade, torcida mútua e parceria, que trouxeram leveza a esta jornada.

À minha banca de qualificação, composta pela Profa. Dra. Deysi Wong e pelo Prof. Dr. Fernando Oliveira, bem como à banca de defesa, composta pela Profa. Dra. Julliete Raulino, pelo Prof. Dr. Antonio Evangelista, pela Profa. Dra. Conceição Martins e pela Dra. Deiziane Costa, por aceitarem o convite e pelas valiosas contribuições para este trabalho.

À querida técnica Ludimila do laboratório NEMPI (PPGCMF), e à gentil secretária Lucélia (PPGCM), por todo o auxílio prestado ao longo desta pesquisa.

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

Por fim, a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta tese, o meu mais sincero e especial obrigada.

“Entrega o teu caminho ao Senhor,
confia nele, e o mais Ele fará.”

Salmos 37:5

EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM PROPIONATO NA INFECÇÃO POR *Clostridioides difficile* E NA RESPOSTA DA GLIA ENTÉRICA ÀS TOXINAS A E B

Disfunções do trato gastrointestinal (GI) após infecção por *Clostridioides difficile* (ICD) têm sido observadas em humanos e camundongos, potencialmente decorrentes de danos às células do sistema nervoso entérico (SNE). A glia entérica, parte do SNE, é vulnerável às toxinas de *C. difficile* (TcdA e TcdB), que causam morte celular e resposta inflamatória. É desconhecido se o propionato, um ácido graxo de cadeia curta (AGCC), pode prevenir a disfunção GI após ICD e modular as respostas da glia entérica às toxinas de *C. difficile*. Dessa forma, avaliou-se se o pré-tratamento com propionato previne a disfunção GI após ICD e modula as respostas da glia entérica (resposta pró-inflamatória e morte celular) às toxinas de *C. difficile*. Para o estudo in vivo, camundongos foram pré-tratados ou não com propionato (150 mM na água de beber) e infectados com *C. difficile*. Após infecção, os camundongos foram acompanhados diariamente para determinação do escore de gravidade da doença e a função GI foi avaliada no dia 14 após a infecção. *In vitro*, glia entérica de ratos foi incubada com TcdA (50 ng/mL) ou TcdB (1 ng/mL), isoladamente ou com propionato (10 mM), uma hora antes das toxinas. Após 2, 12 e/ou 18 horas de incubação com as toxinas, células foram coletadas para análise da expressão de transportadores/receptores de AGCC (*MCT1*, *MCT4*, *FFAR2* e *FFAR3* via qPCR), de marcadores pró-inflamatórios (S100B e IL-6 por qPCR e imunofluorescência, respectivamente), bem como da translocação nuclear de pSTAT3 (por imunofluorescência) e da morte celular. In vivo, camundongos infectados perderam peso e apresentaram diarreia grave, que se resolveu completamente até o 13º dia após a infecção, a qual foi acompanhada de retardo do trânsito do trato gastrointestinal total (TTGIT) no 14º dia. O pré-tratamento com propionato melhorou a sobrevivência, reduziu a perda de peso, a diarreia e o retardo no TTGIT. *In vitro*, evidenciou-se que a glia entérica expressa transportadores de AGCC (*MCT1* e *MCT4*) e receptores (*FFAR2* e *FFAR3*), que são alterados pela exposição às toxinas. TcdA ou TcdB promoveram a morte celular, aumentaram a atividade das caspases 3 e 7, reduziram a expressão de Bcl2 (proteína e transcritos), aumentaram os níveis dos mediadores pró-inflamatórios S100B e IL-6 na glia entérica, bem como promoveram a translocação nuclear de pSTAT3. Enquanto a suplementação com propionato elevou os níveis de Bcl2, não preveniu a morte celular, diminuiu a expressão proteica de IL-6 e os transcritos de S100B, e reduziu a translocação nuclear de pSTAT3 em células da glia entérica desafiadas por TcdA ou TcdB. De forma geral, o pré-tratamento com propionato é eficaz para prevenir disfunção do trato gastrointestinal após ICD, além de melhorar a sobrevivência e reduzir a gravidade da doença. Além disso, a suplementação com propionato modula a resposta pró-inflamatória (reduzindo a expressão de IL-6/STAT3 e a regulação positiva de S100B) induzida por TcdA ou TcdB na glia entérica. Esses achados oferecem novas perspectivas sobre como produtos derivados da microbiota podem influenciar a função gastrointestinal após a infecção e a resposta da glia entérica às toxinas de *C. difficile*.

Palavras-chave: *Clostridioides difficile*, Propionato, Glia entérica, Infecção por *Clostridioides difficile*.

EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM PROPIONATO NA INFECÇÃO POR *Clostridioides difficile* E NA RESPOSTA DA GLIA ENTÉRICA ÀS TOXINAS A E B

Gastrointestinal (GI) dysfunction following *Clostridioides difficile* infection (CDI) has been reported in mouse and human. Enteric glia, part of the enteric nervous system, contribute to GI motility and are vulnerable to *C. difficile* toxins, which cause cell death and trigger an inflammatory response. Little is known about the effect of propionate, a short-chain fatty acid (SCFA). Therefore, this study aimed to evaluate whether pre-treatment with propionate prevents GI dysfunction after CDI and modulates enteric glia responses (cell death and pro-inflammatory responses) to *C. difficile* toxins. Regarding the in vivo study, 8-week-old mice were pre-treated with propionate (150 mM in drinking water) or not, and then infected with *C. difficile*. After infection, mice were monitored daily to assess disease severity. On day 14 post-infection, GI function was assessed using the Evans blue method. In vitro, rat enteric glia were incubated with TcdA (50 ng/mL) or TcdB (1 ng/mL), alone or with propionate (10 mM), one hour before toxin. After 2, 12, and/or 18 hours of incubation with the toxins, cells were collected for analysis of SCFA transporter/receptor expression (*MCT1*, *MCT4*, *FFAR2*, and *FFAR3* via qPCR), pro-inflammatory markers (*S100B* and IL-6 via qPCR and immunofluorescence, respectively), as well as nuclear translocation of pSTAT3 (by immunofluorescence) and cell death. In vivo, infected mice lost weight and developed severe diarrhea, which was completely resolved by day 13 post-infection, accompanied by delayed total gastrointestinal transit (TTGIT) on day 14. On the other hand, pre-treatment with propionate improved survival, reduced weight loss, prevented diarrhea, and decreased delay in TTGIT. In vitro, enteric glial cells express SCFA transporters (*MCT1* and *MCT4*) and receptors (*FFAR2* and *FFAR3*), which were altered by exposure to *C. difficile* toxins. TcdA or TcdB promoted cell death, increased caspase 3/7 activity, reduced Bcl2 expression (protein and transcripts), increased levels of pro-inflammatory mediators *S100B* (transcripts) and IL-6 (protein) in enteric glia, and promoted nuclear translocation of pSTAT3. Whereas propionate supplementation elevated Bcl2 levels, it did not prevent cell death, but decreased IL-6 protein expression, *S100B* transcripts, and reduced nuclear translocation of pSTAT3 challenged with TcdA or TcdB. Overall, pre-treatment with propionate is effective in preventing gastrointestinal dysfunction after CDI, improving survival, and reducing disease severity in the acute phase. Additionally, propionate supplementation modulates the pro-inflammatory response (reducing IL-6/STAT3 expression and the positive regulation of *S100B*) induced by TcdA or TcdB in enteric glia. These findings offer new insights into how microbiota-derived products can influence gastrointestinal system function after infection and the enteric glial response to *C. difficile* toxins.

Keywords: *Clostridioides difficile*, Propionate, Enteric glia, *Clostridioides difficile* infection.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	- Sistema de escore de gravidade da ICD.....	19
----------	--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Primers utilizados no qPCR em células gliais entéricas de ratos.....	20
----------	--	----

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- <i>Clostridioides difficile</i>	01
Figura 2	- Estrutura primária e mecanismo de ação de TcdA e TcdB.....	03
Figura 3	- Representação das camadas intestinais e localização das células gliais entéricas.....	05
Figura 4	- Metabolismo e síntese de AGCCs.....	08
Figura 5	- Fibras dietéticas e metabolismo de AGCCs.....	09
Figura 6	- Esquema de indução do modelo de ICD e protocolo experimental.....	16
Figura 7	- Avaliação do pH no meio de cultura DMEM após adição de propionato em diferentes concentrações.....	18
Figura 8	- Pré-tratamento com propionato reduz a gravidade da ICD em camundongos	25
Figura 9	- Pré-tratamento com propionato reduz o atraso no trânsito do trato gastrointestinal em camundongos infectados por <i>C. difficile</i>	26
Figura 10	- Células gliais entéricas expressam transportadores e receptores para AGCCs.....	27
Figura 11	- Exposição às toxinas de <i>Clostridioides difficile</i> altera a expressão de transportadores e receptores de AGCCs em células gliais entéricas.....	29
Figura 12	- Efeito do propionato na viabilidade de células gliais entéricas <i>in vitro</i>	30
Figura 13	- Propionato reduz os níveis proteicos de <i>IL-6</i> em células gliais entéricas desafiadas por TcdA.....	31
Figura 14	- Propionato reduz a translocação nuclear de STAT3 em células gliais entéricas desafiadas por TcdA ou TcdB.....	32
Figura 15	- Propionato reduz a expressão gênica de S100B em células gliais entéricas desafiadas por TcdA ou TcdB.....	33
Figura 16	- Efeito do propionato na ligação fosfatidilserina-anexina V e atividade da caspase 3/7 induzidas por toxinas de <i>C. difficile</i> em células gliais entéricas....	34
Figura 17	- Efeito do propionato na atividade de Bcl2 em células gliais entéricas desafiadas por TcdA e TcdB.....	36
Figura 18	- Sumário dos achados desse estudo.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus centígrados
μL	Microlitro
μg	Micrograma
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
AGCCs	Ácidos Graxos de Cadeia curta
AMPK	Quinase ativada por AMP
ANOVA	Análise de variância
CCP	Caldo de carne picado
CO ²	Dióxido de carbono
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridioides difficile</i>
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CDT	Toxina binária do <i>Clostridioides difficile</i>
CoA	Coenzima A
CROPS	do inglês —combined repetitive oligopeptides (oligopeptídeos repetitivos combinados)
CSPG4	do inglês — chondroitin sulfate proteoglycan 4 (proteoglicano sulfato de condroitina-4)
CSF1	Fator estimulante de colônias de macrófagos
DAP	Domínio autoproteolítico
DGT	Domínio glicosiltransferase
DII	Doença Inflamatória Intestinal
DLR	Domínio de ligação ao receptor
DMSO	Dimetilsulfóxido
DT	Domínio de translocação
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase	Desoxirribonuclease
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico

ELISA	Ensaio imunoenzimático
EPM	Erro padrão da média
FFAR2	Receptor de ácidos graxos livres 2
FFAR3	Receptor de ácidos graxos livres 3
<i>et al</i>	E colaboradores
FZDs	Receptores da família Frizzled
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GEAP	Glia entérica associada ao estresse psicológico
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
GPR41	Receptor acoplado à proteína G 41
GPR43	Receptor acoplado à proteína G 43
HDAC	Histona desacetilase
GTPase	Guanosina trifosfatase
ICD	Infecção por <i>Clostridioides difficile</i>
IL-1 β	Interleucina -1 β
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-17	Interleucina-17
ILC3s	Células linfoides inatas do grupo 3
i.p.	Intraperitoneal
InsP6	Inositol-hexaquisfosfato
KDa	KiloDalton
Kg	Kilograma
MCM	Metilmalonil coenzima A mutase
MCT1	Transportador de monocarboxilato 1
MCT4	Transportador de monocarboxilato 4
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
mg	Miligrama
Min	Minuto
mL	Mililitro
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio

N	Número
P2X7	Receptor purinérgico P2X7
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia de polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
qPCR	Reação em cadeia de polimerase em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RPM	Rotações por minuto
S100 β	Fração beta da proteína S100
SNE	Sistema nervoso entérico
TcdA	Toxina A do <i>Clostridioides difficile</i>
tcdA	Gene que codifica o RNA _m da Toxina A do <i>Clostridioides difficile</i>
TcdB	Toxina B do <i>Clostridioides difficile</i>
tcdB	Gene que codifica o RNA _m da Toxina B do <i>Clostridioides difficile</i>
TFPI	Inibidor da via do fator tecidual
TGI	Trato gastrointestinal
TMF	Transplantes de microbiota fecal
TNF	Fator de necrose tumoral
TTGIT	Trânsito do trato gastrointestinal total
UDP	Uridina Difosfato
UFC	Unidades formadoras de colônias
ULR	Unidade de luminescência relativa
V	Volume
VIP	Poli-peptídeo intestinal vasoativo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	01
1.1	<i>Clostridioides difficile</i>	01
1.2	Toxina A e Toxina B do <i>C. difficile</i>	02
1.3	Células gliais entéricas.....	04
1.4	Efeitos das toxinas de <i>C. difficile</i> em células gliais entéricas.....	06
1.5	Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCCs) e a importância em condições fisiológicas.....	07
2	JUSTIFICATIVA.....	11
3	OBJETIVOS.....	13
3.1	Objetivo geral.....	13
3.2	Objetivos específicos.....	13
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
4.1	Fármacos, reagentes, materiais e soluções utilizados no estudo.....	14
4.2	Experimentos <i>in vivo</i>	14
4.2.1	Aspectos éticos em pesquisa animal.....	14
4.2.2	Animais.....	14
4.2.3	Preparação da bactéria.....	14
4.2.4	Modelo de Infecção por <i>C. difficile</i> e pré-tratamento com propionato.....	15
4.2.5	Grupos experimentais para o modelo de infecção.....	16
4.3	Experimentos <i>in vitro</i>	17
4.3.1	Cultura de células gliais entéricas.....	17
4.3.2	Administração de toxinas e propionato em células gliais entéricas.....	17
4.4	Parâmetros avaliados no estudo <i>in vivo</i>	18
4.4.2	Determinação do escore de gravidade da doença.....	18
4.4.3	Avaliação do trânsito do trato gastrointestinal total.....	19
4.5	Parâmetros avaliados no estudo <i>in vitro</i>	20
4.5.1	Avaliação da expressão gênica de <i>FFAR2</i> , <i>FFAR3</i> , <i>MCT1</i> , <i>MCT4</i> , <i>S100B</i> e <i>IL-6</i> por qPCR.....	20
4.5.2	Ensaio de viabilidade celular.....	21
4.5.3	Ensaio de ligação fosfatidilserina-anexina V.....	21

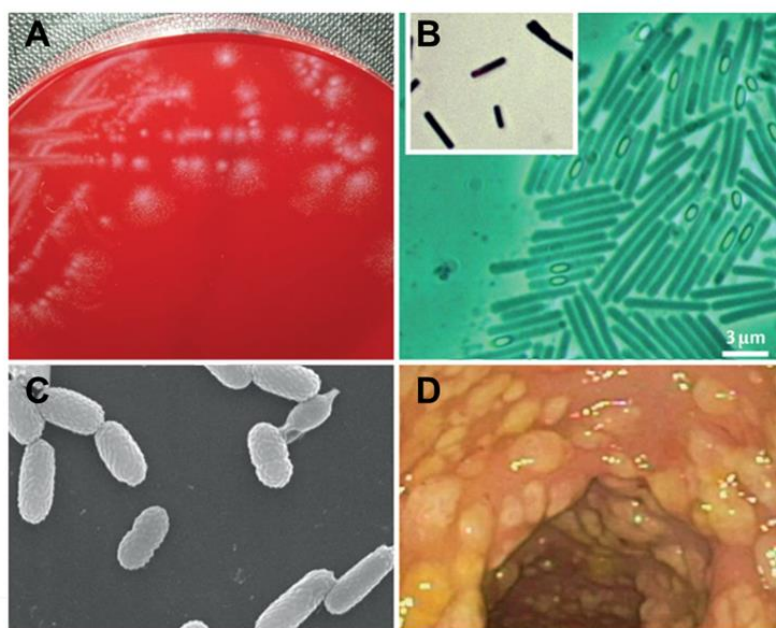
4.5.4	Avaliação da atividade de caspase 3/7.....	22
4.5.5	Imunofluorescência para IL-6, STAT3, S100B e Bcl2.....	22
4.6	Análise estatística.....	23
5	Resultados.....	24
5.1	Contribuição do pré-tratamento com propionato no desfecho clínico de camundongos infectados pelo <i>C. difficile</i>	24
5.2	Contribuição do pré-tratamento com propionato na disfunção do trato gastrointestinal em camundongos infectados pelo <i>C. difficile</i>	26
5.3	Expressão de transportadores e receptores para AGCCs em células gliais entéricas.....	27
5.4	Toxinas do <i>C. difficile</i> alteram a expressão de transportadores e receptores de AGCCs em células gliais entéricas.....	28
5.5	Viabilidade de células gliais entéricas expostas ao propionato <i>in vitro</i>	29
5.6	Contribuição do propionato na expressão de <i>IL-6</i> em células gliais entéricas desafiadas por TcdA ou TcdB.....	30
5.7	Contribuição do propionato na translocação nuclear de STAT3 em células gliais entéricas desafiadas por TcdA ou TcdB.....	32
5.8	Contribuição do propionato na expressão de S100B em células gliais entéricas desafiadas por TcdA ou TcdB.....	33
5.9	Contribuição do propionato na morte celular e atividade de caspase 3/7 em células gliais entéricas desafiadas por TcdA ou TcdB <i>in vitro</i>	35
5.10	Efeito do propionato na atividade de Bcl2 em células gliais entéricas desafiadas por TcdA e TcdB.....	35
6	DISCUSSÃO.....	37
7	CONCLUSÃO.....	44
	REFERÊNCIAS.....	46
	APÊNDICE.....	59
	ANEXO A.....	60
	ANEXO B.....	93
	ANEXO C.....	94
	ANEXO D.....	95

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Clostridioides difficile*

Clostridioides (no passado denominado por *Clostridium*) *difficile* (*C. difficile*) é um bacilo Gram-positivo, anaeróbio estrito formador de esporos e com capacidade de produzir toxinas (Figura 1). Este micro-organismo é um dos principais causadores de diarreia nosocomial relacionada a antibioticoterapia, com variação sintomática de diarreia leve a doença fulminante que pode ser acompanhada por colite pseudomembranosa (ABT; MCKENNEY; PAMER, 2016).

Figura 1- *Clostridioides difficile*



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

A transmissão de *C. difficile* ocorre por meio de esporos pela via fecal-oral ou contato com superfícies contaminadas. Os esporos são resistentes à acidez estomacal e conseguem chegar ao duodeno, onde alguns ácidos biliares (taurocolato, colato e quenodeoxicolato) favorecem a germinação. Após a ativação, agora como células vegetativas, a colonização no cólon do hospedeiro acontece, sobretudo, em ambiente de exposição prévia a antibióticos, os

quais provocam diminuição de bactérias protetoras como Bacteroidota (anterior Bacteroidetes), Bacillota (anterior Firmicutes) e Bifidobacterias. Além disso, de forma concomitante, há o aumento de Pseudomonadota (anterior Proteobacteria), em especial a família *Enterobacteriaceae*, frequentemente associada à patologias (SPIGAGLIA, 2024; GONZALES-LUNA *et al.*, 2023; CHANDRASEKARAN; LACY, 2017; CZEPIEL *et al.*, 2019; NIBBERING *et al.*, 2021).

Historicamente, os fatores de risco para infecção por *Clostridioides difficile* (ICD) envolvem o uso indiscriminado de antibióticos, idosos, imunossupressão e longos períodos de hospitalização. O tratamento com inibidores de bomba de prótons, cirurgia gastrointestinal, doença inflamatória intestinal (DII) também são fatores que configuram risco para ICD (YADEGAR *et al.*, 2023; EZE *et al.*, 2017). A ICD está frequentemente relacionada a infecções adquiridas em ambientes hospitalares, no entanto, este conceito tem sido desafiado com o surgimento de casos em comunidades e estudos de sequenciamento genômicos que reforçam a variabilidade genética dos episódios de ICD, sugerindo casos distintos entre si e um potencial reservatório de *C. difficile* fora dos ambientes de assistência à saúde (DUROVIC; WIDMER; TSCHUDIN-SUTTER, 2018; LIM; KNIGHT; RILEY, 2020).

Nos Estados Unidos, em 2021, foram registrados 110,2 casos para cada 100.000 indivíduos em locais cobertos pelo Programa de Infecções Emergentes. Além disso, as taxas de infecção foram superiores em mulheres e pessoas brancas, aumentando com a idade, sendo observado que 61% dos casos de ICD fizeram uso de antibiótico previamente (CDC, 2023).

No Brasil, Costa *et al.* (2017) realizaram um estudo com pacientes oncológicos no nordeste brasileiro, onde 23 de um total de 48 pacientes (48%) positivaram para *C. difficile*. Outro estudo, multicêntrico e prospectivo, mostrou uma prevalência de 15% de ICD, variando de 0 a 37%, em cinco hospitais brasileiros de diferentes regiões do País (GIRÃO *et al.*, 2020). Mais recentemente, um estudo de vigilância ativa diária, no período de três meses, observou a incidência de 9,2 casos por 10.000 pacientes-dia em um hospital universitário brasileiro de referência quaternária (BRAGA *et al.*, 2023). Apesar da subnotificação, o *C. difficile* é considerado como a terceira espécie de micro-organismo associada a casos de diarreia em comunidade (TRINDADE; DOMINGUES; FERREIRA, 2019).

1.2 Toxina A e Toxina B do *Clostridioides difficile*

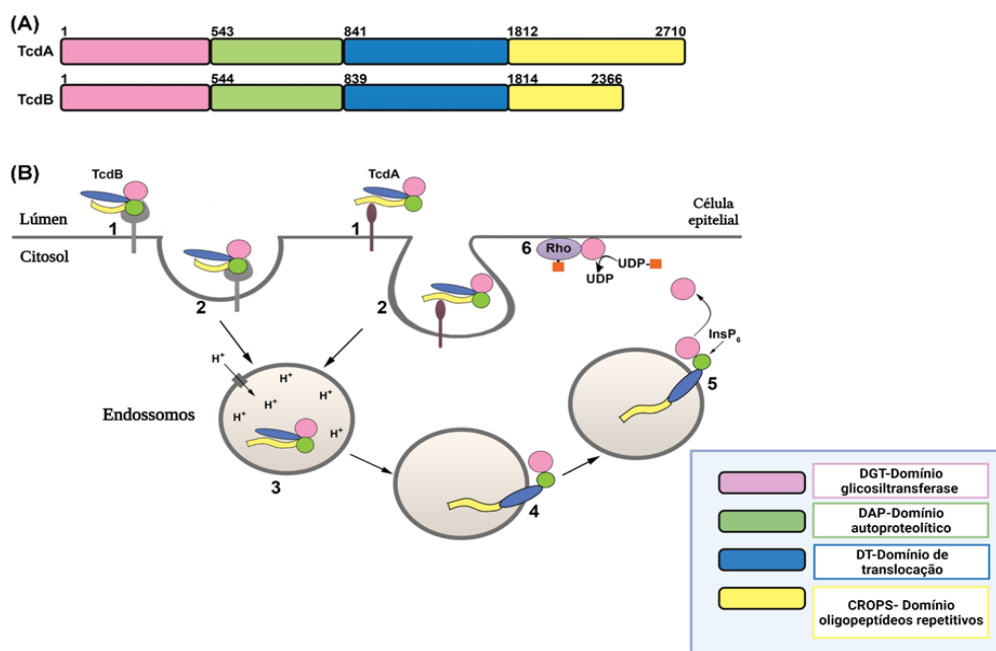
As principais toxinas produzidas pelo *C. difficile* são TcdA e TcdB. Algumas cepas

conseguem produzir a toxina binária (CDT), a qual não possui mecanismo bem elucidado e, sozinha, não demonstra ser suficiente para causar doença grave. No entanto, quando combinada com as toxinas A/B, pode aumentar a virulência da bactéria, o risco de complicação da doença e a letalidade (MARKOVSKA *et al.*, 2023; YOUNG *et al.*, 2022; HEILS *et al.*, 2023).

O peso molecular da TcdA e TcdB corresponde, respectivamente, a 308 e 270 kDa. São toxinas formadas por quatro domínios funcionais: um domínio glicosiltransferase aminoterminal (DGT), um domínio autoproteolítico (DAP), um domínio de translocação (DT) e um domínio de ligação ao receptor (DLR), este último constituído por oligopeptídeos repetitivos combinados (CROPS) (SMITS *et al.*, 2016; CHUMBLER *et al.*, 2016; PRUITT *et al.*, 2012; PAPATHEODOROU *et al.*, 2010).

Inicialmente, as toxinas se ligam a receptores do hospedeiro, como o proteoglicano 4 de sulfato de condroitina (CSPG4), Frizzled (FZD), Nectina-3 e inibidor da via do fator tecidual (TFPI), e são internalizadas por endocitose. A acidificação do endossomo desencadeia mudanças conformacionais na toxina pelos quais DGT consegue chegar ao citosol, onde glicosila e inativam Rho GTPases. A inativação dessas proteínas prejudica a sinalização celular, desregula o citoesqueleto de actina, causando arredondamento celular, e também gera apoptose. Tais efeitos são potencialmente mais observados na toxicidade da TcdB (ALAM *et al.*, 2024; CHILDRESS *et al.*, 2023; PAPARELLA *et al.*, 2021).

Figura 2 - Estrutura primária e mecanismo de ação de TcdA e TcdB



Fonte: Chandrasekaran e Lacy (2017). Estrutura representando o mecanismo de ação de TcdA e TcdB. (A) As toxinas A e B são organizadas em quatro domínios funcionais: o domínio glicosiltransferase (DGT) ilustrado na

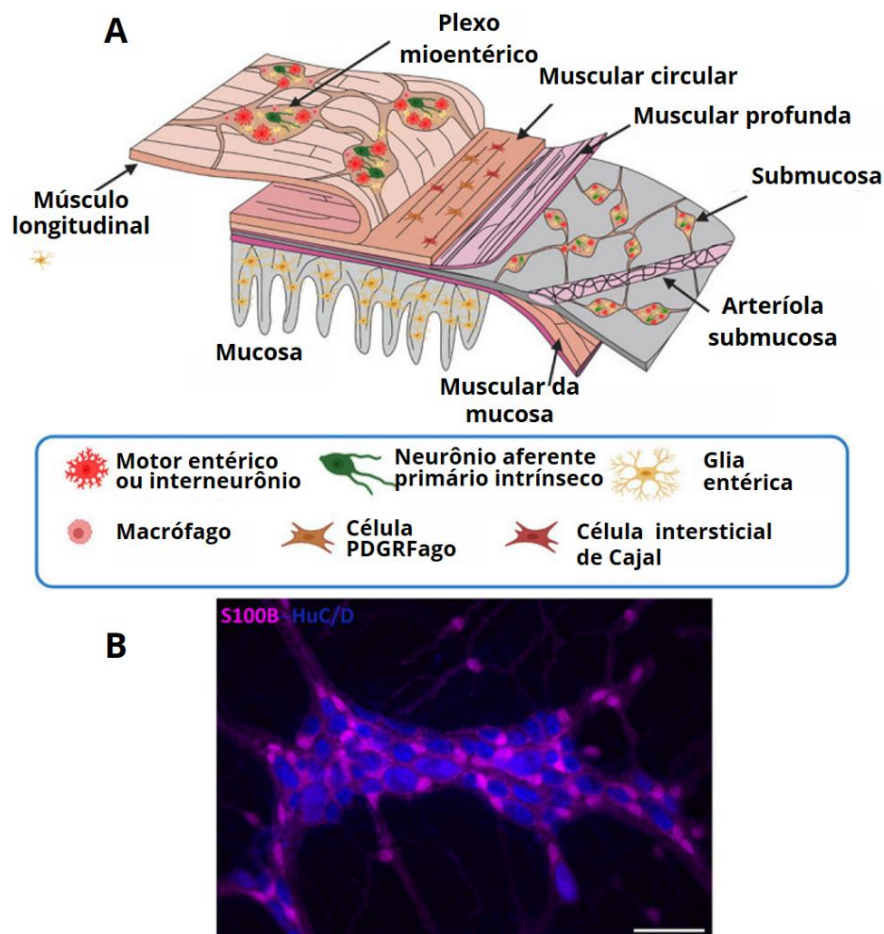
cor rosa, o domínio de autoproteolítico (DAP) ilustrado na cor verde, o domínio de entrega ou formação de poros ilustrado na cor azul e o domínio de oligopeptídeos repetitivos combinados que é o CROPS na cor amarelo. (B) Os quatro domínios funcionais contribuem para um mecanismo de intoxicação em diferentes etapas. TcdA e TcdB se ligam a diferentes proteínas da superfície celular ou açúcares no epitélio colônico (etapa 1) e são internalizados por vias endocíticas distintas (etapa 2). As toxinas atingem os endossomos acidificados (etapa 3) e o baixo pH desencadeia uma alteração conformacional no domínio de entrega da toxina, resultando na formação de poros e translocação do DGT (e provavelmente do DAP) para o citosol (etapa 4). Inositol hexaquisfosfato (InsP₆) se liga e ativa o DAP, resultando na clivagem e liberação do DGT (etapa 5). O DGT inativa as proteínas da família Rho transferindo a porção de glicose (quadrados na cor laranja) da UDP-glicose para a região switch I da GTPase (etapa 6). A glicosilação interrompe a sinalização da GTPase e leva a efeitos citopáticos de "arredondamento" e morte celular apoptótica.

A patogênese da infecção causada por *C. difficile* está relacionada ao potencial das toxinas secretadas que, a nível celular induz liberação de citocinas pró-inflamatórias e morte celular, culminando na quimiotaxia de neutrófilos, aumento da permeabilidade intestinal e dano tecidual (HAYASHI *et al.*, 2021; CHANDRASEKARAN; LACY, 2017). Danos intestinais como a diarreia secretória e inflamação no cólon são alguns dos sinais e sintomas, além de ulcerações e colite pseudomembranosa em casos mais graves, com desfechos que podem ser fatais (SPIGAGLIA, 2024; ALAM *et al.*, 2024). A dismotilidade gastrointestinal, provocada pelos efeitos citopáticos das toxinas de *C. difficile*, também contribui para a neuroplasticidade do sistema nervoso entérico (SNE), alterando a regulação da motilidade e secreção do intestino (COSTA *et al.*, 2025). As células entéricas, neurônios entéricos e células gliais entéricas são muito suscetíveis aos efeitos deletérios das toxinas, uma vez que são submetidas à ação intensa de citocinas pró-inflamatórias (FETTUCIARI *et al.*, 2022).

1.3 Células gliais entéricas

As células gliais entéricas, juntamente com os neurônios entéricos, formam uma rede complexa denominado sistema nervoso entérico (SNE). Estas células desempenham funções importantes no trato gastrointestinal. São células derivadas da crista neural vagal encontradas na camada mucosa (próximo as células epiteliais intestinais), no plexo submucoso (Meissner), localizado na camada submucosa próximo à camada muscular circular interna, e no plexo mioentérico (Auerbach), localizado entre a camada muscular circular interna e a camada longitudinal externa (SANTHOSH, S. *et al.* 2024; GRUBISIC; GULBRANSEN, 2017; NAGY; GOLDSTEIN, 2017; VERGNOLLE, CIRILLO, 2018).

Figura 3 - Representação das camadas intestinais e localização das células gliais entéricas



Fonte: Sharkey e Gary (2023). A: a organização geral do sistema nervoso entérico. O plexo mioentérico situa-se entre as camadas musculares longitudinal e circular. O plexo submucoso encontra-se na submucosa e em animais maiores (não mostrado) consiste em um componente externo e um interno. As fibras nervosas conectam os gânglios e formam plexos nervosos que inervam o músculo longitudinal, o músculo circular, a muscular da mucosa e a mucosa. Existem também nervos entéricos que inervam as artérias na submucosa, bem como os tecidos linfóides associados ao intestino. A mucosa é densamente inervada. A glia entérica é encontrada associada aos nervos entéricos em toda a parede do intestino. B: organização de neurônios entéricos (marcados com anti-HuC/D, azul) e glia entérica (marcados com anti-S100B, rosa) no plexo mioentérico do íleo de camundongo. Barra de escala, 100 µm.

A glia entérica é uma população de células reconhecida, historicamente, como “células de suporte” do SNE. No entanto, estudos vêm revelando a gama de funções e ampliando a importância dessas células por todo o sistema digestivo (BOESMANS *et al.* 2022; SEGUILLA, L.; GULBRANSEN, B., 2021; HARRY e RAO, 2021). Elas realizam comunicação rápida e bidirecional com neurônios entéricos, regulando reflexos e mediando a sinalização do SNE por meio de receptores purinérgicos e neurotransmissores, como o peptídeo intestinal vasoativo (VIP) (SEGUILLA, L.; GULBRANSEN, B., 2021; FUNG *et al.*, 2017).

As células gliais entéricas também constituem a maior população do SNE e exercem grande influência no trato gastrointestinal quando sofrem alterações durante uma infecção, estimulando a secreção de fluidos para eliminação do patógeno (GRUBIŠIĆ; GULBRANSEN, 2017).

1.4 Efeitos das toxinas de *C. difficile* em células gliais entéricas

Os efeitos citotóxicos e inflamatórios das toxinas A e B (TcdA e TcdB) de *C. difficile* são bastante expressivos, sendo a TcdB responsável por efeitos mais nocivos. Os neurônios entéricos podem ser excitados pela TcdA, inibindo a transmissão noradrenérgica e causando diarreia secretória (XIA, Y. *et al.*, 2000). Ao gerar alteração intestinal, a ICD provoca morte de células gliais entéricas a partir da regulação de receptores de adenosina (COSTA *et al.* 2023). Além disso, as toxinas de *C. difficile* ativam canais de Panexina-1 que liberam ATP e, por sua vez, ativam o receptor P2X7, que também provoca morte celular de células gliais entéricas (LOUREIRO *et al.* 2022).

Em estudo *in vitro*, TcdB causa arredondamento celular precoce com glicosilação de Rac1, uma proteína pertencente à família de Rho GTPases que são conhecidas por regular o citoesqueleto celular. Também foi observado parada do ciclo celular G2/M pela inativação do complexo ciclina B1/Cdc2 causada pela regulação positiva de p27, a regulação negativa de ciclina B1 e Cdc2 fosforilados em Thr161 e Tyr15 e apoptose por uma via dependente de caspase, mas independente de mitocôndrias. As células gliais entéricas que sobreviveram aos efeitos citotóxicos de TcdB não apresentaram recuperação completa (FETTUCCIARI *et al.*, 2017).

Recentemente, Fettucciari *et al.* (2024) evidenciou que citocinas pró-inflamatórias aumentam a citotoxicidade de TcdB em células gliais entéricas após 48h de interação entre elas. A persistência do estímulo das citocinas modifica o processo de apoptose para necrose, envolvendo progressivamente as células em contato com a toxina B. A secreção de toxinas, bem como a germinação de *C. difficile*, está associada a um ambiente favorecido pelo uso excessivo de antibióticos, desequilíbrio de ácidos biliares, aumento de bactérias patológicas e redução de bactérias produtoras de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), que contribui fortemente para a disbiose intestinal (COSTA *et al.*, 2025).

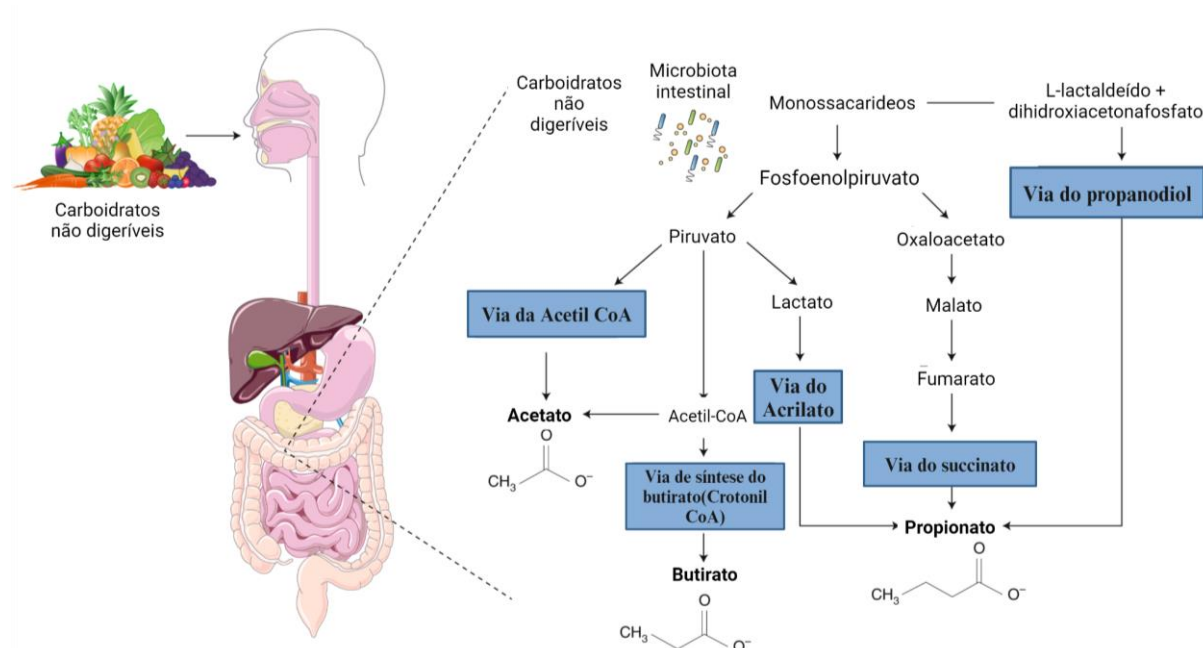
1.5 Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCCs) e a importância em condições fisiológicas

Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) constituem o produto da fermentação de fibras da dieta, realizada por bactérias da microbiota intestinal que, metabolizam, via glicólise ou via das pentoses fosfato, em piruvato. Posteriormente, o piruvato pode ser convertido em propionato a partir da via de succinato ou via do acrilato, e em acetato e butirato, por meio do intermediário acetil-CoA (FRAMPTON *et al.*, 2020; Gregory *et al.*, 2021).

O microbioma intestinal é constituído, aproximadamente, 90% de Bacteroidota (gêneros predominantes: *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Alistipes* e *Prevotella*) e de Bacillota (gêneros predominantes: *Eubacterium*, *Clostridium* e *Ruminococcus*), somado aos filos Actinomycetota – anterior Actinobactéria – (gêneros predominantes: *Collinsella* e *Bifidobacterium*) e Pseudomonadota (gênero predominante: *Escherichia*) (VAN TREUREN, DODD, 2020).

A maior parte das bactérias entéricas é capaz de produzir acetato. Enquanto as espécies das famílias *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae* (filo Bacillota) estão mais envolvidas na produção de butirato. O propionato, por sua vez, pode ser obtido por bactérias que utilizam a via do succinato, como as espécies *Prevotella spp.* (filo Bacteroidota) e *Phascolarctobacterium succinatutens* ou *Veillonella spp.* (filo Bacillota). Além das espécies *Coprococcus spp.* (via do acrilato), *Roseburia inilivorans* e *Blautia* (via do propanodiol), ambas pertencentes da família *Lachnospiraceae* (FUSCO *et al.*, 2023; MUKHOPADHYA, LOUIS, 2025) (Figura 4).

Figura 4 – Metabolismo e síntese de AGCCs

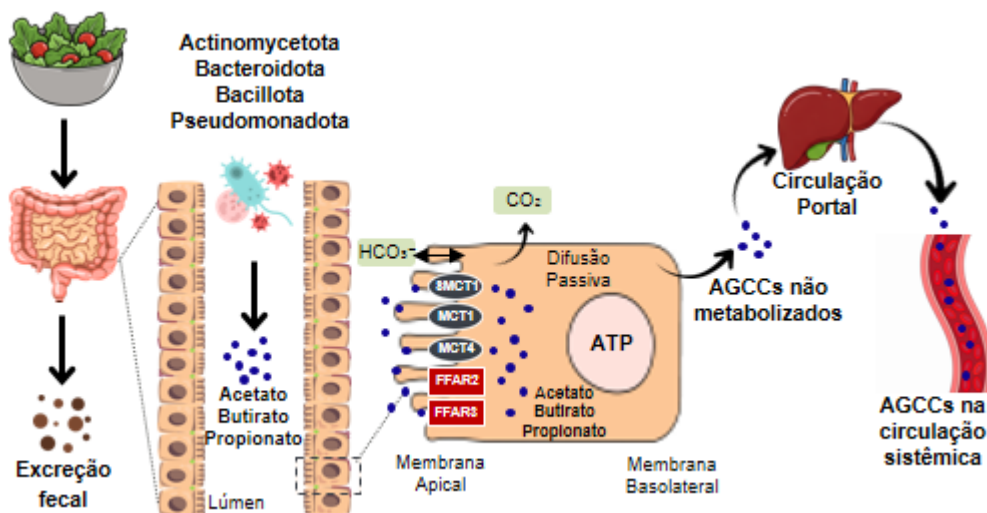


Fonte: Adaptado de FRAMPTON *et al.*, 2020. A microbiota intestinal fermenta os carboidratos não digeríveis, provenientes da dieta, reduzindo-os a monossacarídeos, os quais são metabolizados para dar início às vias produtoras de AGCCs: acetato, butirato e propionato.

O acetato, propionato e butirato são os principais AGCCs produzidos no intestino, cuja produção está intrinsicamente ligada ao conteúdo de fibras dietéticas consumidas (DALILE *et al.*, 2019; MAKKI *et al.*, 2018). Os AGCCs são absorvidos rapidamente por colonócitos via transportadores, que podem ser acoplados a prótons, como os transportadores de monocarboxilato 1 (MCT1) e 4 (MCT4), ou acoplados a sódio, como SMCT1 (FUSCO, 2023; SILVA *et al.*, 2020; DALILE *et al.*, 2019) (Figura 5).

A função dos AGCCs está relacionada à integridade da barreira intestinal através da regulação do pH luminal, produção de muco, fornecimento de energia para as células epiteliais, proteção contra a invasão por patógenos e função imunológica da mucosa a partir de processos envolvendo sinalização do receptor acoplado à proteína G e inibição da histona desacetilase (HDAC) (MANN, LAM, UHLIG, 2024; BLAAK *et al.*, 2020; BACH *et al.*, 2018). Os AGCCs podem ativar receptores de ácidos graxos livres, como FFAR3, também conhecido como receptor acoplado a proteína G 41 (GPR41), e FFAR2, também conhecido como receptor acoplado a proteína G 43 (GPR43). Ao ativar esses receptores, os AGCCs regulam a expressão de proteínas de junções intercelulares, como a quinase ativada por AMP (AMPK), melhorando a função de barreira intestinal e contribuindo para a homeostase intestinal (PARADA VENEGAS *et al.*, 2019; DALILE *et al.*, 2019).

Figura 5 – Fibras dietéticas e metabolismo de AGCCs



Fonte: Adaptado de Dalile *et al.* (2019). Fibras dietéticas são fermentadas por bactérias intestinais, dando origem aos ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), que são rapidamente absorvidos pelas células do cólon por meio de transportadores de monocarboxilato (MCT1 e SMCT1), difusão passiva ou troca com bicarbonato (HCO_3^-), que em seguida, é parcialmente oxidado a CO_2 , produzindo energia para as células na forma de ATP. Os AGCCs que não são metabolizados no intestino são transportados através da membrana basolateral para a circulação portal do fígado, fornecendo um substrato energético para os hepatócitos por meio da oxidação. Apenas pequenas quantidades de AGCCs produzidos no cólon atingem a circulação sistêmica.

Um estudo com pacientes pediátricos, diagnosticados com ICD recorrente, observou diferença significativa nos níveis de AGCCs antes do transplante de microbiota fecal (TMF), comparado ao controle saudável. Acetato, propionato e isovalerato foram os AGCCs que mais aumentaram 12 meses após TMF (JESS *et al.*, 2023). Os benefícios dos AGCCs superam suas funções metabólicas, pois fortalecem a interface entre o lúmen e o epitélio, estimulando as células caliciformes a produzir muco, importante componente imunológico (GREGORY; PENSINGER; HRYCKOWIAN, 2021).

Fachi *et al.* (2020) demonstraram um efeito protetor de AGCC na ICD em camundongos ao observar o aumento das respostas imunes inatas, com ação em neutrófilos e ILC3s, por meio do receptor de ácido graxo livre 2 (FFAR2). Os AGCCs também têm um efeito inibitório direto sobre a taxa de crescimento de *C. difficile* em cultura, porém aumentam a produção de toxinas no intestino (GREGORY; PENSINGER; HRYCKOWIAN, 2021). Além disso, os AGCCs reduzem a perda de neurônios em camundongos tratados com antibióticos, como ampicilina, vancomicina e metronidazol (VICENTINI *et al.*, 2021). Recentemente, SOUSA *et al.*, (2025) demonstraram, em estudo *in vitro*, que o butirato em baixa concentração (0,2 μM) reduz a morte de células gliais entéricas induzidas pelas toxinas de *C. difficile*.

O propionato, um AGCC obtido a partir da fermentação bacteriana de fibras alimentares, exerce efeitos protetores no intestino, como a regulação da imunidade da mucosa e ação anti-inflamatória. Pacientes infectados por *C. difficile* apresentam redução dos níveis de propionato nas fezes na fase aguda da doença (SAYOL-ALTARRIBA *et al.*, 2024). O aumento do propionato no cólon pode representar uma estratégia eficaz para a manutenção da homeostase intestinal do hospedeiro (WANG *et al.*, 2024). Metabólitos do propionato, como propionil-CoA, também podem inibir, por exemplo, o crescimento de *Salmonella typhimurium* (ZHAN *et al.*, 2022; HORSWILL; DUDDING; ESCALANTE-SEMERENA, 2001). JEONG *et al.* (2019) também demonstraram que o propionato exerce efeito inibitório sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), tanto *in vitro* quanto *in vivo*. No entanto, a contribuição do propionato na resposta de células gliais entéricas às toxinas de *C. difficile* e na disfunção intestinal após infecção por *C. difficile* ainda não foi esclarecida por estudos anteriores.

Por meio de análise bioinformática, Wang *et al.* (2024) identificaram que a produção de propionato mediada pela metilmalonil-coenzima A (CoA) mutase (MCM) em *Bacteroides thetaiotaomicron* (BT) confere diferenciação e homeostase de células caliciformes, além de potencial melhora na colite. O propionato também atua inibindo diretamente as células T $\gamma\delta$ produtoras de IL-17, por meio da inibição de HDAC, em pacientes com doença inflamatória intestinal (DII) (DUPRAZ *et al.*, 2021).

2 JUSTIFICATIVA

C. difficile é uma das causas mais relevantes de quadro diarreico grave em pacientes hospitalizados (COSTA *et al.*, 2025). Nos últimos anos, os casos de ICD em comunidades têm aumentado, evidenciando um desafio para além dos ambientes nosocomiais (DUROVIC; WIDMER; TSCHUDIN-SUTTER, 2018; LIM; KNIGHT; RILEY, 2020). Um estudo de revisão sistemática e meta-análise, com base em publicações entre 2016 e 2024, evidenciou que a incidência de ICD foi maior em ambientes hospitalares e que as taxas de recorrência foram mais elevadas para ICD adquirida na comunidade (AKORFUL *et al.*, 2025). No Brasil, foi identificada uma incidência de 9,2 casos a cada 10.000 pacientes-dia em um hospital universitário brasileiro de referência quaternária (BRAGA *et al.*, 2023). Girão *et al.* (2020) relataram uma prevalência de 15% de ICD em cinco hospitais brasileiros de diferentes regiões do país. No Nordeste brasileiro, Costa *et al.* (2017) realizaram um estudo com pacientes oncológicos, no qual 23 dos 48 pacientes (48%) foram positivos para *C. difficile*.

A ICD é adquirida pela via fecal-oral, por meio de esporos, que germinam em condições de alteração da microbiota intestinal, gerando a forma vegetativa de *C. difficile*, que produz e libera TcdA e TcdB no lúmen do intestino grosso (SPIGAGLIA, 2024; CYMBAL *et al.*, 2024). As toxinas de *C. difficile* podem afetar a função de diversas células do intestino grosso, incluindo as células gliais entéricas. As células gliais entéricas desempenham importante função na regulação da motilidade intestinal (AHMADZAI *et al.*, 2021), e sua hiperexcitabilidade após a fase aguda da inflamação não infecciosa tem sido implicada na disfunção da motilidade intestinal (SEGUELLA *et al.*, 2025). No entanto, os efeitos citopáticos das toxinas de *C. difficile* sobre as células gliais entéricas podem ser deletérios devido à intensa ação de citocinas pró-inflamatórias (COSTA *et al.*, 2025; FETTUCCIARI *et al.*, 2022).

O propionato, um AGCC obtido a partir da fermentação bacteriana de fibras alimentares, exerce efeitos protetores no intestino, como a regulação da imunidade da mucosa e ação anti-inflamatória. Pacientes infectados por *C. difficile* apresentam redução dos níveis de propionato nas fezes durante a fase aguda da doença (SAYOL-ALTARRIBA *et al.*, 2024). O aumento do propionato no cólon pode representar uma estratégia eficaz para a manutenção da homeostase intestinal do hospedeiro (WANG *et al.*, 2024). No entanto, ainda não está definido o papel do propionato na prevenção da disfunção intestinal após ICD, nem sua contribuição para a resposta das células gliais entéricas às toxinas de *C. difficile*. Desse modo, este trabalho propôs-se a

investigar o papel do propionato na disfunção do trato gastrointestinal após ICD e na resposta das células gliais entéricas às toxinas de *C. difficile*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Investigar o efeito do pré-tratamento com propionato na infecção por *C. difficile* e na resposta pró-inflamatória e na morte celular da glia entérica desafiada por TcdA ou TcdB.

3.2 Objetivos Específicos

- Verificar se o pré-tratamento com propionato reduz a gravidade da doença causada pela ICD e diminui a disfunção gastrointestinal em camundongos infectados pelo *C. difficile*.
- Identificar se as células gliais entéricas expressam transportadores (*MCT1* e *MCT4*) e receptores (*FFAR2* e *FFAR3*) de AGCCs;
- Verificar se as toxinas de *C. difficile* afetam a expressão dos transportadores (*MCT1* e *MCT4*) e dos receptores (*FFAR2* e *FFAR3*) de AGCCs em células gliais entéricas;
- Avaliar se o propionato reduz a inflamação induzida pelas toxinas de *C. difficile* em células gliais entéricas, por meio da medição dos marcadores IL-6, STAT3 e *S100B*.
- Avaliar se o propionato protege células gliais entéricas contra morte celular induzida pelas toxinas de *C. difficile*;
- Investigar se o propionato promove expressão de fatores anti-apoptóticos (Bcl2) em células gliais entéricas expostas às toxinas de *C. difficile*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Fármacos, reagentes, materiais e soluções utilizados no estudo

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

4.2 Experimentos *in vivo*

4.2.1 Aspectos éticos em pesquisa animal

Os experimentos realizados em camundongos C57BL/6 foram aprovados pela Comissão Institucional de Ética e Cuidados em Pesquisa Animal da *University of Virginia* (UVA/EUA) sob o protocolo 4096. Todos os experimentos com animais foram realizados na UVA.

4.2.2 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos de 8 semanas de idade. Os camundongos C57BL/6 foram provenientes do laboratório Jackson. Os camundongos foram mantidos em gaiolas de polycarbonato, com tampa de arame e filtro na parte superior, forradas com madeira processada, trocadas duas vezes por semana. Os animais permaneceram nas mesmas condições ambientais durante os experimentos (temperatura: 22 ± 2 °C, com exaustão de ar e ciclo de 12 h claro/12 h escuro) e com livre acesso à água e à ração padrão.

4.2.3 Preparação da bactéria

A cepa de *C. difficile* VPI10463 (ATCC 43255) utilizada no presente estudo para infectar os camundongos foi obtida da empresa ATCC (Coleção de Tipos de Culturas Americano). VPI10463, que foi isolada a partir de uma ferida abdominal, é uma cepa do toxinótipo 0, ribotipo 087 e contém os genes *tcdA* e *tcdB*, que codificam TcdA e TcdB respectivamente. Além disso, essa cepa é negativa para os genes que codificam a toxina binária (*cdtA* e *cdtB*).

Para a preparação do inóculo, 10 µL do estoque de *C. difficile* VPI10463 (em fase de esporo em caldo de carne picada, CCP) foram inoculados em placas ágar sangue de taurocolato-cicloserina-cefoxitina-frutose, a qual é específica para obtenção de colônias de *C. difficile*. Em seguida, as placas foram incubadas em câmara anaeróbica (Coy Laboratory) por 24 h a 37 °C. Decorrido esse período de incubação, uma colônia de *C. difficile* foi inoculada em CCP (8 mL) e incubada em câmara anaeróbica (Coy Laboratory) por 16-18 h a 37 °C para atingir um crescimento na fase log. Em seguida, 1 mL desse cultivo foi transferido para um microtubo de 1,5 mL e centrifugado (10000 rpm por 2 min). O sobrenadante foi removido e o pellet foi ressuspenso com 1 mL de CCP. Esse procedimento de lavagem com CCP foi repetido quatro vezes. Para obtenção de 10⁵ UFC (Unidades formadoras de colônia) de *C. difficile* VPI10463/100µL, realizou-se uma diluição de 1:100 (bactéria em suspensão: CCP). A leitura de turbidez de 0,5 McFarland foi considerada equivalente a 10⁸ UFC/ml. Nos grupos infectados, 10⁵ UFC de *C. difficile* VPI10463 foram inoculadas por gavagem para cada animal.

4.2.4 Modelo de Infecção por *C. difficile* e pré-tratamento com propionato

O modelo ICD foi realizado conforme descrito anteriormente (COSTA *et al.*, 2024; MOORE *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2008). Inicialmente a microbiota dos camundongos foi alterada por meio da administração de coquetel de antibióticos na água de beber por três dias. O coquetel de antibiótico consistiu em gentamicina (0,035 mg/mL), colistina (850 U/mL), metronidazol (0,215 mg/mL) e vancomicina (0,045 mg/mL). Em seguida a água com o coquetel de antibióticos foi substituída por apenas água (com novas garrafas). Após 48h do término do coquetel de antibióticos, os camundongos receberam clindamicina (32 mg/kg) por via intraperitoneal. Após 24h da administração de clindamicina, os camundongos receberam 10⁵ UFC da forma vegetativa de *C. difficile* (cepa VPI10463 ao qual produz TcdA e TcdB) em CCP por gavagem. O peso e o desenvolvimento dos sintomas da doença de cada animal foram monitorizados diariamente. Animais em processo de óbito ou com perda do peso corporal > 20% e escore de gravidade da doença superior a 14 foram eutanasiados. Os animais foram eutanasiados 14 dias após a inoculação com *C. difficile*.

Para os grupos pré-tratados com propionato, 24h antes de iniciar o coquetel de antibiótico, propionato de sódio (150 mM) foi adicionado na água de beber. O propionato foi mantido continuamente na água de beber até o dia 14 após a inoculação com *C. difficile*. A dose

de propionato (150 mM) foi determinada conforme estudos prévios (CHANDRA *et al.*, 2025; WANG *et al.*, 2024).

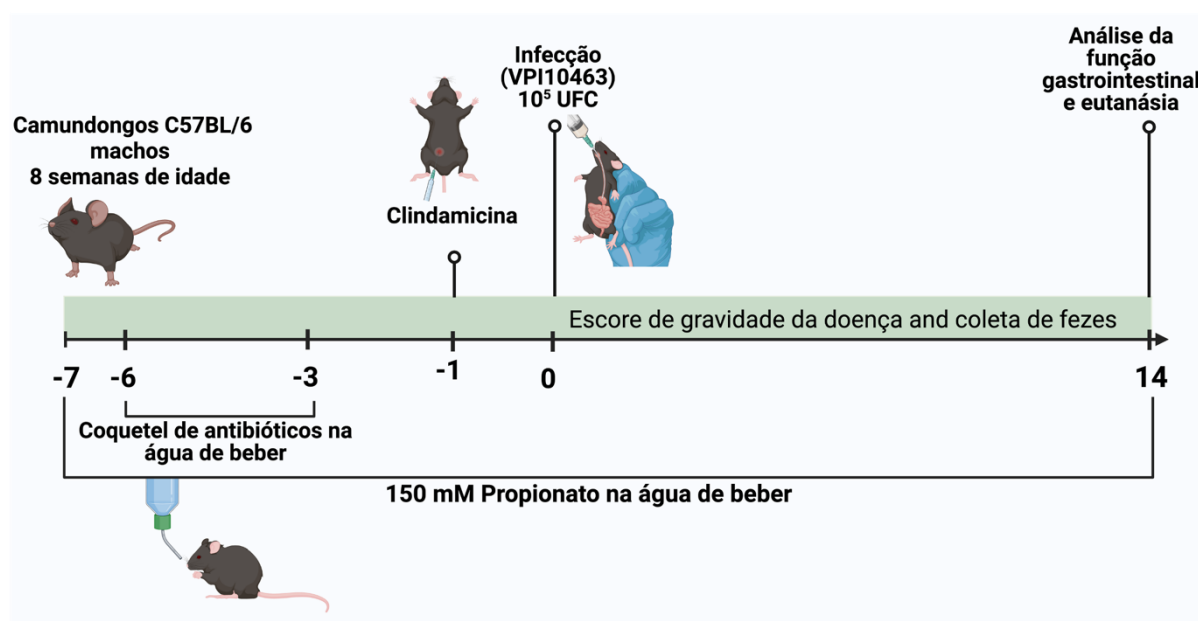
4.2.5 Grupos experimentais para o modelo de infecção

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

- Grupo Infectado (n=6): Camundongos C57BL/6 submetidos ao modelo de ICD, recebendo 10^5 UFC de *C. difficile* (cepa VPI10463) no dia 0 da infecção.
- Grupo Propionato + infectado (n=6): Camundongos C57BL/6 pré-tratados com propionato e submetidos ao modelo de ICD, recebendo 10^5 UFC de *C. difficile* (cepa VPI10463) no dia 0 da infecção.

Os animais foram eutanasiados, 14 dias após a infecção, por meio do uso de tribromoetanol (250 mg/kg, i.p.), conforme apresentado na figura 6.

Figura 6 - Esquema de indução do modelo de ICD e protocolo experimental



Fonte: Elaborado pela autora. Coquetel de antibióticos= gentamicina, metronidazol, vancomicina e colistina.

4.3 Experimentos *in vitro*

4.3.1 Cultura de células gliais entéricas

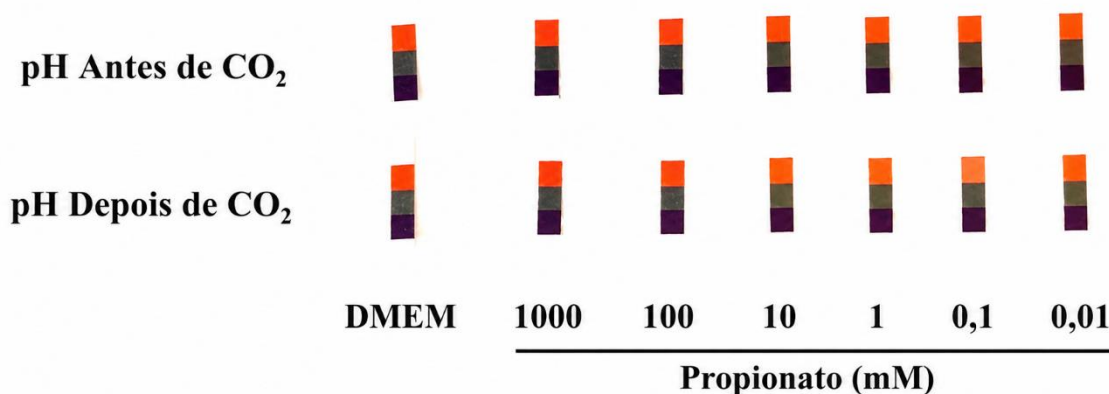
A linhagem de células gliais entéricas imortalizadas foram obtidas da ATCC (PK060399egfr, CRL 2690). Essas células são aderentes provenientes do jejuno de *Rattus norvegicus* adultos. As células gliais entéricas foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de antibióticos (100 µg/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina) e 1 mM de piruvato de sódio, sendo mantidas em incubadora a 37°C e 5% CO₂. As células foram utilizadas para a avaliação dos parâmetros deste estudo entre as passagens 16 a 22. Para todos os experimentos, as células foram liberadas dos frascos de cultura por meio de 0,05% tripsina-EDTA por 5 min.

4.3.2 Administração de toxinas e propionato em células gliais entéricas

As células gliais entéricas foram incubadas com TcdA (50 ng/mL) ou TcdB (1 ng/mL), provenientes da Techlab, por 2, 12 ou 18h de incubação. Para verificar o efeito do propionato, células gliais entéricas foram pré-tratadas com meio de cultura contendo propionato (10 mM), ao qual foram adicionados 1 hora antes da incubação com TcdA ou TcdB. O pH do meio de cultura foi mensurado após incubação de 18h das células com e sem propionato (Figura 7).

As concentrações de toxinas foram determinadas conforme estudo prévio do nosso grupo de pesquisa (COSTA *et al.*, 2021). Enquanto a concentração de propionato foi determinada por meio do ensaio de viabilidade celular.

Figura 7 – Avaliação do pH no meio de cultura DMEM após adição de propionato em diferentes concentrações.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.4 Parâmetros avaliados no estudo *in vivo*

4.4.1 Avaliação da carga de *C. difficile* nas fezes

Para avaliação da carga de *C. difficile* nas fezes de animais infectados pelo *C. difficile* (recebendo ou não pré-tratamento com propionato), amostras fecais foram coletadas nos dias 1, 3, 5, 7, 9, 12 e 14 após infecção. Em seguida, o DNA foi extraído das fezes com o *QIAamp DNA Stool Mini kit* (Qiagen), conforme as instruções do fabricante. O gene *tcdB* (toxina B do *C. difficile*) foi utilizado para detectar *C. difficile* nas fezes após ICD. As sequências dos primers foram: *tcdB* 5'-AATGCATTTTGGATAAACACATTG-3' (forward) e 5'-AAGTTTCTAACATCATTTCAC-3' (reverse). A PCR em tempo real (qPCR) foi realizada no Bio-Rad CFX nas seguintes condições: 95 °C por 5 min, seguidas de 40 ciclos de 15 s a 95 °C e 60 s a 55 °C.

4.4.2 Determinação do escore de gravidade da doença

O escore de gravidade da ICD foi monitorado diariamente por meio do sistema de escore (WARREN *et al.*, 2012). O sistema de escore de gravidade da ICD baseia-se nos seguintes critérios: perda de peso (0-4), diarreia (0-3), nível de atividade (0-4), postura (0-3), aparência

do pelo (0-3) e dos olhos (0-3). A soma dos escores de cada critério determina o valor final do escore de gravidade da ICD que pode variar de 0 (menos grave) a 20 (mais grave). Cada critério encontra-se descrito na Quadro 1.

Quadro 1 – Sistema de escore de gravidade da ICD

Critério	Escore				
	0	1	2	3	4
Perda de peso	Nenhuma	<10%	10-15%	15-20%	>20%
Diarreia	Normal	Fezes com formato normal e amarelada	Fezes com muco	Líquidas	
Atividade	Normal	Alerta/devagar	Letárgico/tremendo	Inativo, porém, responde ao estímulo	Não se movimenta
Postura	Normal	Costas parcialmente curvadas	Completamente curvado	Completamente curvado com nariz voltado para baixo	
Pelo	Normal	Parcialmente arrepiado	Completamente arrepiado com parcial perda de pelos	Extremamente arrepiado com perda de pelos em várias regiões do corpo	
Olhos	Normal	Metade fechado	Olhos apertados	Completamente fechado	

Fonte: WARREN *et al.*, 2012.

4.4.3 Avaliação do trânsito do trato gastrointestinal total

A avaliação do trânsito do trato gastrointestinal total (TTGIT) em animais infectados pelo *C. difficile* (recebendo ou não pré-tratamento com propionato) foi realizada por meio do método de azul de Evan, conforme descrito em estudo prévio (COSTA *et al.*, 2024). Animais foram submetidos a 12h de jejum com livre acesso a água. Após esse período, 100 µL de solução de azul de Evan (5% de azul de Evan em 0, 9% de solução de cloreto de sódio com 0, 5% de metilcelulose) foram administrados via gavagem para cada animal. O tempo inicial de administração de cada animal foi registrado. Em seguida, os animais foram monitorados a cada 10 min até a expulsão do primeiro pellet de fezes azul. O TTGIT, em minutos, foi mensurado

pela diferença entre o tempo de expulsão do primeiro pellet fecal azul e o tempo de administração da solução de azul de Evan.

4.5 Parâmetros avaliados no estudo *in vitro*

4.5.1 Avaliação da expressão gênica de *FFAR2*, *FFAR3*, *MCT1*, *MCT4*, e *S100B* por qPCR

Para avaliar a expressão gênica de *FFAR2*, *FFAR3*, *MCT1*, *MCT4*, e *S100B* em células gliais entéricas expostas à TcdA e TcdB foi realizado por qPCR. Células gliais entéricas (6×10^5 células/ poço) foram distribuídas em placas de 6 poços e tratadas com TcdA ou TcdB por 18h. Após a incubação, o RNA total foi extraído com o kit RNeasy Plus Mini (Qiagen) conforme as instruções do fabricante. Em seguida, o RNA foi quantificado por meio do fluorímetro Qubit 3.0 (Life technologies) usando o kit de ensaio Qubit RNA BR (Invitrogen). Para a síntese do cDNA, 600 ng de RNA foi então transcrito reversamente usando o kit de síntese de cDNA iScript (BioRad) após remoção da contaminação do DNA genômico por meio do tratamento das amostras com DNase I (Invitrogen). A amplificação de *FFAR2*, *FFAR3*, *MCT1*, *MCT4*, *S100B*, e *GAPDH* por qPCR foi realizada por meio do sistema CFX Connect (BioRad) com as seguintes condições 95 ° C por 30s seguido por 40 ciclos a 95 ° C por 5s e 60 ° C por 30 s. Todas as reações foram realizadas com supermix iTaq universal Syber (BioRad). Os conjuntos de primers utilizados foram listados na tabela 1. A expressão relativa de cada gene de interesse foi mensurada pelo método $\Delta\Delta C_t$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 1 - Primers utilizados no qPCR em células gliais entéricas de ratos.

Gene	Forward	Reverse
<i>GAPDH</i>	AGACAGCCGCATCTTCTTGT	CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT
<i>S100B</i>	TTCAGGGAGAGAGGGTGACAA	CTTCCTGCTCTTTGATTTCTCC
<i>Bcl2</i>	CAGCATGCGACCTCTGTTTG	CAGGTATGCACCCAGAGTGA
<i>MCT1</i>	CTGTGGGCTTGGTGACCATT	AGGTAGAGGCCTGCGATGAT
<i>MCT4</i>	ATGTGTGTGAACCGCTTTGG	ATGACCCCTGTGGTGAGGTA
<i>FFAR3</i>	CTGCTTCGGCCCCTACAATA	GTGCTGAGGAGAAGCACGTA
<i>FFAR2</i>	GGTGTGGTGACGCTTCTTA	GAGGGACTCTGCCTCAAGTG

Fonte: Elaborado pela autora.

4.5.2 Ensaio de viabilidade celular

Para definir as concentrações de propionato capazes de não afetar a viabilidade das células gliais entéricas em 18h de incubação, realizou-se o ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio (MTT). As células gliais entéricas (5×10^3 células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços e, após 24 h, foram incubadas com propionato (0,01, 0,1, 1, 10, 100 e 1000 mM) por 24 h de incubação. Em seguida, as células foram incubadas com MTT (0,5 mg/mL reconstituído em DMEM suplementado) por 2h a 37°C em incubadora úmida sob condição de 5% de CO₂. Após remoção da solução de MTT, 150 µL de dimetilsulfóxido foram adicionados a cada poço para ressuspender os cristais de formazana. As placas foram agitadas por 2 min à temperatura ambiente, e a absorbância da reação foi mensurada a 570 nm em um leitor de ELISA (Biotek). Um grupo controle de morte, no qual células gliais entéricas foram incubadas com dimetilsulfóxido (DMSO), foi incluído no experimento.

4.5.3 Imunofluorescência para IL-6, STAT3, S100B e Bcl2

Células gliais entéricas (4×10^4 células/poço) foram plaqueadas em lâmina de vidro de poliestireno para cultura de células contendo 4 poços. Após 24h foram pré-tratadas com propionato e desafiadas com TcdA ou TcdB por 18 h. Após a incubação com as toxinas do *C. difficile*, as células foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% (diluído em PBS) por 20 min em temperatura ambiente e lavadas com PBS. Em seguida, as células foram permeabilizadas com solução de permeabilização (Triton X-100 a 0,5% e albumina sérica bovina a 3%, BSA, em PBS) durante 3 min (células a serem incubadas com anti-IL-6 ou anti-S100B) ou 5 min (células a serem incubadas com anti-STAT3) a 4 °C. Após lavagem em PBS, realizou-se o bloqueio com soro de burro a 5% (diluído em PBS) durante 40 min em temperatura ambiente. Após lavagem em PBS, as amostradas foram incubadas com os anticorpos primários para anti-IL-6 (R&D system, AF506, 1:40), anti-Bcl2 (Invitrogen, PA5-27094, 1:500), ou anti-pSTAT3 (Novus Biological, NB100-82213, 1:200) overnight a 4°C. Após três lavagens com PBS, as células foram incubadas com anticorpo secundário burro anti-coelho 488 (Abcam, ab150073, 1:400) ou burro anti-cabra 647 (Abcam, ab150131, 1:400), por 2h em temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS, as amostras foram incubadas com 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Invitrogen, 1:1000 em PBS) por 8 min. Em seguida, as amostras foram lavadas com PBS e as lâminas foram montadas com o meio de montagem contendo faloidina

(VECTASHIELD, H-1600-10) ou não contendo faloidina (VECTASHIELD, H-1400-10), marcador de F-actina, ao qual representa um importante componente do citoesqueleto.

As imagens de imunofluorescência foram obtidas por microscopia de fluorescência (Zeiss). Para cada condição experimental foram adquiridas pelo menos três imagens. A quantificação de IL-6, e Bcl2 foi baseada na análise de intensidade de fluorescência, ao qual foi obtida por meio do Image J. Enquanto a porcentagem de células (%) com imunomarcagem nuclear positiva para STAT3 foi determinada pelo percentual de células positivas em relação número total de células em cada imagem.

4.5.4 Ensaio de ligação fosfatidilserina-anexina V

Para avaliar morte de células gliais entéricas incubadas com TcdA ou TcdB, realizou-se um ensaio de ligação fosfatidilserina-anexina V em tempo real em células vivas conforme descrito pelo fabricante (ensaio em tempo real Glo-anexina V apoptose, Promega). Primeiramente, células gliais entéricas (10^4 células/ poço) foram plaqueadas em placas brancas e opacas de 96 poços (Falcon). Após 24 h, as células foram incubadas com TcdA (50 ng/mL) ou TcdB (1 ng/mL) isoladamente ou precedidas por propionato (10 mM). Em seguida, adicionaram-se 100 μ L de reagente de detecção 2x (2 μ L do substrato de anexina NanoBit, 2 μ L CaCl_2 , 2 μ L anexina V-SmBit e 2 μ L anexina V-LgBit em 992 μ L de DMEM suplementado pré-aquecido a 37°C) a cada poço, sendo incubadas a 37°C numa incubadora umidificada sob 5% CO_2 condição. Após 18h de incubação, a luminescência foi mensurada por meio de um luminômetro (Infinite M Plex, TECAN). Para a obtenção da unidade de luminescência relativa (ULR), o sinal de luminescência de todas as amostras foi subtraído da luminescência intrínseca do reagente de detecção (poço apenas com DMEM suplementado e reagente de detecção sem células), e, em seguida, foi dividido pela média do grupo controle (Células sem propionato e sem toxinas).

4.5.5 Avaliação da atividade de caspase 3/7

Para avaliar a atividade de caspase-3 e 7 em células gliais entéricas incubadas com TcdA ou TcdB, recebendo ou não propionato, realizou-se um ensaio de atividade de caspase 3/7 conforme descrito pelo fabricante (caspase-Glo 3/7, Promega). Primeiramente, células gliais entéricas (10^4 células/ poço) foram plaqueadas em placas brancas e opacas de 96 poços

(Falcon). Após 24h, as células foram desafiadas com TcdA (50 ng/mL) ou TcdB (1 ng/mL) isoladamente ou precedida por propionato (10mM). Após 18h de incubação, a placa de 96 poços contendo as células tratadas foram retiradas da incubadora e colocadas em temperatura ambiente por 10 min. Em seguida, adicionaram-se 100 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 2h em temperatura ambiente e protegido da luz. A luminescência foi mensurada por meio de um luminômetro (Infinite M Plex, TECAN). Para a obtenção da unidade de luminescência relativa (ULR), o sinal de luminescência de todas as amostras foi subtraído da luminescência intrínseca do reagente de caspase-Glo 3/7 (poço apenas com DMEM suplementado e reagente de caspase-Glo 3/7 sem células), e, em seguida, foi dividido pela média do grupo controle (Células sem propionato e sem toxinas).

4.6 Análise estatística

Todos os resultados quantitativos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). A análise estatística dos dados foi realizada por meio do software GraphPad Prism, versão 10.0. Para a realização da análise estatística entre os grupos foram utilizados os seguintes testes: Teste T de Student para a comparação de dois grupos; teste de análise de variância (ANOVA) unifatorial seguido pelo teste de Tukey para comparar mais de dois grupos; ANOVA difatorial seguido pelo teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 0,05 ($\alpha = 5\%$) e níveis descritivos (p) inferiores a esse valor foram considerados significativos.

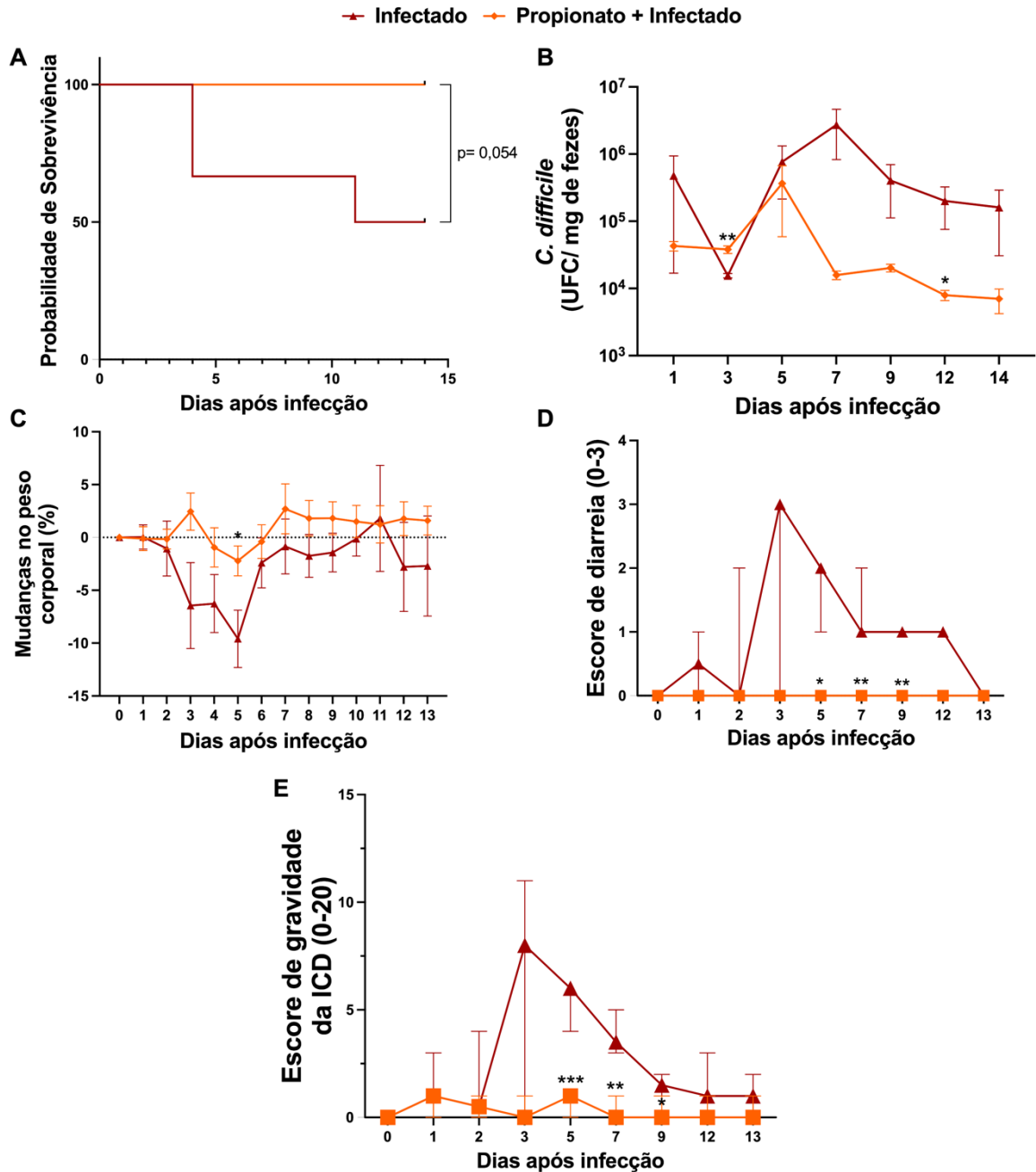
5 RESULTADOS

5.1 Contribuição do pré-tratamento com propionato no desfecho clínico de camundongos infectados pelo *C. difficile*

A relevância clínica do pré-tratamento com propionato foi investigada utilizando o modelo de ICD em camundongos, no qual também é possível observar características da doença em humanos, como diarreia e perda de peso.

Conforme apresentado na figura 8, o pré-tratamento com propionato melhorou a sobrevivência de animais com ICD ($p = 0,054$, Figura 8A), assim como promoveu redução da carga de *C. difficile* nas fezes ($p = 0,05$, dia 12 após infecção, Figura 8B). Além disso, o pré-tratamento com propionato diminuiu a perda de peso ($p = 0,02$, dia 5 após a infecção, Figura 8C), diminuiu a gravidade da diarreia ($p < 0,05$, Figura 8D) e da doença de forma geral ($p < 0,05$, Figura 8E) em animais infectados nos dias críticos da fase aguda da ICD.

Figura 8 – Pré-tratamento com propionato reduz a gravidade da ICD em camundongos



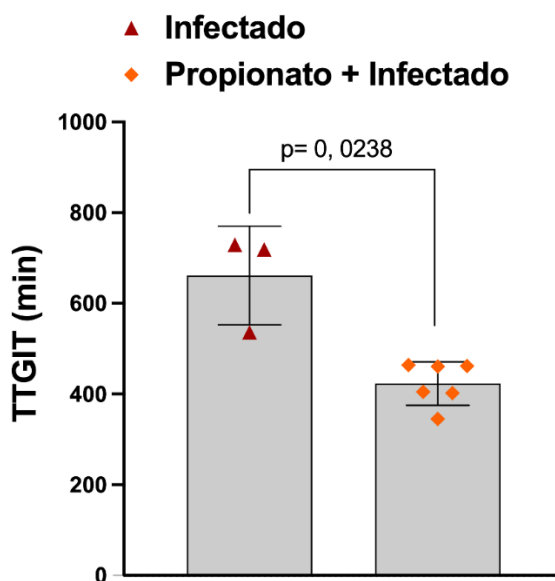
Camundongos (n=6) foram infectados com 10⁵ UFC de *C. difficile* e pré-tratados com 150 mM propionato (Grupo Propionato + infectado) ou não tratados (Infectado). (A) Curva de sobrevivência (%). Para análise estatística, utilizou-se o teste de Log-rank. (B) Quantificação da carga de *C. difficile* nas fezes por qPCR. Os dados são apresentados como média ± EPM. * p= 0, 05 e ** p= 0, 04. (C) Mudanças do peso corporal (%). Os dados são apresentados como média ± EPM. * p= 0, 02. (D) Escore de diarreia. Os dados são apresentados como mediana (mínimo e máximo). * p= 0, 01, ** p= 0, 004. (E) Escore de gravidade da ICD (resultado da soma dos seguintes critérios: perda de peso corporal, diarreia, atividade, postura, aparência do pelo e olhos). Os dados são apresentados como mediana (mínimo e máximo). * p= 0, 03, ** p= 0, 009 e *** p= 0, 004. (B-C) Para análise estatística, utilizou-se o teste de Student para múltiplas amostras. (D-E) Para análise estatística, utilizou-se o teste de Mann-Whitney para múltiplas amostras.

5.2 Contribuição do pré-tratamento com propionato na disfunção do trato gastrointestinal em camundongos infectados pelo *C. difficile*

Em estudo prévio no nosso grupo, evidenciou-se que a ICD promove disfunção do trato gastrointestinal persistente em humanos e em camundongos (COSTA *et al.*, 2024). Em camundongos, foi identificada constipação fenotípica nos dias 14 e 21 após infecção (COSTA *et al.*, 2024). A glia entérica desempenha importante função na regulação da motilidade do trato gastrointestinal (AHMADZAI *et al.*, 2021) e sua hiperexcitabilidade após a fase aguda da inflamação não infecciosa tem sido implicada em disfunção da motilidade intestinal (SEGUELLA *et al.*, 2025) e que parece envolver a via de sinalização do S100B (THOMASI *et al.*, 2025). Dado que o propionato parece modular *in vitro* a resposta da glia entérica às toxinas do *C. difficile*, investigou-se se o pré-tratamento com propionato previne a disfunção do trato gastrointestinal em camundongos infectados pelo *C. difficile*.

Conforme apresentado na figura 9, camundongos infectados pelo *C. difficile* e pré-tratados com propionato apresentaram redução do atraso do TTGIT em comparação ao grupo infectado que não recebeu o pré-tratamento ($p = 0,0238$), sugerindo melhora do perfil de constipação induzida pela ICD.

Figura 9 – Pré-tratamento com propionato reduz o atraso no trânsito do trato gastrointestinal em camundongos infectados por *C. difficile*



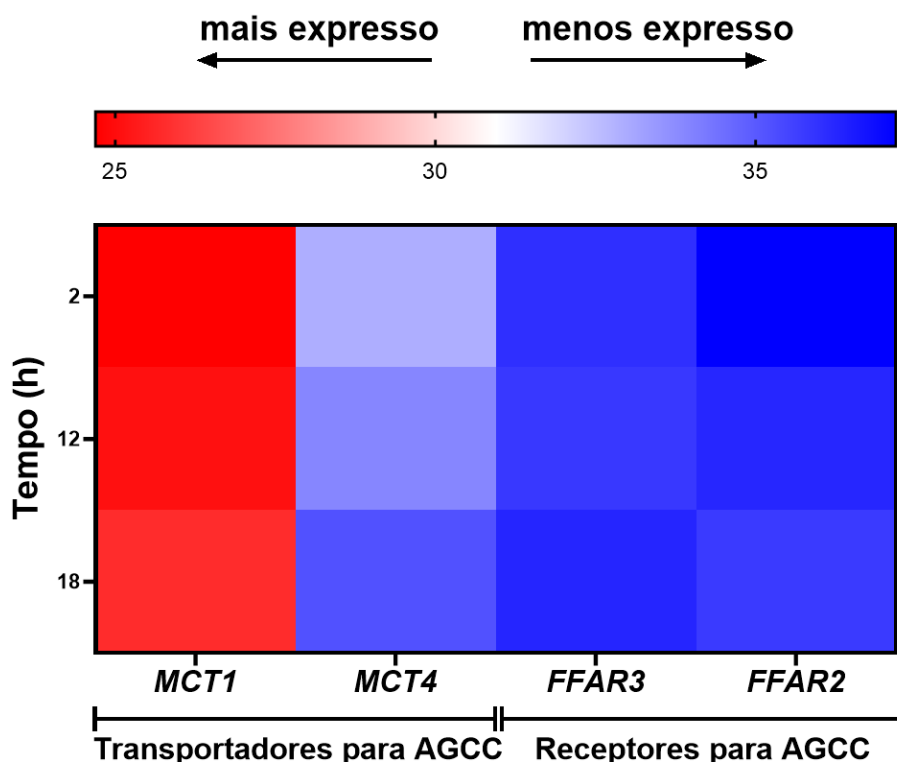
Camundongos ($n=6$) foram infectados com 10^5 UFC de *C. difficile* e pré-tratados com 150 mM propionato (Grupo Propionato + infectado) ou não tratados (Infectado). Trânsito do trato gastrointestinal total (TTGIT) em minutos (min) foi avaliado por meio do método Evans blue no dia 14 após a infecção. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM. Para análise estatística, utilizou-se o teste t de Student.

5.3 Expressão de transportadores e receptores para AGCCs em células gliais entéricas

MCT1 e MCT4 são transportadores de AGCCs. Enquanto FFAR2 (GPR43) e FFAR3 (GPR41) são receptores para AGCCs. Esses receptores podem ser ativados por AGCCs de forma independente dos transportadores (LEE *et al.*, 2024; ANG; DING, 2016). Dado que a expressão desses transportadores ou receptores pode variar de acordo com o tipo celular, avaliou-se, primeiramente, sua expressão em função do tempo de incubação em células gliais entéricas.

Conforme apresentado na figura 10, células gliais entéricas expressam todos os transportadores (*MCT1* e *MCT4*) e os receptores (*FFAR2* e *FFAR3*) de AGCCs, os quais não sofreram modificações significativas com o tempo de incubação. *MCT1* foi o mais expresso nas células gliais entéricas (Figura 10).

Figura 10 – Células gliais entéricas expressam transportadores e receptores para AGCCs



Mapa de calor dos valores de Ct (*cycle threshold*) para *MCT1*, *MCT4*, *FFAR2* e *FFAR3* em células gliais entéricas incubadas apenas com meio DMEM suplementado por 2h, 12h e 18h.

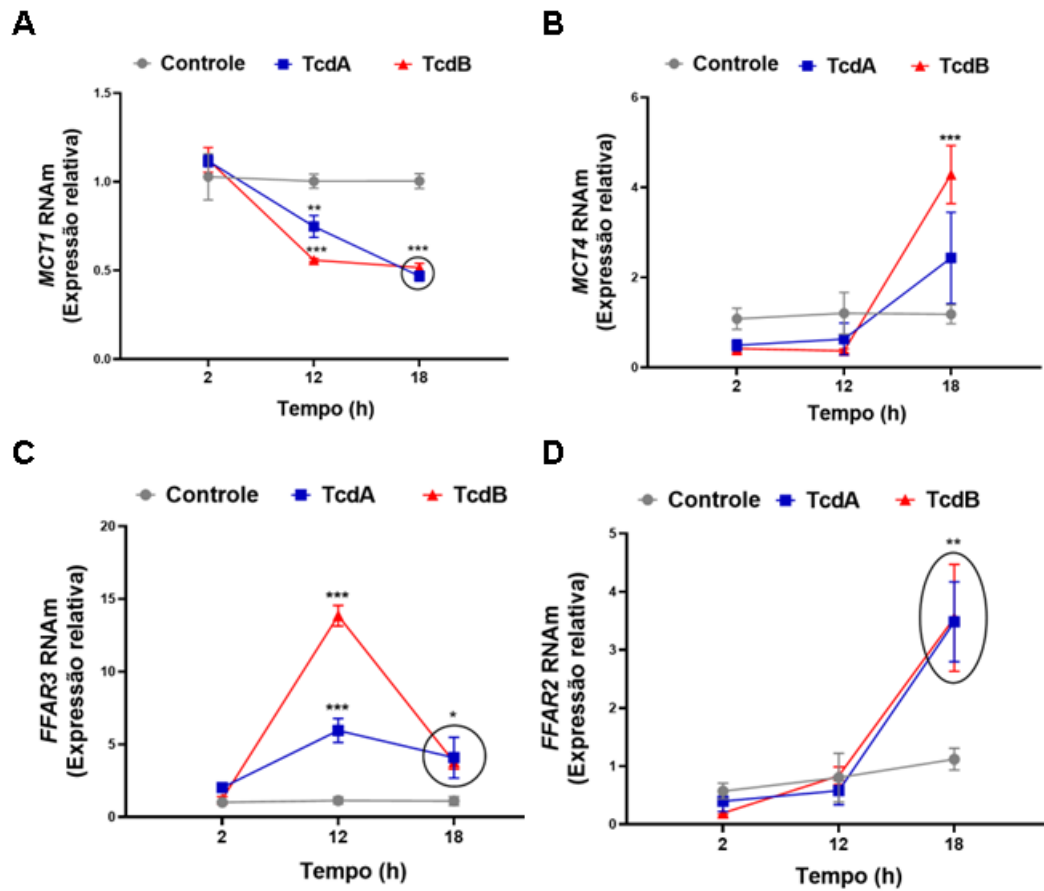
5.4 Toxinas do *C. difficile* alteram a expressão de transportadores e receptores de AGCCs em células gliais entéricas

Em seguida, investigou-se se a expressão dos transportadores (*MCT1* e *MCT4*) e dos receptores (*FFAR2* e *FFAR3*) de AGCCs em células gliais entéricas poderia ser alterada pelas toxinas do *C. difficile*.

Em relação aos transportadores, TcdA e TcdB reduziram significativamente a expressão gênica de *MCT1* em células gliais entéricas nos tempos de 12 h e 18 h de incubação (Figura 11A). Por outro lado, TcdB, mas não TcdA, aumentou a expressão de *MCT4* no tempo de 18h ($p < 0,0001$, Figura 11B).

Quanto aos receptores, TcdA ou TcdB aumentaram a expressão gênica de *FFAR3* em células gliais entéricas após 12 h de incubação ($p < 0,0001$, Figura 11C) e *FFAR2* após 18 h ($p < 0,009$, Figura 11D).

Figura 11 – Exposição às toxinas de *C. difficile* altera a expressão de transportadores e receptores de AGCCs em células gliais entéricas



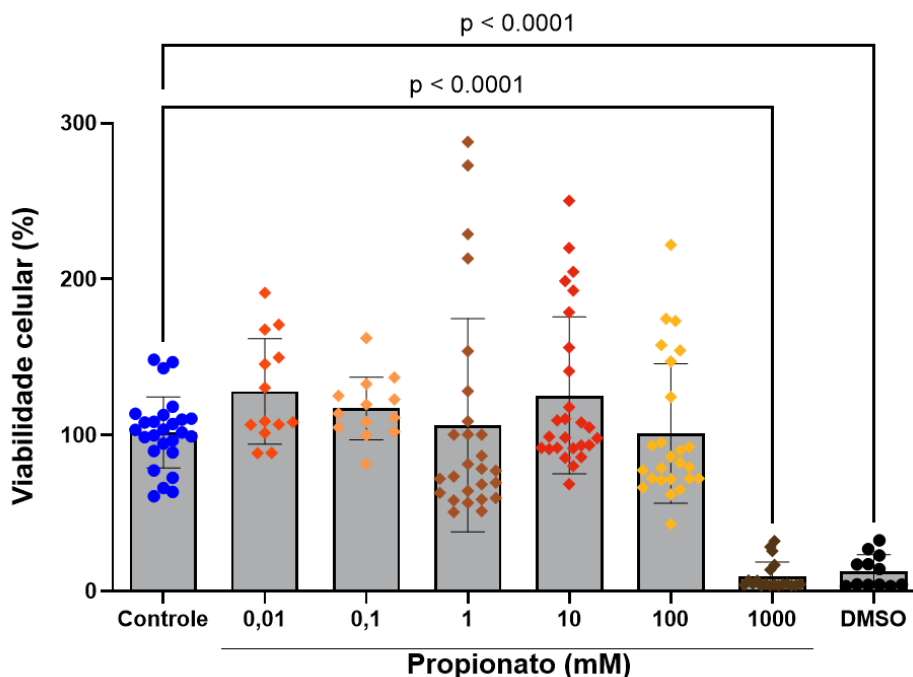
A expressão gênica de *MCT1* (A), *MCT4* (B), *FFAR3* (C) e *FFAR2* (D) foi avaliada por qPCR em células gliais entéricas desafiadas por TcdA ou TcdB por 2 h, 12 h e 18 h. O grupo controle é composto por células gliais entéricas incubadas apenas no meio de cultivo. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM (n=6). Para análise estatística foi utilizado o teste ANOVA bifatorial seguido do teste de Tukey, onde * $p < 0,05$, ** $p < 0,009$, e *** $p < 0,0001$, versus o grupo controle.

5.5 Viabilidade de células gliais entéricas expostas ao propionato *in vitro*

Dado que o propionato é um importante agonista do receptor FFAR3 (TOUGH *et al.*, 2018), investigou-se, em seguida, a contribuição do propionato para a resposta de células gliais entéricas às toxinas do *C. difficile*.

Primeiramente, avaliou-se a viabilidade de células gliais entéricas expostas a diferentes concentrações de propionato durante 24h h de incubação, por meio do ensaio de MTT. Observou-se que as concentrações de 0, 01, 0,1 1, 10 e 100 mM não alteraram a viabilidade das células gliais entéricas (Figura 12). Dessa forma, a concentração de 10 mM foi escolhida para a execução dos demais parâmetros desse estudo.

Figura 12 - Efeito do propionato na viabilidade de células gliais entéricas *in vitro*



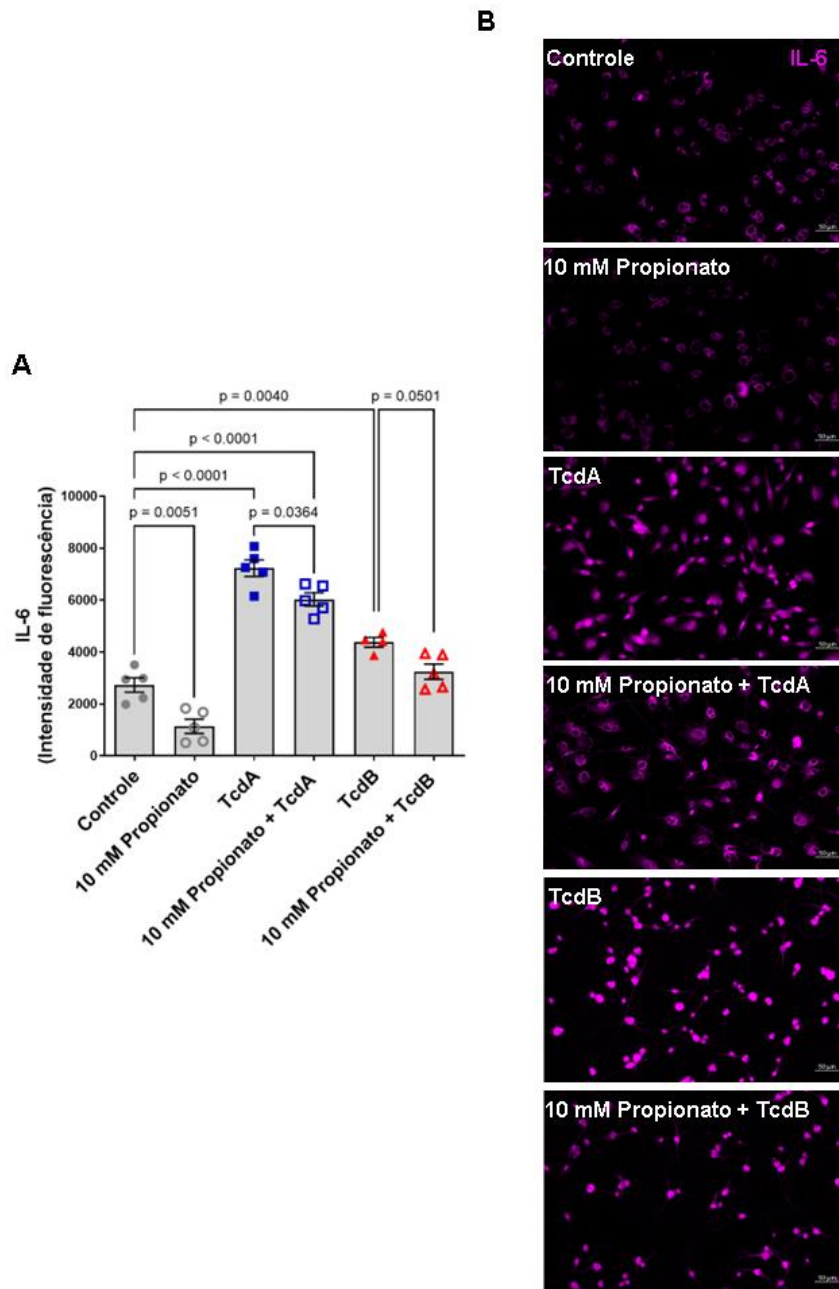
Ensaio de viabilidade celular realizado em células gliais entéricas incubadas com propionato (0,01, 0,1, 1, 10, 100, 1000 mM), apenas com meio de cultura (grupo controle) ou com DMSO (grupo controle de morte) por 24h. A viabilidade celular foi determinada por meio do ensaio de MTT. Para a análise estatística, foi utilizado o teste ANOVA unifatorial, seguido do teste de Tukey.

5.6 Contribuição do propionato na expressão de *IL-6* em células gliais entéricas desafiadas por TcdA ou TcdB

IL-6 é um importante marcador de gravidade da ICD (ABHYANKAR *et al.*, 2020) em humanos e é suprarregulada pelas toxinas do *C. difficile* em células gliais entéricas (LOUREIRO *et al.*, 2022, COSTA *et al.*, 2021). Em seguida, investigou-se a contribuição do propionato para a expressão de *IL-6* em células gliais entéricas desafiadas por TcdA ou TcdB.

A análise dos níveis proteicos (avaliado indiretamente pela intensidade de fluorescência) de *IL-6* mostrou que propionato reduz os níveis proteicos de citocina na glia entérica não desafiada pelas toxinas do *C. difficile* ($p = 0,0051$, Figura 13 A-B). Ao passo que TcdA e TcdB aumentam significativamente os níveis proteicos de *IL-6* em células gliais entéricas, o propionato diminui os níveis proteicos dessa citocina em células desafiadas com TcdA ($p = 0,03$, Figura 13 A-B).

Figura 13 – Propionato reduz os níveis proteicos de *IL-6* em células gliais entéricas desafiadas por TcdA



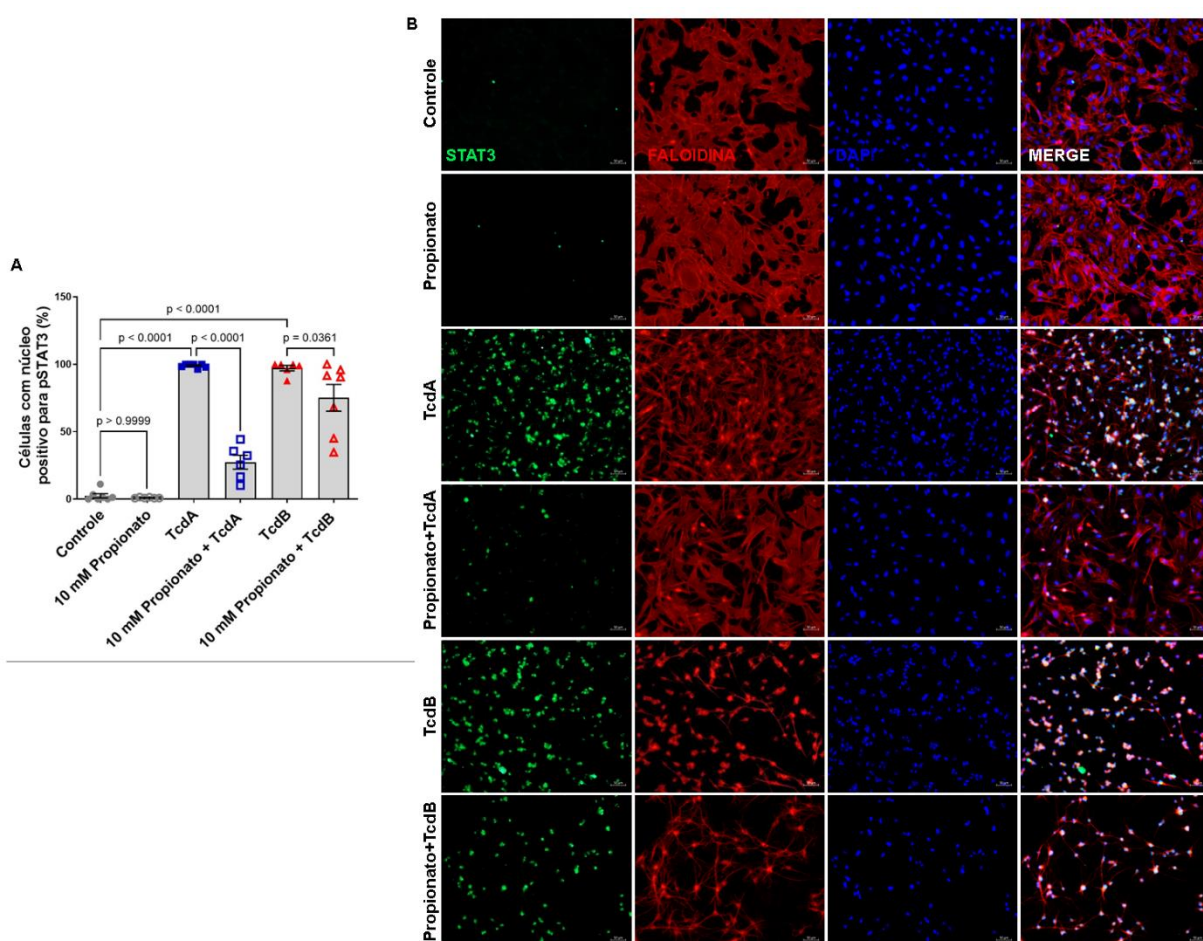
(A) Intensidade de fluorescência de IL-6 em células gliais entéricas desafiadas por TcdA ou TcdB por 18 h, na presença ou na ausência de propionato, adicionado 1 h antes do desafio. O grupo controle é composto por células gliais entéricas incubadas apenas no meio de cultivo. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM ($n=5$). Para análise estatística, utilizou-se o teste ANOVA unifatorial, seguido do teste de Tukey, no qual o nível de significância (p) é apresentado no gráfico. (B) Imagens representativas da imunomarcagem de IL-6 (em cor rosa) em células gliais entéricas, que foram incubadas com TcdA (50 ng/mL) ou TcdB (1 ng/mL) ou apenas meio de cultivo (grupo controle) por 18h na presença ou ausência de propionato (10 mM), ao qual foi adicionado uma hora antes do desafio. Barras: 50 μ m.

5.7 Contribuição do propionato na translocação nuclear de STAT3 em células gliais entéricas desafiadas por TcdA ou TcdB

Dado que IL-6 contribui para a translocação de STAT3 para o núcleo (JOHNSON; O'KEEFE; GRANDIS, 2018), verificou-se a contribuição do propionato para a translocação nuclear desse fator de transcrição em células gliais entéricas desafiadas pelas toxinas do *C. difficile*.

TcdA ou TcdB aumentaram a porcentagem de núcleos positivos para STAT3 em células gliais entéricas ($p < 0,0001$, Figura 14A-B). Ao passo que o pré-tratamento com propionato reduziu significativamente a translocação desse fator de transcrição em células gliais entéricas desafiadas pelas toxinas do *C. difficile* (Figura 14A-B).

Figura 14 – Propionato reduz a translocação nuclear de STAT3 em células gliais entéricas desafiadas por TcdA ou TcdB



(A) Porcentagem de núcleos positivos para STAT3 em células gliais entéricas desafiadas por TcdA (50 ng/mL) ou TcdB (1 ng/mL) por 18 h, na presença ou na ausência de propionato (10 mM), adicionado 1 h antes do desafio. O grupo controle são células gliais entéricas incubadas apenas com meio de cultivo. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM ($n=6-7$). Para análise estatística, utilizou-se o teste ANOVA unifatorial, seguido do teste de Tukey, no qual o valor do nível de significância (p) é representado no gráfico. (B) Imagens representativas da

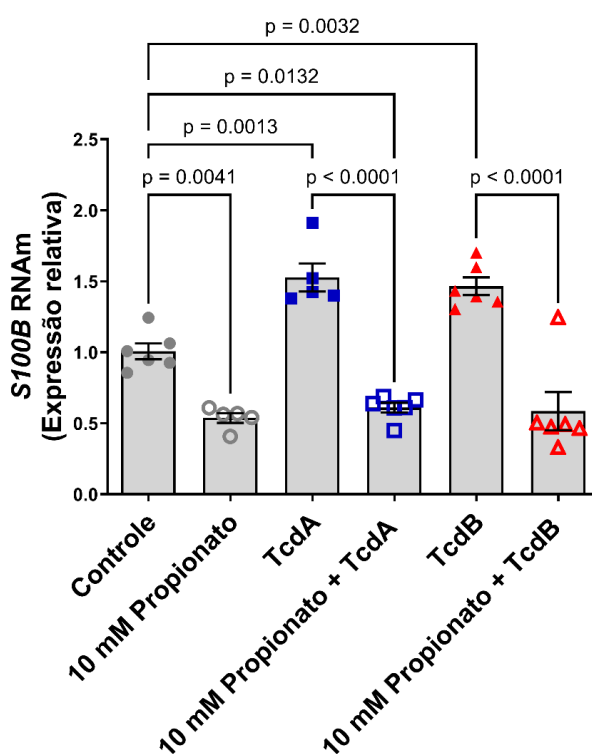
imunomarcção de STAT3 (em cor verde), faloidina (em cor vermelha) e DAPI (em cor azul) em células gliais entéricas, que foram incubadas com TcdA (50 ng/mL) or TcdB (1 ng/mL) ou apenas meio de cultivo (grupo controle) por 18h na presença ou ausência de propionato (10 mM), ao qual foi adicionado uma hora antes do desafio. Barras: 50 μ m.

5.8 Contribuição do propionato na expressão de *S100B* em células gliais entéricas desafiadas por TcdA ou TcdB

S100B atua como um mediador pró-inflamatório na fase aguda da ICD (COSTA *et al.*, 2021). Previamente, o nosso grupo de pesquisa demonstrou que as toxinas do *C. difficile* aumentam a expressão de *S100B* em células gliais entéricas (COSTA *et al.*, 2021; COSTA *et al.*, 2023). Dada a relevância desse mediador na patogênese da ICD e na resposta das células gliais entéricas às toxinas do *C. difficile*, investigou-se a contribuição do propionato para a expressão de *S100B* em células gliais entéricas desafiadas por TcdA ou TcdB.

Como apresentado na figura 15, propionato preveniu a suprarregulação de *S100B* em células gliais entéricas desafiadas pelas toxinas do *C. difficile* ($p < 0,0001$). Além disso, o propionato reduziu a expressão de *S100B* em células gliais entéricas não desafiadas pelas toxinas do *C. difficile* ($p = 0.0041$, Figura 15).

Figura 15 – Propionato reduz a expressão gênica de *S100B* em células gliais entéricas desafiadas por TcdA ou TcdB



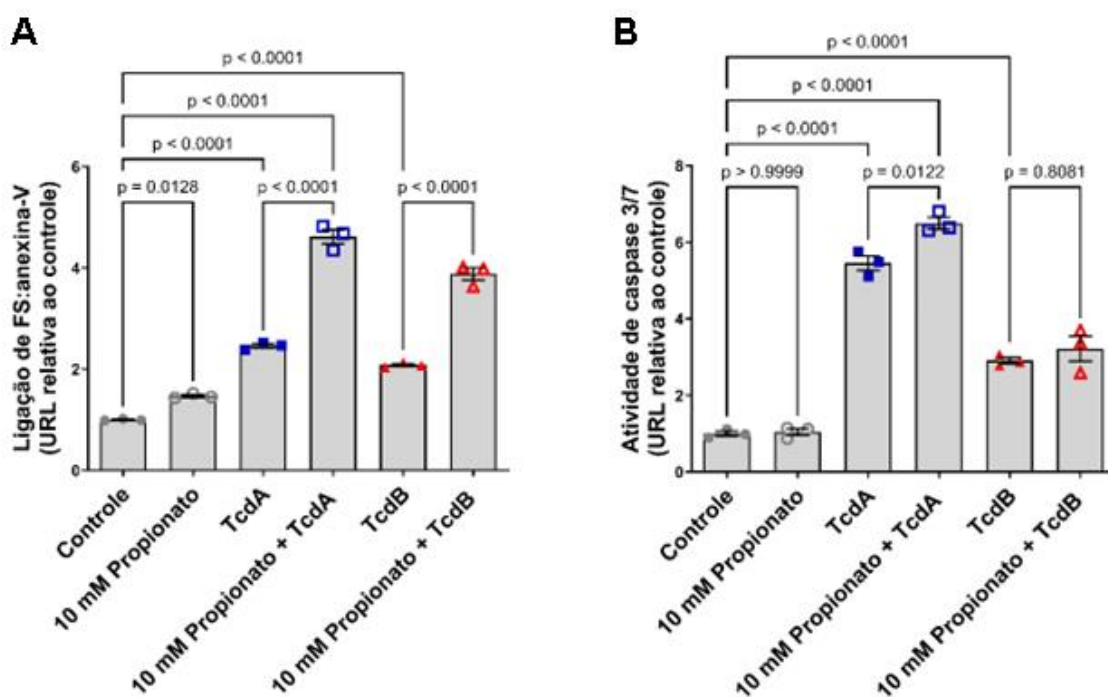
(A) Expressão gênica de *S100B* foi avaliada por qPCR em células gliais entéricas desafiadas por TcdA (50 ng/mL) ou TcdB (1 ng/mL) por 18 h, na presença ou ausência de propionato (10 mM), ao qual foi adicionado uma hora antes do desafio. O grupo controle são células gliais entéricas incubadas apenas com meio de cultivo. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM (n=5-6). Para análise estatística, utilizou-se o teste ANOVA unifatorial, seguido do teste de Tukey, no qual o valor do nível de significância (p) é representado no gráfico.

5.9 Contribuição do propionato na morte celular e atividade de caspase 3/7 em células gliais entéricas desafiadas por TcdA ou TcdB *in vitro*

As toxinas de *C. difficile* causam morte de células gliais entéricas *in vitro* (PACÍFICO *et al.*, 2025; LOUREIRO *et al.*, 2022; COSTA *et al.*, 2021) e *in vivo* (COSTA *et al.*, 2023). Um dos mecanismos envolvidos na morte celular promovida pelas toxinas do *C. difficile* é a ativação das caspases 3/7 (PACÍFICO *et al.*, 2025; LOUREIRO *et al.*, 2022; COSTA *et al.*, 2023). Dado que esses eventos fazem parte dos efeitos deletérios das toxinas nas células gliais entéricas, investigou-se se o pré-tratamento com propionato poderia reverter esse fenótipo.

De acordo com a figura 16, o pré-tratamento com propionato potencializou a morte celular induzida por TcdA ou TcdB em células gliais entéricas ($p < 0,0001$). Além disso, o propionato também aumentou a atividade de caspase 3/7 induzida por TcdA ($p = 0,0122$).

Figura 16 – Efeito do propionato na ligação fosfatidilserina-anexina V e atividade da caspase 3/7 induzidas por toxinas de *C. difficile* em células gliais entéricas



(A) A ligação fosfatidilserina-anexina V em células gliais entéricas desafiadas por TcdA (50 ng/mL) e TcdB (1 ng/mL), previamente incubadas ou não com propionato (10 mM), por 18h. (B) A atividade de caspase 3/7 em

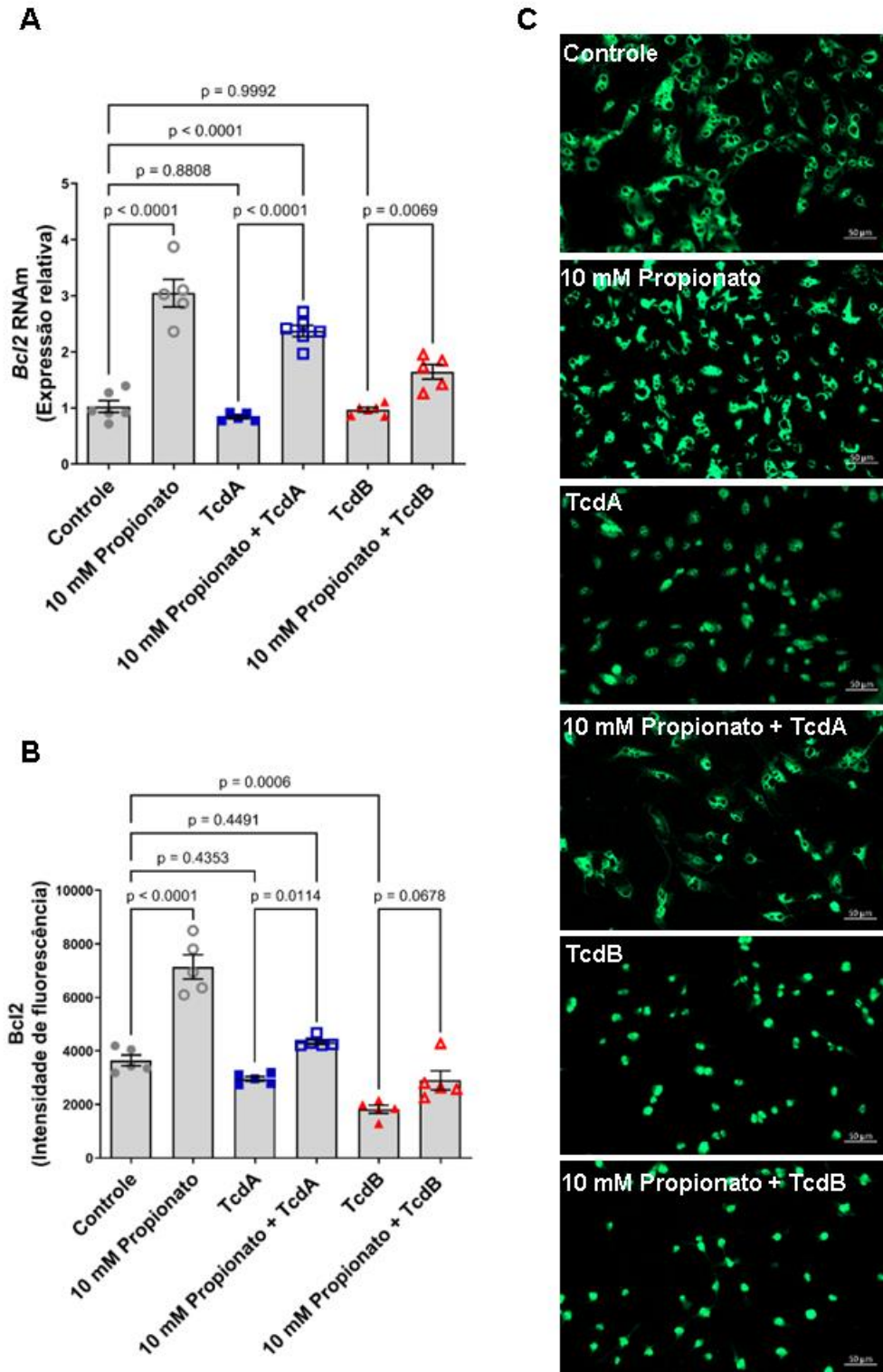
células gliais entéricas desafiadas por TcdA e TcdB, previamente incubadas ou não com propionato, por 18h. O grupo controle são células gliais entéricas incubadas apenas com meio de cultivo. Para análise estatística foi utilizado o teste ANOVA unidirecional seguido do teste de Tukey, onde o valor de p encontra-se representado no gráfico.

5.10 Efeito do propionato na atividade de Bcl2 em células gliais entéricas desafiadas por TcdA e TcdB

A proteína Bcl2 regula a morte celular por apoptose, atuando como fator antiapoptótico (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). Para melhor entendermos se o propionato, em células gliais entéricas desafiadas pelas toxinas do *C. difficile*, exerce função apoptótica via regulação da expressão gênica de *Bcl2*, foi realizada a avaliação da expressão relativa desse gene. Além disso, validaram-se os achados de expressão gênica pelo ensaio de imunofluorescência de Bcl2.

De acordo com a figura 17, o propionato, sozinho, aumentou significativamente a atividade de Bcl2, tanto na expressão gênica quanto nos níveis proteicos (representados pela intensidade de fluorescência), em comparação ao grupo controle ($p < 0,0001$, Figura 17A-B). O propionato também aumentou significativamente a expressão gênica de *Bcl2* em células gliais entéricas desafiadas por TcdA ($p < 0,0001$, Figura 17A-B) ou TcdB ($p = 0,0069$, Figura 17A-B). Enquanto o propionato aumentou os níveis proteicos de Bcl2 apenas em células desafiadas por TcdA ($p = 0,0114$, Figura 17A-B).

Figura 17 – Efeito do propionato na atividade de Bcl2 em células gliais entéricas desafiadas por TcdA e TcdB



(A) Expressão gênica de *Bcl2* foi avaliada por qPCR em células gliais entéricas desafiadas por TcdA (50 ng/mL) ou TcdB (1 ng/mL) por 18 h, na presença ou ausência de propionato (10 mM), ao qual foi adicionado uma hora antes do desafio. O grupo controle são células gliais entéricas incubadas apenas com meio de cultivo. Os dados são apresentados como média $\pm$ EPM (n=5-6). (B) Intensidade de fluorescência de Bcl2 em células gliais entéricas desafiadas por TcdA ou TcdB por 18 h, na presença ou na ausência de propionato, adicionado 1 h antes do desafio. O grupo controle são células gliais entéricas incubadas apenas com meio de cultivo. Os dados são apresentados

como média $\pm$ EPM (n=5). (A-B) Para análise estatística, utilizou-se o teste ANOVA unifatorial, seguido do teste de Tukey, no qual o valor do nível de significância (p) é representado no gráfico. (C) Imagens representativas da imunomarcagem de Bcl2 (em cor verde) em células gliais entéricas, que foram incubadas com TcdA or TcdB ou apenas meio de cultivo (grupo controle) por 18h na presença ou ausência de propionato, ao qual foi adicionado uma hora antes do desafio. Barras: 50 μ m.

6 DISCUSSÃO

Nossos achados no modelo de ICD em camundongos mostram que o pré-tratamento com propionato diminui a perda de peso corporal e previne o desenvolvimento de diarreia grave na fase aguda da doença, além de reduzir a colonização por *C. difficile* após a fase aguda, melhorando a sobrevivência e reduzindo o atraso do trânsito gastrointestinal após a infecção. No nosso *modelo in vitro* de intoxicação de células gliais entéricas, que expressam transportadores (*MCT1* e *MCT4*) e receptores (*FFAR2* e *FFAR3*) para AGCCs (como o propionato), com TcdA ou TcdB revelou-se que essas toxinas diminuem a expressão gênica de *MCT1* e aumentam a de *MCT4*, *FFAR2* e *FFAR3*. Adicionalmente, suplementação com propionato modula a resposta pró-inflamatória (diminuindo o componente pró-inflamatório da sinalização de IL-6/STAT3 e diminuindo a expressão de S100B), e aumenta a expressão de Bcl2, mas não previne a morte celular, de células gliais entéricas desafiadas por TcdA ou TcdB.

No estudo *in vivo*, a dose de propionato ofertada aos animais foi de 150mM. Tal intervenção foi reproduzida em outros modelos murinos/rato prévios que também utilizaram 150mM de propionato na água de beber ou via gavagem, com o objetivo de investigar possíveis efeitos imunometabólicos e neuroprotetores desse AGCC (CHANDRA; POPOVIC; SINGHAL; WATKINS *et al.*, 2025) (HAGHIKIA *et al.*, 2021; GRÜTER *et al.*, 2023; RAMESH *et al.*, 2023). No contexto da ICD, essa dose também foi aplicada (FACHI; DE OLIVEIRA; TRSAN; PENATI *et al.*, 2025) em estudos limitados à fase aguda da doença. A concentração final de propionato utilizada nas análises *in vitro* com células gliais entéricas desafiadas por toxinas do *C. difficile* foi de 10 mM. Estudos prévios utilizaram a mesma concentração final, como o modelo que analisou o propionato e butirato na modificação direta da cromatina de células de câncer colorretal em camundongos (NSHANIAN *et al.*, 2025), a avaliação *in vitro* do impacto do propionato na eficácia da imunoterapia em células humanas de câncer colorretal (WANG, HU, 2025) e a investigação da parada do ciclo celular e apoptose em células humanas de câncer de pulmão tratadas com propionato (KIM *et al.*, 2019).

Em humanos saudáveis, as concentrações séricas de propionato variam entre 150 e 170 nmol/mL (equivalentes a 0,15 a 0,17 mM, respectivamente) (TREND; LEFFLER; JONES;

CHA *et al.*, 2021) e no lúmen do intestino grosso de 14,2 mM a 26,7 mM/kg de fezes (CUMMINGS; POMARE; BRANCH; NAYLOR *et al.*, 1987). As concentrações de propionato no sangue são extremamente baixas, pois cerca de 80-95% são metabolizados pelo fígado na primeira passagem (ALBERTS *et al.*, 1996; CUMMINGS *et al.*, 1987; MARTIN-GALLAUSIAUX *et al.*, 2021; LANGE *et al.*, 2023). No lúmen intestinal proximal, há predomínio da fermentação de fibras por bactérias, por isso, os AGCCs estão elevados. À medida que avançam em direção ao cólon distal, os níveis de AGCCs diminuem. A concentração de AGCCs nas fezes depende da dieta, mas costuma seguir a proporção de 60:20:20 entre acetato, propionato e butirato, respectivamente (CUMMINGS *et al.*, 1987; BOETS *et al.*, 2025; DEN BESTEN *et al.*, 2013).

No presente estudo, o pré-tratamento com propionato melhorou a sobrevivência, diminuiu a perda do peso corporal e reduziu a gravidade da diarreia na fase aguda da ICD em camundongos. Em contraste, Ciarlo *et al.* (2016) demonstraram que o pré-tratamento com propionato (200 mM) não alterou parâmetros de morbidade ou mortalidade em modelos de infecção induzidos por bactérias gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*), bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*) e *Candida albicans*, apesar de, *in vitro*, atenuar a resposta de macrófagos derivados da medula óssea à estimulação microbiana, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias. A suplementação com dieta rica em fibras, fonte de AGCCs (como o propionato), mostrou reduzir a mortalidade por ICD em modelos pré-clínicos em camundongos (APGAR; WALL; MIDURA-KIELA; NEFF *et al.*, 2026; FACHI; DE OLIVEIRA; TRSAN; PENATI *et al.*, 2025). De forma semelhante aos nossos achados, estudo prévio mostrou que o uso de propionato (150 mM) como pré-tratamento de camundongos com ICD diminui a gravidade da doença e a perda de peso (FACHI; DE OLIVEIRA; TRSAN; PENATI *et al.*, 2025). Esses achados sugerem que o desfecho do uso do propionato como pré-tratamento em infecções entéricas depende do patógeno e da dose utilizada.

De forma inédita, mostramos que o pré-tratamento com propionato em camundongos infectados por *C. difficile* reduz a disfunção do trato gastrointestinal e diminui o fenótipo de constipação no dia 14. Em um modelo pré-clínico de depleção da microbiota intestinal induzida por antibióticos, a suplementação com AGCCs (incluindo 25,9 mM de propionato) não restaura as alterações na motilidade intestinal induzidas pelo antibiótico (VICENTINI; KEENAN; WALLACE; WOODS *et al.*, 2021). Estudo prévio utilizando o ensaio de expulsão de *bead* de vidro avaliou a motilidade colônica em camundongos saudáveis, e evidenciou que

suplementação aguda de AGCCs via enema causa retardo na motilidade colônica por ativar neurônios mioentéricos (WONGKRASANT; WALLACE; LE; MACNAUGHTON *et al.*, 2026). A inibição da motilidade intestinal por propionato (10 mM) também foi observada em camundongos livres de germes (VINCENT; WANG; PARSONS; KHAN *et al.*, 2018) e em porcos da Índia. Dado que o propionato pode ter efeito contrário ao observado no nosso estudo, é possível que o seu efeito benéfico na redução da disfunção da motilidade do trato gastrointestinal ocorra de forma indireta como redução da inflamação ou da carga de bactérias, o que requer mais investigações.

A célula glial entérica desempenha um papel importante na regulação da motilidade intestinal e da resposta inflamatória (GRUBIŠIĆ; VERKHRATSKY; ZOREC; PARPURA, 2018). Estudos recentes demonstram que o S100B, derivado de células gliais, regula a excitabilidade neuronal e a conectividade funcional em circuitos colinérgicos, sendo essencial para a geração e manutenção da função motora rítmica do intestino (THOMASI *et al.*, 2025). Além disso, em condições patológicas, como a inflamação intestinal, essas células assumem um fenótipo reativo, alterando a sinalização neuroglial e contribuindo para distúrbios da motilidade (GRUBISIC *et al.*, 2018). Além disso, as células gliais entéricas são suscetíveis às toxinas do *C. difficile*, causando morte celular e resposta pro-inflamatória (COSTA; MOURA-NETO; BOLICK; GUERRANT *et al.*, 2021; COSTA; SHIN; GOLDBECK; BOLICK *et al.*, 2022; FETTUCCIARI; PONSINI; GIOè; MACCHIONI *et al.*, 2017; LOUREIRO; MOURA-NETO; MARTINS; SILVA *et al.*, 2022; MACCHIONI; DAVIDESCU; FETTUCCIARI; PETRICCIUOLO *et al.*, 2017; PACIFICO; COSTA; LIMA BARBOSA; REBOUCAS *et al.*, 2025; SOUSA; LOUREIRO; LEITAO; WARREN *et al.*, 2025).

Os nossos achados também revelaram que as células gliais entéricas expressam transportadores e receptores de AGCCs, sendo o MCT1 o transportador mais expresso. Dentre os receptores, o *FFAR3* foi o mais expresso nas células gliais entéricas. Em concordância com este achado, um estudo prévio relatou a expressão de MCT1 e *FFAR3* em células gliais entéricas obtidas por meio de cultura primária do SNE de rato (COSSAIS *et al.*, 2016). Um estudo que investigou a expressão dos receptores *FFAR3* e *FFAR2* no trato gastrointestinal, utilizando camundongos transgênicos que expressavam a proteína fluorescente vermelha monomérica (mRFP), identificou o *FFAR3* em células enteroendócrinas e em neurônios dos gânglios submucosos e mioentéricos (NØHR *et al.*, 2013). *FFAR3* também foi identificado em neurônios colinérgicos do plexo mioentérico de ratos (CAETANO; MAGALHAES; DUARTE; CONCEICAO *et al.*, 2023). Enquanto o *FFAR2* foi identificado em leucócitos da lâmina

própria intestinal (NØHR *et al.*, 2013). Estudo prévio não identificou FFAR3 em células gliais entéricas expressando GFAP (CAETANO; MAGALHAES; DUARTE; CONCEICAO *et al.*, 2023), no entanto, mais investigações em outros tipos de células gliais, como células expressando S100B, SOX10 ou PLP1, são necessárias para confirmar que essas células de fato não expressam esse receptor.

Os MCTs podem ser expressos em várias células, uma vez que não estão envolvidos apenas no transporte de AGCCs, mas também de lactato, piruvato, corpos cetônicos e, até mesmo, de fármacos monocarboxilatos, sendo cruciais para o equilíbrio hormonal, lipídico e glicêmico (FELMLEE *et al.*, 2020). Diferentemente, FFAR3 e FFAR2 são receptores acoplados à proteína G, especializados para AGCCs, sendo o acetato exibindo maior preferência por FFAR2 e, propionato apresentando maior afinidade por FFAR3 (LE PAUL, 2003; BROWN *et al.*, 2003).

Adicionalmente, o presente estudo mostrou que a exposição às toxinas de *C. difficile* reduziu a expressão de *MCT1* e aumentou a de *MCT4* nas células gliais entéricas. Embora o papel desses transportadores na ICD não esteja bem documentado, no contexto da colite ulcerativa não infecciosa, a inflamação intestinal regula negativamente a expressão de *MCT1* (ERDMANN *et al.*, 2019; THIBAUT *et al.*, 2007). Por outro lado, a expressão de *MCT4* aumenta na mucosa inflamada do cólon de pacientes com doença inflamatória intestinal (DII) (HE *et al.*, 2018).

As toxinas do *C. difficile* também aumentaram a expressão de *FFAR3* e de *FFAR2* nas células gliais entéricas. O aumento de células positivas para FFAR3 também foi observado no cólon distal de camundongos submetidos ao modelo de colite induzida por DSS (dextran sulfate sodium) (SALAGA *et al.*, 2021). Em modelo pré-clínico de ICD em camundongos, a perda de FFAR2 impediu que a dieta rica em fibras ou suplementação com AGCCs produzisse efeitos benéficos no desfecho clínico e na redução da resposta pró-inflamatória (FACHI; DE OLIVEIRA; TRSAN; PENATI *et al.*, 2025; FACHI; SECCA; RODRIGUES; MATO *et al.*, 2020). A ativação dos receptores de AGCCs promove a sinalização da proteína quinase e a rápida produção de citocinas e quimiocinas, mediando a imunidade e a inflamação em camundongos (KIM *et al.*, 2013). Enquanto a internalização desses ácidos graxos via transportadores permite efeitos imunológicos, incluindo supressão da colite e câncer de cólon (SIVAPRAKASAM *et al.*, 2017; GURAV *et al.*, 2015). O papel desses transportadores e receptores nas células da glia entérica durante a ICD precisa ser elucidado em investigações futuras.

A presença desses transportadores e receptores de AGCC permite que a célula glial entérica responda ao butirato, ao acetato e ao propionato. Durante a ICD, os níveis de butirato, acetato e propionato encontram-se reduzidos no lúmen intestinal (SAYOL-ALTARRIBA *et al.*, 2024). Estudo prévio do nosso grupo de pesquisa mostrou que a suplementação com butirato em baixa concentração reduz a morte de células gliais entéricas induzida pelas toxinas do *C. difficile* (SOUSA *et al.*, 2025). Até o presente estudo, os benefícios do propionato na resposta dessas células às toxinas do *C. difficile* eram desconhecidos.

Estudos do nosso grupo de pesquisa mostraram que as toxinas do *C. difficile* aumentam a expressão de IL-6 em células gliais entéricas (SOUSA *et al.*, 2025; BARBOSA *et al.*, 2025; COSTA *et al.*, 2023). No presente estudo, evidenciou-se que o pré-tratamento com propionato reduziu os níveis proteicos de IL-6 em células gliais entéricas expostas às toxinas de *C. difficile*. Em macrófagos humanos incubados com lipopolissacarídeo (LPS), a suplementação com propionato reduziu interleucinas pró-inflamatórias, dentre elas IL-6, e suprimiu a transcrição de IL-10 por meio da inibição de HDAC (histona desacetilase), removendo assim a regulação negativa do inflamassoma NLRP3 (proteína 3 contendo domínio NOD, LRR e pirina) que, por sua vez, aumentou a liberação de IL-1 β (WANG *et al.*, 2024). IL-6 é uma citocina pleiotrópica, portanto, exercendo efeitos pró-inflamatórios ou anti-inflamatórios a depender do contexto estimulatório (GARCIA-JUAREZ *et al.*, 2022; LUO *et al.*, 2016). Dado que IL-6 está associada à gravidade da ICD e à mortalidade após a infecção, o aumento da expressão de IL-6 pelas toxinas de *C. difficile* sugere papel inicial pró-inflamatório (ABHYANKAR *et al.*, 2020; YU *et al.*, 2017).

O mecanismo pelo qual o propionato reduz a expressão proteica de IL-6 em células gliais entéricas ainda não está completamente elucidado. No entanto, pode envolver mecanismos pós-transcricionais. O aumento da acetilação das histonas e a inibição das enzimas desacetilases (HDAC) pelos AGCCs, somados a alterações em fatores de transcrição, podem desregular a estabilidade do RNA, a tradução, a secreção ou a degradação proteica, alterando assim a transcrição de muitos genes pró-inflamatórios (ZOU *et al.*, 2021; TORUN *et al.*, 2019; CHANG *et al.*, 2014).

No presente estudo, a suplementação com propionato reduziu a translocação nuclear de STAT3 em células gliais entéricas expostas às toxinas do *C. difficile*. De forma similar, em um estudo *in vitro* com células T CD4 positivas, a incubação com propionato também reduziu a ativação de STAT3 (HAN; MEADOWS; RODMAN; RUSSO *et al.*, 2024). Em modelo pré-clínico de colite induzida por DSS em camundongos, suplementação com propionato também

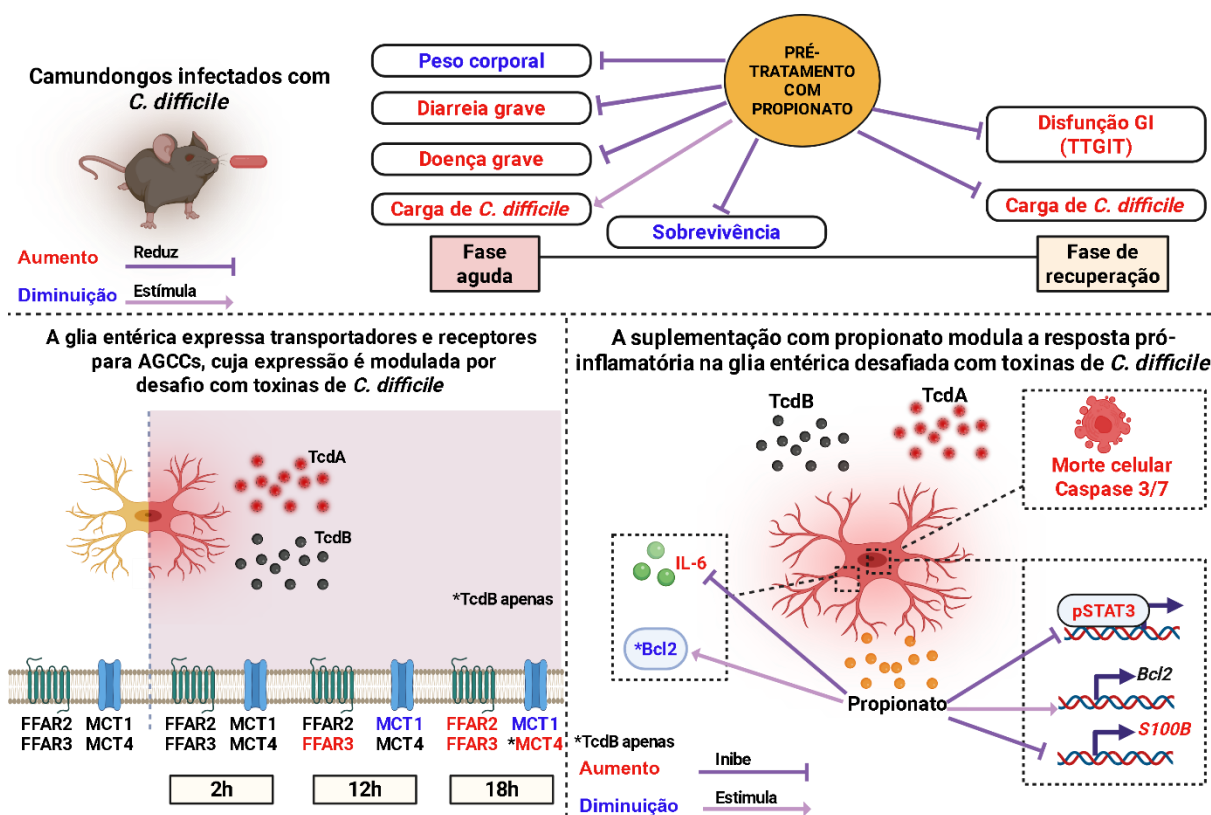
diminuiu a ativação de STAT3 no cólon (TONG; WANG; WANG; LIU *et al.*, 2016). IL-6 pode se ligar ao seu receptor IL-6R e ativar a glicoproteína 130 na membrana celular, promovendo a fosforilação de STAT3 e, conseqüentemente, sua translocação para o núcleo, onde estimula a expressão gênica de diversos genes, como *Bcl2*, *MCL-1*, *Cyclin D1*, *VEGF*, *Integrina β 6* e *HIF-1 α* (LIN *et al.*, 2020). O componente pró-inflamatório da sinalização de IL-6, quando se liga à forma solúvel do receptor sIL-6R, pode ativar STAT3 e estimular a expressão gênica de IL-6 (HU; SUI; JIN; SHAN *et al.*, 2024; WANG; VAN BOXEL-DEZAIRE; CHEON; YANG *et al.*, 2013). Dessa forma, a ativação de STAT3, pode desempenhar um papel dual: regulando positivamente genes antioxidantes, antiapoptóticos e pró-angiogênicos, mas também suprimindo genes anti-inflamatórios e antifibróticos (HARHOUS *et al.*, 2019).

No presente estudo, o pré-tratamento com propionato potencializou a morte celular de células gliais entéricas desafiadas por toxinas de *C. difficile*, embora tenha aumentado a expressão do fator antiapoptótico Bcl2. Isso pode refletir uma resposta compensatória ao estresse induzido pelas toxinas, na qual a regulação positiva de Bcl2 não é suficiente para mitigar morte celular. Além disso, estudos mostram que o propionato pode induzir apoptose por vias alternativas, incluindo estresse oxidativo, mitofagia e ferroptose, sugerindo que a morte celular também pode ocorrer por mecanismos independentes da regulação de Bcl2 (WEI *et al.*, 2024; FILIPPONE *et al.*, 2022; TANG *et al.*, 2011). Aqui, apenas foi explorado o mecanismo de morte celular por apoptose. No entanto, as toxinas do *C. difficile* podem promover outros tipos de morte celular além da apoptose, como a necrose de células epiteliais, a piroptose em células imunes e a autofagia em colonócitos (KORDUS *et al.*, 2022; CHUMBLER *et al.*, 2012; CHAN *et al.*, 2018).

Outro achado importante desse estudo é que o pré-tratamento com propionato reduziu a expressão gênica de S100B em células gliais entéricas desafiadas com TcdA ou TcdB. A capacidade dos AGCCs de reduzir a expressão de S100B foi previamente demonstrada em camundongos submetidos ao modelo experimental de esclerose múltipla e suplementados com AGCCs na água de beber (LIN *et al.*, 2024). Estudo prévio do nosso grupo de pesquisa mostrou que S100B contribui para a patogênese da ICD, amplificando a resposta inflamatória na fase aguda da doença (COSTA *et al.*, 2021). Dessa forma, é possível que os benefícios da suplementação com propionato na ICD sejam, em parte, mediados pelo seu efeito negativo sobre a expressão de S100B. No entanto, são necessários mais estudos para compreendermos melhor se os mecanismos de proteção mediados pelo propionato são dependentes ou independentes de S100B.

Em resumo (Figura 18), os nossos achados sugerem que o pré-tratamento com propionato é eficaz para melhorar a sobrevivência e reduzir a disfunção do trato gastrointestinal em camundongos infectados por *C. difficile*. *In vitro*, células gliais entéricas expressam transportadores e receptores para AGCC, os quais são modulados pela exposição às toxinas do *C. difficile*. Além disso, a suplementação com propionato modula a resposta de células gliais entéricas às toxinas do *C. difficile*, diminuindo vias de sinalização pró-inflamatórias, como as vias IL-6/STAT3 e S100B.

Figura 18 – Sumário dos achados desse estudo



Resumo da contribuição do pré-tratamento com propionato na prevenção de complicações gastrointestinais pós-infecção por *Clostridioides difficile* (ICD) e danos às células gliais entéricas promovidos pelas toxinas de *C. difficile*. Em um modelo pré-clínico de ICD (imagem superior), o pré-tratamento com propionato diminuiu a gravidade da doença, melhorou a sobrevivência e, após a fase aguda, reduziu a colonização por *C. difficile* e diminuiu o retardo do trânsito do trato GI total (TTGIT). *In vitro*, as células gliais entéricas expressam transportadores e receptores para AGCC, que são modificados pela exposição às toxinas de *C. difficile* (imagem inferior esquerda). Nas células gliais entéricas, TcdA ou TcdB promovem a morte celular, aumentam a expressão de mediadores pró-inflamatórios (IL-6 e S100B) e a translocação nuclear de STAT3 (imagem inferior direita). Por outro lado, a suplementação com propionato reduz a sinalização de IL-6/STAT3, aumenta a expressão do gene Bcl2 e diminui a expressão do gene S100B em células gliais entéricas expostas às toxinas de *C. difficile* (imagem inferior direita).

7 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que o pré-tratamento com propionato atenua a gravidade da ICD e reduz a disfunção gastrointestinal em camundongos infectados, evidenciando um potencial efeito protetor desse AGCC na fisiopatologia da doença.

Além disso, foi mostrado que células gliais entéricas expressam os transportadores de AGCCs MCT1 e MCT4, bem como os receptores FFAR2 e FFAR3, sendo MCT1 o transportador mais expresso. As toxinas de *C. difficile* modulam a expressão gênica de transportadores e receptores para AGCCs na glia entérica, reduzindo a expressão de *MCT1* e aumentando a expressão de *MCT4* (apenas em células desafiadas com TcdB), *FFAR2* e *FFAR3*.

No contexto inflamatório, o propionato reduziu os níveis proteicos de IL-6 na glia entérica desafiada com TcdA. Adicionalmente, o propionato reduziu a expressão de *S100B* e diminuiu a translocação nuclear de STAT3 na glia entérica exposta a TcdA ou TcdB, indicando interferência em vias associadas à sinalização pró-inflamatória.

Em relação à morte celular, embora o propionato tenha promovido aumento da expressão do fator antiapoptótico Bcl2 em células expostas às toxinas de *C. difficile*, esse efeito não foi suficiente para proteger as células gliais entéricas contra a morte celular ou ativação de caspase 3/7 induzida por TcdA ou TcdB.

Em conjunto, os resultados deste estudo mostram que o propionato previne a disfunção do trato gastrointestinal após ICD em modelo pré-clínico, mostrando ser um potente candidato para prevenir sequelas após infecção por esse patógeno a ser validado em humanos. Os achados desse estudo também evidenciaram que o propionato modula a resposta pró-inflamatória da glia entérica desafiada pelas toxinas do *C. difficile*.

As limitações deste estudo incluem: a falta de avaliação da densidade de neurônios e de glia entérica em animais infectados, tratados ou não tratados com propionato no dia 21 após a infecção, bem como a mensuração da expressão de IL-6, S100B e STAT3 na fase aguda (dia 3 após a infecção) da ICD em animais infectados, tratados ou não tratados com propionato. Além disso, foram avaliados apenas alguns mediadores inflamatórios e vias de sinalização, o que não abrange outros mecanismos potencialmente envolvidos na ação do propionato sobre a glia entérica in vitro.

Futuras investigações no modelo de ICD são fundamentais para desvendar os mecanismos subjacentes ao pré-tratamento com propionato na melhora da disfunção do trato

gastrointestinal. Adicionalmente, a eficácia do uso de propionato em animais infectados com diarreia, tratados ou não com antibióticos eficazes contra *C. difficile*, precisa ser avaliada para a translação desses achados para pesquisas em humanos.

Adicionalmente, são necessários estudos para melhor entender a dinâmica da via de IL-6/STAT3 pró-inflamatória versus anti-inflamatória na modulação propiciada pelo propionato na resposta de células gliais entéricas às toxinas do *C. difficile*.

REFERÊNCIAS

ABHYANKAR, M. M. *et al.* Immune profiling to predict outcome of *Clostridioides difficile* infection. **mBio**, v. 11, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1128/mbio.00905-20>.

ABT, M. C.; MCKENNEY, P. T.; PAMER, E. G.. *Clostridium difficile* colitis: pathogenesis and host defence. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 10, p. 609-620, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.108>.

AHMADZAI, M. M.; SEGUELLA, L.; GULBRANSEN, B. D. Circuit-specific enteric glia regulate intestinal motor neurocircuits. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 118, n. 40, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.2025938118>.

AKORFUL, R. A. A. *et al.* The Global Burden of *Clostridioides difficile* Infections, 2016-2024: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Infectious Disease Reports**, v. 17, n. 2, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/idr17020031>.

ALAM, M. Z.; MADAN, R. *Clostridioides difficile* Toxins: Host Cell Interactions and Their Role in Disease Pathogenesis. **Toxins**, v. 16, n. 6, 241, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins16060241>.

ALBERTS, D. S. *et al.* Disposition and metabolism of topically administered alpha-tocopherol acetate: a common ingredient of commercially available sunscreens and cosmetics. **Nutrition and Cancer**, v. 26, n. 2, p. 193-201, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1080/01635589609514475>.

ANG, Z.; DING, J. L. GPR41 and GPR43 in Obesity and Inflammation - Protective or Causative? **Frontiers in Immunology**, 7, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00028>.

BARBOSA, M. L. L. *et al.* Role of TLR4 in enteric glia response to *Clostridioides difficile* toxins: insights from in vivo and in vitro studies. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 29, n. 22, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1111/jcmm.70943>.

BLAAK, E. E. *et al.* Short chain fatty acids in human gut and metabolic health. **Beneficial Microbes**, v. 11, n. 5, p. 411-455, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3920/BM2020.0057>.

BOESMANS, W. *et al.* Development, Diversity, and Neurogenic Capacity of Enteric Glia. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, 775102, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.775102>.

BOETS, E. *et al.* Quantification of in vivo colonic short chain fatty acid production from inulin. **Nutrients**, v. 7, n. 11, p. 8916-8929, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu7115440>.

BRAGA, D. S. *et al.* Incidence of healthcare-associated *Clostridioides difficile* infection in a quaternary referral university hospital in Brazil. **Anaerobe**, v. 79, 102672, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2022.102672>.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 2023. **Emerging Infections Program. Healthcare-Associated Infections - Community Interface Surveillance Report, Clostridioides difficile infection (CDI)**, v. 2021, 2023.

CHAN, H. *et al.* *Clostridium difficile* toxin B induces autophagic cell death in colonocytes. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 22, n. 4, p. 2469-2477, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/jcmm.13555>.

CHANDRA, S. *et al.* The gut microbiome controls reactive astrogliosis during A β amyloidosis via propionate-mediated regulation of IL-17. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 135, n. 13, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI180826>.

CHANDRASEKARAN, R.; LACY, D. B. The role of toxins in *Clostridium difficile* infection. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 6, p. 723-750, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsre/fux048>.

CHANG, P. V. *et al.* The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 6, p. 2247-2252, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1322269111>.

CHEN, X. *et al.* A mouse model of *Clostridium difficile*-associated disease. **Gastroenterology**, v. 135, n. 6, p. 1984-1992, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.09.002>.

CHILDRESS, K. O. *et al.* Nectin-3 and shed forms of CSPG4 can serve as epithelial cell receptors for *Clostridioides difficile* TcdB. **mBio**, v. 14, n. 5, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1128/mbio.01857-23>.

CHUMBLER, N. M. *et al.* *Clostridium difficile* toxin B causes epithelial cell necrosis through an autoprocessing-independent mechanism. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 12, e1003072, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003072>.

CHUMBLER, N. M. *et al.* Crystal structure of *Clostridium difficile* toxin A. **Nature Microbiology**, v. 1, 15002, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2015.2>.

CIARLO, E. *et al.* Impact of the microbial derived short chain fatty acid propionate on host susceptibility to bacterial and fungal infections in vivo. **Scientific Reports**, v. 6, 37944, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep37944>.

COSSAIS, F. *et al.* Postnatal development of the myenteric glial network and its modulation by butyrate. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 310, n. 11, p. G941-G951, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00232.2015>.

COSTA, C. L. *et al.* Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* infection in a Brazilian cancer hospital. **Anaerobe**, v. 48, p. 232-236, 2017a. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.10.001>.

COSTA, D. V. S. *et al.* Adenosine receptors differentially mediate enteric glial cell death induced by *Clostridioides difficile* Toxins A and B. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 956326, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.956326>.

COSTA, D. V. S. *et al.* *Clostridioides difficile* infection promotes gastrointestinal dysfunction in human and mice post-acute phase of the disease. **Anaerobe**, v. 87, 102837, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2024.102837>.

COSTA, D. V. S. *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, 739874, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.739874>.

COSTA, D. V. S. *et al.* The role of the enteric nervous system in the pathogenesis of *Clostridioides difficile* infection. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 22, n. 8, p. 570-586, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41575-025-01071-x>.

CUMMINGS, J. H. *et al.* Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. **Gut**, v. 28, p. 1221-1227, 1987. DOI: <https://doi.org/10.1136/gut.28.10.1221>.

CYMBAL, M. *et al.* Management of *Clostridioides difficile* Infection: Diagnosis, Treatment, and Future Perspectives. **The American Journal of Medicine**, v. 137, n. 7, p. 571-576, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2024.03.024>.

CZEPIEL, J. *et al.* *Clostridium difficile* infection: review. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 38, n. 7, p. 1211-1221, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03539-6>.

DALILE, B. *et al.* The role of short-chain fatty acids in microbiota-gut-brain communication. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 16, n. 8, p. 461-478, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0157-3>.

DEN BESTEN, G. *et al.* The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. **Journal of Lipid Research**, v. 54, p. 2325-2340, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1194/jlr.R036012>.

DUPRAZ, L. *et al.* Gut microbiota-derived short-chain fatty acids regulate IL-17 production by mouse and human intestinal $\gamma\delta$ T cells. **Cell Reports**, v. 36, n. 1, 109332, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109332>.

DUROVIC, A.; WIDMER, A. F.; TSCHUDIN-SUTTER, S. New insights into transmission of *Clostridium difficile* infection-narrative review. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 5, p. 483-492, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.01.027>.

ERDMANN, P. *et al.* Dysregulation of mucosal membrane transporters and drug-metabolizing enzymes in ulcerative colitis. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 108, n. 2, p. 1035-1046, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.09.024>.

EZE, P. ET AL. Risk factors for *Clostridium difficile* infections - an overview of the evidence base and challenges in data synthesis. **Journal of Global Health**, v. 7, n. 1, 2017. DOI: <https://doi.org/10.7189/jogh.07.010417>.

FACHI, J. L. ET AL. Acetate coordinates neutrophil and ILC3 responses against *C. difficile* through FFAR2. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 217, n. 3, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.20190489>.

FELMLEE, M. A. *et al.* Monocarboxylate transporters (SLC16): function, regulation, and role in health and disease. **Pharmacological Reviews**, v. 72, n. 2, p. 466-485, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1124/pr.119.018762>.

FETTUCCIARI, K. *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, 442, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04459-z>.

FETTUCCIARI, K. *et al.* Enteric glial cells are susceptible to *Clostridium difficile* toxin B. **Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS**, v. 74, n. 8, p. 1527-1551, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2426-4>.

FETTUCCIARI, K. *et al.* Pro-Inflammatory Cytokines Enhanced *In Vitro* Cytotoxic Activity of *Clostridioides difficile* Toxin B in Enteric Glial Cells: The Achilles Heel of *Clostridioides difficile* Infection? *International Journal of Molecular Sciences*, 25(2). 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms25020958>.

FILIPPONE, A. *et al.* Sodium propionate contributes to tumor cell growth inhibition through PPAR- γ signaling. **Cancers**, v. 15, n. 1, 217, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers15010217>.

FRAMPTON, J. *et al.* Short-chain fatty acids as potential regulators of skeletal muscle metabolism and function. **Nature Metabolism**, v. 2, n. 9, p. 840-848, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0188-7>.

FUNG, C. *et al.* VPAC Receptor Subtypes Tune Purinergic Neuron-to-Glia Communication in the Murine Submucosal Plexus. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 11, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00118>.

FUSCO, W. *et al.* Short-Chain Fatty-Acid-Producing Bacteria: Key Components of the Human Gut Microbiota. **Nutrients**, v. 15, n. 9, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu15092211>.

GARCÍA-JUÁREZ, M.; CAMACHO-MORALES, A. Defining the role of anti- and pro-inflammatory outcomes of interleukin-6 in mental health. **Neuroscience**, v. 492, p. 32-46, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2022.03.020>.

GIRÃO, E. S. *et al.* Prevalence of *Clostridioides difficile* associated diarrhea in hospitalized patients in five Brazilian centers: A multicenter, prospective study. **Anaerobe**, v. 66, 102267, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2020.102267>.

GONZALES-LUNA, A. J.; CARLSON, T. J.; GAREY, K. W. Gut microbiota changes associated with *Clostridioides difficile* infection and its various treatment strategies. **Gut Microbes**, v. 15, n. 1, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2223345>.

GREGORY, A. L.; PENSINGER, D. A.; HRYCKOWIAN, A. J. A short chain fatty acid-centric view of *Clostridioides difficile* pathogenesis. **PLOS Pathogens**, v. 17, n. 10, e1009959, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009959>.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. DA. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007. DOI: <https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2007v53n3.1801>.

GRUBIŠIĆ, V. *et al.* Enteric glia regulate gut motility in health and disease. **Brain Research Bulletin**, v. 136, p. 109-117, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.03.011>.

GRUBIŠIĆ, V.; GULBRANSEN, B. D. Enteric glia: the most alimentary of all glia. **The Journal of Physiology**, v. 595, n. 2, p. 557-570, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1113/JP271021>.

GRÜTER, T. *et al.* Propionate exerts neuroprotective and neuroregenerative effects in the peripheral nervous system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 120, n. 4, e2216941120, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.2216941120>.

GURAV, A. *et al.* Slc5a8, a Na⁺-coupled high-affinity transporter for short-chain fatty acids, is a conditional tumour suppressor in colon that protects against colitis and colon cancer under

low-fibre dietary conditions. **Biochemical Journal**, v. 469, n. 2, p. 267-278, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1042/BJ20150242>.

HARHOUS, Z. *et al.* An update on the multifaceted roles of STAT3 in the heart. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 6, 150, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00150>.

HAYASHI, A. *et al.* The Butyrate-Producing Bacterium *Clostridium butyricum* Suppresses *Clostridioides difficile* Infection via Neutrophil- and Antimicrobial Cytokine-Dependent but GPR43/109a-Independent Mechanisms. **The Journal of Immunology**, v. 206, n. 7, p. 1576-1585, 2021. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000353>.

HE, L. *et al.* Evaluation of monocarboxylate transporter 4 in inflammatory bowel disease and its potential use as a diagnostic marker. **Disease Markers**, v. 2018, 2649491, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/2649491>.

HEILS, L. *et al.* CDT of *Clostridioides difficile* Induces MLC-Dependent Intestinal Barrier Dysfunction in HT-29/B6 Epithelial Cell Monolayers. **Toxins**, v. 15, n. 1, 54, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins15010054>.

HORSWILL, A. R.; DUDDING, A. R.; ESCALANTE-SEMERENA, J. C. Studies of propionate toxicity in *Salmonella enterica* identify 2-methylcitrate as a potent inhibitor of cell growth. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 22, p. 19094-19101, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M100244200>.

JEONG, S. *et al.* Propionate Ameliorates *Staphylococcus aureus* Skin Infection by Attenuating Bacterial Growth. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01363>.

JESS, A. T. *et al.* Short-Chain Fatty Acid Levels after Fecal Microbiota Transplantation in a Pediatric Cohort with Recurrent *Clostridioides difficile* Infection. **Metabolites**, v. 13, n. 10, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/metabo13101039>.

JOHNSON, D. E.; O'KEEFE, R. A.; GRANDIS, J. R. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 15, n. 4, p. 234-248, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2018.8>.

KIM, K. *et al.* Propionate of a microbiota metabolite induces cell apoptosis and cell cycle arrest in lung cancer. **Molecular Medicine Reports**, v. 20, n. 2, p. 1569-1574, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10431>.

KIM, S. *et al.* Perspectives on the therapeutic potential of short-chain fatty acid receptors. **BMB Reports**, v. 47, n. 3, p. 173-178, 2014. DOI: <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2014.47.3.272>.

KORDUS, S. L.; THOMAS, A. K.; LACY, D. B. *Clostridioides difficile* toxins: mechanisms of action and antitoxin therapeutics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 285-298, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00660-2>.

LANGE, O. *et al.* Short-chain fatty acids: a product of the microbiome and its participation in two-way communication on the microbiome-host mammal line. **Current Obesity Reports**, v. 12, n. 2, p. 108-126, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13679-023-00503-6>.

LEE, D. -H.; KIM, M. -T.; HAN, J. -H. GPR41 and GPR43: From development to metabolic regulation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 175, 116735, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.116735>.

LIM, S. C.; KNIGHT, D. R.; RILEY, T. V. *Clostridium difficile* and One Health. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 26, n. 7, p. 857-863, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.10.023>.

LIN, Y. *et al.* Progress in understanding the IL-6/STAT3 pathway in colorectal cancer. **OncoTargets and Therapy**, v. 13, p. 13023-13032, 2020. DOI: <https://doi.org/10.2147/OTT.S278013>.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

LOUREIRO, A. V. *et al.* Host and *Clostridioides difficile*-Response Modulated by Micronutrients and Glutamine: An Overview. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, 849301, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.849301>.

LUO, Y.; ZHENG, S. G. Hall of fame among pro-inflammatory cytokines: interleukin-6 gene and its transcriptional regulation mechanisms. **Frontiers in Immunology**, v. 7, 604, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00604>.

MANN, E. R.; LAM, Y. K.; UHLIG, H. H. Short-chain fatty acids: linking diet, the microbiome and immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 24, n. 8, p. 577-595, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41577-024-01014-8>.

MARKOVSKA, R. ET AL. *Clostridioides difficile*, a New “Superbug”. **Microorganisms**, v. 11, n. 4, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11040845>.

MARTIN-GALLAUSIAUX, C. *et al.* SCFA: mechanisms and functional importance in the gut. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 80, n. 1, p. 37-49, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0029665120006916>.

MOORE, J. H. ET AL. Defined Nutrient Diets Alter Susceptibility to *Clostridium difficile* Associated Disease in a Murine Model. **PLOS One**, v. 10, n. 7, e0131829, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131829>.

MUKHOPADHYA, I.; LOUIS, P. Gut microbiota-derived short-chain fatty acids and their role in human health and disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 23, n. 10, p. 635-651, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41579-025-01183-w>.

NAGY, N.; GOLDSTEIN, A. M. Enteric nervous system development: A crest cell’s journey from neural tube to colon. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 66, p. 94-106, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.01.006>.

NØHR, M. K. *et al.* GPR41/FFAR3 and GPR43/FFAR2 as cosensors for short-chain fatty acids in enteroendocrine cells vs FFAR3 in enteric neurons and FFAR2 in enteric leukocytes. **Endocrinology**, v. 154, n. 10, p. 3552-3564, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1210/en.2013-1142>.

NIBBERING, B. *et al.* Host Immune Responses to *Clostridioides difficile*: Toxins and Beyond. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.804949>.

PACÍFICO, D. DE M. *et al.* TRPV4 modulates inflammatory responses and apoptosis in enteric glial cells triggered by *Clostridioides difficile* toxins A and B. **Journal of Inflammation (London, England)**, v. 22, n. 1, 3, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12950-024-00425-7>.

PAPARELLA, A. S. *et al.* Inhibition of *Clostridium difficile* TcdA and TcdB toxins with transition state analogues. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, 6285, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26580-6>.

PAPATHEODOROU, P. *et al.* Clostridial glucosylating toxins enter cells via clathrin-mediated endocytosis. **PLOS One**, v. 5, n. 5, e10673, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010673>.

PARADA VENEGAS, D. *et al.* Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 277, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00277>.

PRUITT, R. N.; LACY, D. B. Toward a structural understanding of *Clostridium difficile* toxins A and B. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, 28, 2012. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00028>.

RAMESH, V. *et al.* Propionate reinforces epithelial identity and reduces aggressiveness of lung carcinoma. **EMBO Molecular Medicine**, v. 15, n. 12, e17836, 2023. DOI: <https://doi.org/10.15252/emmm.202317836>.

ROSENBERG, H. J.; RAO, M. Enteric glia in homeostasis and disease: From fundamental biology to human pathology. **IScience**, v. 24, n. 8, 102863, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102863>.

SALAGA, M. *et al.* Activation of free fatty acid receptor 4 affects intestinal inflammation and improves colon permeability in mice. **Nutrients**, v. 13, n. 8, 2716, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu13082716>.

SANTHOSH, S. *et al.* From diversity to disease: unravelling the role of enteric glial cells. **Frontiers in Immunology**, v. 15, 1408744, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1408744>.

SAYOL-ALTARRIBA, A. *et al.* Normalization of short-chain fatty acid concentration by bacterial count of stool samples improves discrimination between eubiotic and dysbiotic gut microbiota caused by *Clostridioides difficile* infection. **Gut Microbes**, v. 16, n. 1, 2415488, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1080/19490976.2024.2415488>.

SEGUELLA, L. *et al.* Hyperactive Enteric Glia Contribute to Persistent Dysmotility Following Inflammation by Driving Aberrant Excitatory Responses in Neurons. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, v. 101634, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2025.101634>.

SEGUELLA, L.; GULBRANSEN, B. D. Enteric glial biology, intercellular signalling and roles in gastrointestinal disease. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 18, n. 8, p. 571-587, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00423-7>.

SHARKEY, K. A.; MAWE, G. M. The enteric nervous system. **Physiological Reviews**, v. 103, n. 2, p. 1487-1564, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2022>.

SILVA, Y. P.; BERNARDI, A.; FROZZA, R. L. The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, 25, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00025>.

SIVAPRAKASAM, S. *et al.* Short-chain fatty acid transporters: role in colonic homeostasis. **Comprehensive Physiology**, v. 8, n. 1, p. 299-314, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1002/cphy.c170014>.

SMITS, W. K. *et al.* *Clostridium difficile* infection. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, n. 1, 16020, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.20>.

SOUSA, A. P. R. *et al.* A Low Concentration of Butyrate has a Protective Action Against the Deleterious Effects of *Clostridioides difficile* Toxins on Enteric Glia. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 39, n. 9, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1002/jbt.70475>.

SPIGAGLIA, P. *Clostridioides difficile* and Gut Microbiota: From Colonization to Infection and Treatment. **Pathogens**, v. 13, n. 8, 646, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens13080646>.

TANG, Y. *et al.* Short-chain fatty acids induce autophagy as adaptive strategy to delay mitochondria-mediated apoptotic cell death. **Cell Death and Differentiation**, v. 18, p. 602-618, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.117>.

THIBAULT, R. et al. Down-regulation of the monocarboxylate transporter 1 is involved in butyrate deficiency during intestinal inflammation. **Gastroenterology**, v. 133, n. 6, p. 1916-1927, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.08.041>.

THOMASI, B. et al. Enteric glial S100B controls rhythmic colonic functions by regulating excitability and specificity in gut motor neurocircuits. **The Journal of Physiology**, v. 603, n. 19, p. 5723-5749, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1113/JP289410>.

TOUGH, I. R.; FORBES, S.; COX, H. M. Signaling of free fatty acid receptors 2 and 3 differs in colonic mucosa following selective agonism or coagonism by luminal propionate. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 30, n. 12, e13454, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/nmo.13454>.

TRINDADE, C. N. R.; DOMINGUES, R. M. C. P.; FERREIRA, E. O. The epidemiology of *Clostridioides difficile* infection in Brazil: A systematic review covering thirty years. **Anaerobe**, v. 58, p. 13-21, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.03.002>.

VAN TREUREN, W.; DODD, D. Microbial Contribution to the Human Metabolome: Implications for Health and Disease. **Annual Review of Pathology**, v. 15, p. 345-369, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020117-043559>.

VERGNOLLE, N.; CIRILLO, C. Neurons and Glia in the Enteric Nervous System and Epithelial Barrier Function. **Physiology (Bethesda, Md.)**, v. 33, n. 4, p. 269-280, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1152/physiol.00009.2018>.

VICENTINI, F. A. et al. Intestinal microbiota shapes gut physiology and regulates enteric neurons and glia. **Microbiome**, v. 9, n. 1, 210, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01165-z>.

WANG, W. et al. Butyrate and propionate are microbial danger signals that activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages upon TLR stimulation. **Cell Reports**, v. 43, n. 9, 114736, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.114736>.

WANG, X. et al. Bacteroides methylmalonyl-CoA mutase produces propionate that promotes intestinal goblet cell differentiation and homeostasis. **Cell Host & Microbe**, v. 32, n. 1, p. 63-78.e7, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2023.11.005>.

WARREN, C. A. *et al.* Amixicile, a Novel Inhibitor of Pyruvate:Ferredoxin Oxidoreductase, Shows Efficacy against *Clostridium difficile* in a Mouse Infection Model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 8, p. 4103-4111, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.00360-12>.

WEI, Y. *et al.* Propionate promotes ferroptosis and apoptosis through mitophagy and ACSL4-mediated ferroptosis elicits anti-leukemia immunity. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 213, p. 36-51, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2024.01.005>.

XIA, Y. *et al.* *Clostridium difficile* toxin A excites enteric neurones and suppresses sympathetic neurotransmission in the guinea pig. **Gut**, v. 46, n. 4, p. 481-486, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1136/gut.46.4.481>.

YADEGAR, A. *et al.* Beneficial effects of fecal microbiota transplantation in recurrent *Clostridioides difficile* infection. **Cell Host & Microbe**, v. 31, n. 5, p. 695-711, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2023.03.019>.

YOUNG, M. K. *et al.* Binary Toxin Expression by *Clostridioides difficile* Is Associated With Worse Disease. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 9, n. 3, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1093/ofid/ofac001>.

YU, H. *et al.* Cytokines are markers of the *Clostridium difficile*-induced inflammatory response and predict disease severity. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 24, e00037-17, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1128/CVI.00037-17>.

ZHAN, Z. *et al.* Potential of gut-derived short-chain fatty acids to control enteric pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 976406, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.976406>.

APÊNDICE

Reagentes	FABRICANTE	CÓDIGO DO PRODUTO
brometo de tiazolil azul de tiazolil (MTT)	Sigma-Aldrich	M2128
SYBER Green PCR master mix	Applied biosystems	4309155
Ensaio de apoptose RealTime-Glo annexin V	Promega	JA1000
Propionato de sódio	Sigma-Aldrich	P1880-100G
Ensaio de atividade de caspase 3/7	Promega	G8090

ANEXO A

(Artigo em revisão)

The FEBS Journal



Pretreatment with propionate prevents gastrointestinal dysfunction following infection and modulates proinflammatory responses in enteric glia challenged with *Clostridioides difficile* toxins

Journal:	<i>The FEBS Journal</i>
Manuscript ID	FJ-26-0573
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	15-May-2026
Complete List of Authors:	Loureiro, Andrea; Federal University of Ceara, Department of Medical Sciences, Faculty of Medicine Rebouças, Conceição; Federal University of Ceara, Department of Morphology, Faculty of Medicine Leitão, Renata ; Federal University of Ceara, Department of Morphology, Faculty of Medicine Warren, Cirle; University of Virginia, Division of Infectious Diseases and International Health Brito, Gerly; Federal University of Ceara, Department of Morphology, Faculty of Medicine Costa, Deiziane; University of Virginia, Division of Infectious Diseases & International Health
Key Words:	



1
2
3 1 **Pretreatment with propionate prevents gastrointestinal dysfunction following infection and modulates**
4 2 **proinflammatory responses in enteric glia challenged with *Clostridioides difficile* toxins**
5
6 3
7
8 4 Andrea V. Loureiro^{1,2*}, Conceição S. M. Rebouças², Renata F. C. Leitão², Cirle A. Warren^{3,4}, Gerly A. C.
9 Brito^{1,2,4*}, Deiziane V. S. Costa^{3,4*}
10 5
11 6
12
13 7 ¹Department of Medical Sciences, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil.
14 8 ²Department of Morphology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil.
15 9 ³Division of Infectious Diseases and International Health, University of Virginia, Charlottesville, USA
16 10 ⁴These authors jointly supervised this work
17
18
19
20
21
22
23 12 ***Correspondence:** Andrea V. Loureiro, andrea.vianaloureiro@gmail.com; Cirle A. Warren,
24 13 ca6t@virginia.edu; Gerly A. C. Brito, gerlybrito@hotmail.com; Deiziane V. S. Costa, dv2t@virginia.edu.
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60 31

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62

Abstract

Gastrointestinal (GI) dysfunction following *Clostridioides difficile* infection (CDI) has been reported. Enteric glia contribute to GI motility and are vulnerable to *C. difficile* toxins. We aimed to investigate whether pretreatment with propionate prevents GI dysfunction after CDI and influences enteric glia responses (cell death and proinflammatory responses) to *C. difficile* toxins (TcdA or TcdB). Mice were infected with *C. difficile* and euthanized on day 14 for GI function analysis. In vitro, enteric glia were incubated with TcdA or TcdB, alone or with propionate. After challenge with toxins, enteric glia were collected to analyze expression of short-chain fatty acids (SCFAs) transporters (*MCT1*, and *MCT4*) and receptors (*FFAR2*, and *FFAR3*), as well as to evaluate proinflammatory responses (IL-6, S100B, and pSTAT3) and cell death. Propionate pretreatment improved survival, reduced weight loss, prevented diarrhea, and decreased the total GI transit time (TGITT) in infected mice. In vitro, enteric glia expressed all SCFA transporters and receptors, which were modified by exposure to *C. difficile* toxins. Propionate supplementation decreased IL-6 protein, S100B transcripts, and pSTAT3 nuclear translocation, and increased Bcl2 gene and protein expression, but did not prevent cell death, in TcdA- or TcdB-challenged enteric glia. Overall, our in vivo findings suggest that propionate pretreatment is effective in preventing poor outcomes in CDI, including GI dysfunction. In addition, our in vitro findings suggest that propionate supplementation modulates TcdA- or TcdB-induced proinflammatory responses in enteric glial cells, which express transporters and receptors for SCFAs.

KEYWORDS: *Clostridioides difficile*; Propionate; Gastrointestinal dysfunction; *C. difficile* toxins; Enteric glia.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

63 Introduction

64 *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) is a gram-positive, strict anaerobic, spore-forming, toxin-producing
65 bacillus, with *C. difficile* toxins A (TcdA) and B (TcdB) associated with intestinal damage during infection [1, 2].
66 *C. difficile* is the major cause of nosocomial and community diarrhea associated with antibiotic use worldwide
67 [3, 4], with symptoms ranging from mild diarrhea to fulminant disease that can be accompanied by
68 pseudomembranous colitis [5]. Gastrointestinal (GI) dysfunction post-infection has been reported in patients
69 recovering from *C. difficile* infection (CDI)-associated symptoms [6], which may be associated with damage to
70 the enteric nervous system (ENS) cells. The ENS comprises enteric neurons and glia, which together regulate
71 GI motility [7-11].

72 Enteric glia are susceptible to *C. difficile* toxins, which promote cell death and inflammatory responses
73 in these cells [12-19]. It has been documented that modulation of microbial-derived signaling, such as toll-like
74 receptor 4 (TLR4) blockade [12] and butyrate supplementation [19], decreased cell death and/or inflammatory
75 responses in enteric glial cells challenged with *C. difficile* toxins. Besides butyrate, propionate is another short-
76 chain fatty acid (SCFA) produced by bacterial fermentation of dietary fibers. However, it remains to be
77 elucidated whether propionate supplementation can modulate enteric glia responses to *C. difficile* toxins.

78 A previous study showed that patients infected with *C. difficile* exhibit reduced fecal propionate levels
79 during the acute phase of the disease [20]. In a mouse preclinical model of CDI, supplementation with a soluble
80 fiber found in fruits and vegetables (pectin), which increased the cecal concentration of SCFAs, reduced
81 intestinal epithelial permeability and decreased proinflammatory responses in the cecum of infected mice [21].
82 Another preclinical study in mice showed that diets rich in microbiota-accessible carbohydrates (MACs) or
83 inulin supplementation suppress persistent colonization by *C. difficile* and facilitate its elimination [22].
84 Additionally, the increase in acetate, propionate, and butyrate was associated with a reduced ability of *C.*
85 *difficile* to colonize the gut [22]. These studies overall demonstrate the benefit of SCFA supplementation for
86 CDI. However, the full mechanisms of protection are not well defined. Among the SCFAs, propionate acts as
87 a pleiotropic signaling molecule, primarily by activating the free fatty acid receptor 2 (FFAR2, also known as
88 GPR43) and 3 (FFAR3, also known as GPR41) [23-25]. This signaling is essential for modulating the immune
89 response, energy metabolism, and the integrity of the gut-brain axis [26-28]. Nevertheless, it remains unknown
90 whether pretreatment with propionate specifically prevents GI dysfunction after CDI.

91 The aim of this study was to determine whether pretreatment with propionate prevents GI dysfunction
92 after CDI and if its supplementation influences the response of enteric glial cells (specifically cell death and
93 proinflammatory responses) to *C. difficile* toxins (specifically TcdA and TcdB).

1
2 94
3
4 95
5
6 96
7
8 97
9
10 98
11
12 99
13
14 100
15
16 101
17
18 102
19
20 103
21
22 104
23
24 105
25 106
26
27 107
28
29 108
30
31 109
32
33 110
34
35 111
36
37 112
38
39 113
40
41 114
42
43 115
44
45 116
46
47 117
48
49 118
50 119
51
52 120
53
54 121
55
56 122
57
58 123
59
60 124

Materials and Methods

Mice

Wild-type (WT, Jackson Laboratory, US) C57BL/6 mice (N=60) were kept in temperature-controlled rooms with a 12-hour light-dark cycle. All experiments involved male mice aged 8 weeks. The animals had unrestricted access to water and a standard diet. Surgical procedures and treatments followed the Guidelines for Institutional and Animal Care and Use of the University of Virginia, Charlottesville, US. All protocols were approved by the University of Virginia's Committee on the Ethics of Animal Experiments (Protocol 4096).

C. difficile infection and experimental groups

Our translational CDI preclinical model in C57BL/6 mice (n= 6-8) was performed as previously described [6, 12, 29]. In brief, from days 3 to 6 before infection, all mice were given an antibiotic cocktail in their drinking water, which included metronidazole (0.215 mg/mL), vancomycin (0.045 mg/mL), colistin (850 U/mL), and gentamicin (0.035 mg/mL). Additionally, on the day prior to infection, they received an intraperitoneal injection of clindamycin at a dose of 32 mg/kg. Subsequently, mice were infected with the vegetative 10⁵ colony-forming units (CFU, in 100 µL of chopped meat broth, a pre-reduced medium) *C. difficile* strain VPI10463 (ATCC 43255, *tcdA+tcdB+ cdtA-cdtB-*) by oral gavage (Figure 1A). The inoculum was prepared as previously described [12].

The following groups were used: infected and infected pretreated with propionate (150 mM in drinking water, started on day 7 before infection), which were named here propionate infected. Mice were monitored for 14 days. The propionate dose (150 mM in drinking water) used was based on previous preclinical studies [30-32].

Disease severity score

The development of disease symptoms was monitored daily using a disease severity score system (based on weight loss, diarrhea, activity level, and the appearance of the eyes and hair), as previously described [29].

C. difficile shedding in stools

Regarding the detection of *C. difficile* shedding in stool samples, DNA was extracted from stool

specimens utilizing the QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen) in accordance with the manufacturer's instructions. The *tcdB* (*C. difficile* toxin B) gene was used as a specific target to identify *C. difficile* in stool samples after CDI. Primer sequences included *tcdB* 5'-AATGCATTTTGTATAACACATTG-3' (forward) and 5'-AAGTTTCTAACATCATTTCCAC-3' (reverse). Real-time PCR was performed on a Bio-Rad CFX system under the following conditions: an initial denaturation at 95°C for 5 minutes, followed by 40 cycles of 15 seconds at 95°C and 60 seconds at 55°C.

Functional GI motility assessment

For in vivo functional GI motility assessment on day 14 post-infection, the Evans blue method was used to measure total GI transit time (TGITT) as previously described [6, 33, 34]. After a 12-hour fast, mice received an oral gavage of 100 µL Evan's blue solution (5% Evans blue in 0.9% NaCl with 0.5% methylcellulose). The mice were then checked every 10 minutes until their first blue fecal pellet was observed. The total GI transit time (TGITT) was calculated as the interval between the start time (time 0) and the appearance of Evans blue in the feces.

Enteric glia cell culture and treatment

All in vitro assays for our mechanistic investigation were performed using an immortalized rat enteric glia cell line (PK060399egfr, ATCC CRL-2690). This cell line has been employed in numerous mechanistic studies [12-19, 35].

Enteric glia cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco) 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 20 passages. For all experiments, enteric glia were dissociated using TrypLE (Gibco, 12-604-013) for 5 min at 37°C in a humidified incubator under 5% CO₂.

To better understand whether propionate exerts any direct function in cell death and in the inflammatory response of enteric glia challenged by *C. difficile* toxins (50ng/mL TcdA or 1 ng/mL TcdB), cells were incubated with propionate at different concentrations (0.01, 0.1, 1, 10, 100 and 1000 mM) one hour prior the toxins challenge. Cells were collected after 2, 12 and/or 18 hours of incubation with the toxins for subsequent analysis. The final propionate concentrations were based on the viability test (Figure S1).

Purified TcdA and TcdB, produced by *C. difficile* strain VPI10463, were obtained from TechLab (VA, United States). Concentrations of TcdA or TcdB were determined based on previous studies [16]. A literature

1
2 156 review was conducted on how propionate concentration affects various cells to determine the initial
3
4 157 concentrations tested in the cell viability assay [36-38].
5

6 158

7 8 159 **Cell viability assay**

9
10 160 Enteria glia cell viability was determined as previously described [19]. Cells (5×10^3 cells/well) were
11
12 161 seeded in 96-well plates and treated with sodium propionate (0.01, 0.1, 1, 10, 100 and 1000 mM) for 24h. After
13
14 162 incubation, the media were removed, and the cells were treated with thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT,
15
16 163 Sigma-Aldrich, M2128, at 0.5 mg/mL reconstituted in supplemented DMEM) for 2 hours at 37°C in a humidified
17
18 164 incubator with 5% CO₂. After removing the MTT solution, 150 µL of pure dimethyl sulfoxide (DMSO) was added
19
20 165 to each well. Plates were then shaken for 2 minutes at room temperature to dissolve the formazan crystals,
21
22 166 and absorbance was measured at 570 nm using a plate reader (BioTek).
23

24 167

25 168 **Quantitative real-time PCR**

26
27 169 To assess the gene expression of *FFAR2*, *FFAR3*, monocarboxylate transporter 1 (*MCT1*),
28
29 170 monocarboxylate transporter 1 (*MCT4*), B-cell lymphoma 2 (*Bcl2*), and S100 calcium-binding protein B
30
31 171 (*S100B*) in enteric glia exposed to TcdA or TcdB, with or without sodium propionate, we performed quantitative
32
33 172 real-time PCR (qPCR). Enteric glia (6×10^5 cells/well) were seeded in 6-well plates and treated with TcdA or
34
35 173 TcdB for 2, 12 and/or 18 hours. Post-treatment, cells were harvested, and total RNA was extracted using the
36
37 174 RNeasy Mini kit (QIAGEN) and QIAcube (QIAGEN). RNA concentration was measured via Qubit 3
38
39 175 Fluorometer 3000 (Invitrogen), treated with DNase (Invitrogen), and reverse transcribed into cDNA (iScript
40
41 176 cDNA, Bio-Rad) following the manufacturer's instructions. qPCR amplification of *FFAR2*, *FFAR3*, *MCT1*,
42
43 177 *MCT4*, *Bcl2*, *S100B*, and Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) was conducted on a CFX
44
45 178 Connect system (Bio-Rad) with the conditions: 95°C for 30 seconds, 40 cycles at 95°C for 5 seconds, and
46
47 179 60°C for 30 seconds, followed by melt curve analysis from 65°C to 95°C in 0.5°C steps for 2 seconds each.
48
49 180 All qPCRs used iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, 172-5124). Primer sequences are provided
50
51 181 in Table S1. *GAPDH* was used as the housekeeping gene. Fold changes were calculated using the $\Delta\Delta C_t$
52
53 182 method [39].
54

54 183

55 184 **Immunofluorescence in enteric glial cells**

56
57 185 Immunofluorescence was employed to assess the expression of Bcl2 and IL-6 proteins, as well as the
58
59 186 nuclear translocation of phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3 (pSTAT3) in enteric
60

1
2 187 glial cells treated with TcdA or TcdB, with or without propionate pretreatment. Enteric glia cells (4×10^4
3
4 188 cells/well) were seeded onto 4-chamber glass tissue culture slides in polystyrene vessels (Nunc, 154526).
5
6 189 After 24 hours, cells were treated with 10 mM propionate or media. One hour later, TcdA (50 ng/mL) or TcdB
7
8 190 (1 ng/mL) was added. After 18 hours of toxin exposure, cells were fixed using 4% paraformaldehyde (Thermo
9
10 191 scientific, 043368.9M) in phosphate-buffered saline (PBS) for 30 minutes at room temperature, followed by
11
12 192 three washes in PBS for 5 minutes each. They were then permeabilized with 0.5% Triton X-100 and 3% BSA
13
14 193 in PBS for 5 minutes at 4°C. Non-specific binding was blocked with 5% normal donkey serum (Jackson
15
16 194 ImmunoResearch, 017-000-121) in PBS for 40 minutes at room temperature. Following three PBS washes,
17
18 195 cells were incubated overnight at 4°C with primary antibodies against IL-6 (R&D system, AF506, 1:40), Bcl2
19
20 196 (Invitrogen, PA5-27094, 1:500), or pSTAT3 (Novus Biological, NB100-82213, 1:200). After three PBS washes,
21
22 197 cells were incubated for 2 hours at room temperature with AlexaFluor 488 donkey anti-rabbit secondary
23
24 198 antibody (1:400, Abcam, ab150073) or AlexaFluor 647 donkey anti-goat secondary antibody (1:400, Abcam,
25
26 199 ab150131). Nuclei were stained with DAPI (1:1000 in PBS) for 10 minutes. Slides were mounted using antifade
27
28 200 mounting medium (Vector Labs), with some containing phalloidin (Vector Labs, H1600) to visualize the actin
29
30 201 cytoskeleton. Fluorescent images were captured using a Zeiss fluorescence microscope. Fluorescence
31
32 202 intensity of Bcl2 and IL-6 was quantified using ImageJ. The percentage of cells with nuclear pSTAT3
33
34 203 immunoreactivity was determined by analyzing 100 cells per condition.
35
36

37 205 **Realtime-glo annexin V apoptosis assay**

38
39 206 To evaluate cell death in enteric glia incubated with TcdA or TcdB and/or pretreated with sodium
40
41 207 propionate, a real-time phosphatidylserine (PS)-annexin V binding assay was performed in live cells as
42
43 208 described by the manufacturer (Promega, JA1011) and previous studies [12, 13, 17, 18]. Enteric glia (10^4
44
45 209 cells/well) were cultured and seeded in white and opaque 96-well plates (Falcon). After 24 hours, the cells
46
47 210 were treated with sodium propionate (10 mM) or media. After 1 hour of incubation, TcdA (50 ng/mL) or TcdB
48
49 211 (1 ng/mL) was added. Then, 100 μ L of 2x detection reagent (2 μ L of NanoBit annexin substrate, 2 μ L CaCl₂,
50
51 212 2 μ L annexin V-SmBit and 2 μ L annexin V-LgBit in 1000 μ L of supplemented DMEM pre-warmed to 37 °C)
52
53 213 was added to each well and incubated at 37 °C in a humidified incubator under 5% CO₂ for 18 hours.
54
55 214 Luminescence was measured using a luminometer (Infinite M plex, Tecan). To obtain the relative
56
57 215 luminescence unit (RLU), the luminescence signal of all samples was subtracted from the intrinsic
58
59 216 luminescence of the detection reagent (a well containing supplemented DMEM without cells) and normalized
60
61 217 to the control group (cells incubated only in the supplemented culture media).

1
2 218
3
4 219
5
6 220
7
8 221
9
10 222
11
12 223
13
14 224
15
16 225
17
18 226
19
20 227
21
22 228
23
24 229
25
26 230
27
28 231
29
30 232
31
32 233
33
34 234
35
36 235
37
38 236
39
40 237
41
42 238
43
44 239
45
46 240
47
48 241
49
50 242
51
52 243
53
54 244
55
56 245
57
58 246
59
60 247

Caspase 3/7 activity assay

To evaluate caspase-3 and -7 activity in enteric glia incubated with TcdA or TcdB and/or pretreated with sodium propionate, a caspase 3/7 assay was conducted following the manufacturer's instructions (caspase-Glo 3/7, Promega, G8090) and as previously described [17, 19]. Enteric glia (10^4 cells per well) were plated in white, opaque 96-well plates (Falcon). After 24 hours, cells were treated with 10 mM propionate or media. One hour later, TcdA (50 ng/mL) or TcdB (1 ng/mL) was added. After 18 hours of toxin exposure, 100 μ L of caspase-Glo 3/7 reagent (prepared in caspase-Glo 3/7 buffer and equilibrated at 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. Luminescence was measured with a luminometer (Infinite M plex, Tecan). To calculate relative luminescence units (RLU), the signal from each sample was corrected by subtracting the background luminescence from wells containing only media and reagent without cells, then normalized to the control group (cells in media only).

Statistical analysis

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

Results

Propionate supplementation improves CDI outcomes and post-infection GI dysfunction in mice

Non-pretreated *C. difficile*-infected mice began to die on day 4 post-infection, reaching 50% survival on day 14 post-infection (Figure 1B). On the other hand, all infected mice receiving propionate supplementation survived post-infection ($p=0.054$; Figure 1B). Furthermore, mice infected with *C. difficile* that received propionate supplementation exhibited significantly reduced body weight loss on day 5 post-infection, lower disease severity scores, and decreased diarrhea scores on days 5, 7 and 9 post-infection compared to non-treated infected mice (Figure 1C-E).

Over 14 days following up, infected mice that were not treated or received propionate supplementation shed *C. difficile* in their stools (Figure 1F). However, infected mice receiving propionate supplementation presented higher *C. difficile* shedding in stools on day 3 post-infection compared to infected non-treated mice ($p=0.04$, Figure 1F), followed by a decrease in *C. difficile* shedding on day 12 post-infection ($p=0.05$, Figure 1F).

Post-CDI GI dysfunction has been reported in humans [6, 40–42] and modeled in a mouse model [6]. Subsequently, an assessment was conducted to determine whether supplementation with propionate could prevent gastrointestinal dysfunction following infection. To accomplish this, we evaluated TGITT utilizing the Evans blue method. Infected mice receiving propionate supplementation exhibited lower TGITT than non-treated infected mice, suggesting an improvement in the constipation phenotype promoted by the infection ($p=0.0238$, Figure 1G).

Enteric glia cells express transporters and receptors to SCFAs, which are modified by *C. difficile* toxin challenge

Given that ENS cells, including enteric glia, contribute to the regulation of GI motility, we focused our mechanistic investigations on whether propionate can modulate enteric glia responses (cell death and proinflammatory responses) to *C. difficile* toxins using our in vitro model.

Firstly, we investigated whether enteric glia express transporters (*MCT1* and *MCT4*) and receptors (*FFAR2* and *FFAR3*) for SCFAs. We found that enteric glia express *MCT1*, *MCT4*, *FFAR2*, and *FFAR3*, with *MCT4* being the most highly expressed (Figure 2A). However, the challenge with TcdA or TcdB led to a significant downregulation of *MCT1* and upregulation of *MCT4* (only with TcdB), as well as increased expression of *FFAR3* and *FFAR2* in enteric glia in a time-dependent manner (Figure 2B–E).

Supplementation with propionate decreases IL-6 synthesis in enteric glia challenged with TcdA

Increased IL-6 levels are a marker of poor prognosis in patients with CDI [43, 44]. Increased IL-6 synthesis in enteric glia challenged with TcdA or TcdB has previously been reported [17, 18]. We found that pretreatment with propionate decreased IL-6 synthesis in enteric glial cells challenged with TcdA but trended to reduce in cells challenged with TcdB (TcdA: $p=0.0364$, TcdB: $p=0.0501$ Figure 3A–B). Interestingly, pretreatment with propionate alone decreases IL-6 synthesis in non-challenged enteric glia ($p=0.0051$, Figure 3A–B).

1
2 279 **Supplementation with propionate decreases pSTAT3 nuclear translocation and upregulates Bcl2**
3
4 280 **expression in enteric glia challenged with TcdA or TcdB**
5

6 281 Given that previous studies showed that IL-6 can mediate the nuclear translocation of STAT3 [45, 46],
7
8 282 which in turn can lead to IL-6 expression[47, 48], we investigated whether supplementation with propionate
9
10 283 could decrease the nuclear translocation of STAT3 in enteric glial cells challenged with TcdA or TcdB. We
11
12 284 found that TcdA or TcdB increased nuclear translocation of pSTAT3, as shown by the increased percentage
13
14 285 of cells with nuclear pSTAT3 staining ($p < 0.0001$, Figure 4A-B) in enteric glia cells. Meanwhile,
15
16 286 supplementation with propionate reduced the nuclear translocation of pSTAT3 in enteric glia cells exposed to
17
18 287 TcdA or TcdB (TcdA: $p < 0.0001$, TcdB: $p = 0.0361$, Figure 4A-B).

19
20 288 Given that STAT3 can mediate *Bcl2* expression[49, 50], we investigated whether propionate
21
22 289 supplementation could modulate Bcl2 expression in enteric glial cells challenged with *C. difficile* toxins. We
23
24 290 found that propionate supplementation significantly boosted Bcl2 transcripts and protein in enteric glial cells
25
26 291 challenged with TcdA or TcdB (Figure 5A-C). Notably, propionate supplementation by itself upregulated Bcl2
27
28 292 in enteric glia cells non-challenged with *C. difficile* toxins ($p < 0.0001$, Figure 5A-C). Despite propionate
29
30 293 supplementation increasing Bcl2, a well-known antiapoptotic molecule [51, 52], in enteric glia exposed to *C.*
31
32 294 *difficile* toxins, neither TcdA- or TcdB-induced cell death nor caspase 3/7 activity was prevented (Figure S3).

33 295
34
35 296 **Supplementation with propionate downregulates S100B gene expression in enteric glia challenged**
36
37 297 **with TcdA or TcdB**

38
39 298 Another proinflammatory marker upregulated in enteric glia cells under *C. difficile* toxin challenge is
40
41 299 S100B [16, 17], which has been shown to worsen CDI [16]. We then examined whether propionate
42
43 300 supplementation could prevent *C. difficile* toxin-induced upregulation of S100B in enteric glial cells. We found
44
45 301 that propionate supplementation decreased S100B gene expression in enteric glial cells challenged with TcdA
46
47 302 or TcdB ($p < 0.0001$, Figure 6A). Notably, propionate supplementation alone downregulated S100B in enteric
48
49 303 glial cells not challenged with *C. difficile* toxins ($p < 0.0041$, Figure 6A).

50 304

51
52 305 **Discussion**
53

54 306 Our findings in the mouse model of CDI showed that propionate pretreatment reduces body weight
55
56 307 loss, prevents the development of severe diarrhea, and decreases *C. difficile* colonization after the acute phase
57
58 308 of the disease, improving survival and reducing gastrointestinal transit delay following infection. Our in vitro
59
60 309 findings revealed that enteric glial cells express transporters (*MCT1* and *MCT4*) and receptors (*FFAR2* and

1
2 310 *FFAR3*) for SCFAs (such as propionate), and that TcdA or TcdB decreases *MCT1* expression and increases
3
4 311 *MCT4*, *FFAR2*, and *FFAR3* expression in a time-dependent manner. Additionally, propionate supplementation
5
6 312 modulates the proinflammatory response (by reducing the proinflammatory component of IL-6/STAT3/IL-6
7
8 313 signaling and decreasing *S100B* expression), and increases the expression of Bcl2, but does not prevent cell
9
10 314 death in enteric glial cells challenged by TcdA or TcdB.

11
12 315 Here, 150 mM propionate was applied in our in vivo studies, which had previously been used in other
13
14 316 preclinical mouse models, including neuroinflammation models, lung carcinoma, and CDI [30, 32, 53-55]. While
15
16 317 the final concentration of propionate used in our in vitro analyses with enteric glial cells challenged with *C.*
17
18 318 *difficile* toxins was 10 mM, this concentration was also used in previous studies on colorectal and lung cancer
19
20 319 cells [38, 56, 57]. In healthy humans, serum concentrations of propionate range between 150 and 170
21
22 320 nmol/mL, which are equivalent to 0.15 to 0.17 mM, respectively [58], and in the lumen of the large intestine
23
24 321 from 14.2 mM to 26.7 mM per kilogram of feces [59]. Propionate concentrations in the blood are much lower
25
26 322 than in the colon lumen, since approximately 80-95% of it is metabolized by the liver during first-pass
27
28 323 metabolism [59-62]. Since the enteric glial cells are close to the intestinal lumen, the concentrations used in
29
30 324 this study are translational and feasible, as demonstrated in our viability assay.

31 325 Using our CDI preclinical model, we showed that propionate pretreatment improved survival, reduced
32
33 326 body weight loss, prevented severe diarrhea, and decreased disease severity during the acute phase of the
34
35 327 disease in mice. Consistent with our results, a previous study showed that propionate (150 mM) pretreatment
36
37 328 in mice with colitis induced by CDI decreases disease severity and weight loss [32]. Our investigations focused
38
39 329 on GI dysfunction and the enteric glial response to *C. difficile* toxins, an area not previously explored in Fachi
40
41 330 et al.'s study [32]. Supplementation with a fiber-rich diet, which is a source of SCFAs (such as propionate),
42
43 331 has also been shown to reduce mortality from CDI in preclinical mouse models [32, 63]. In contrast, in other
44
45 332 models of infection induced by gram-negative (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*), and gram-positive
46
47 333 bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*), as well as induced by *Candida albicans*,
48
49 334 propionate (200 mM) pretreatment did not alter morbidity or mortality parameters, although in vitro, it
50
51 335 attenuated the response of bone marrow-derived macrophages to microbial stimulation, reducing the
52
53 336 production of proinflammatory cytokines [64]. These findings suggest that the outcome of using propionate as
54
55 337 a pretreatment in enteric infections depends on the pathogen and the dose used.

56 338 For the first time, we showed that propionate pretreatment alleviates post-CDI-induced gastrointestinal
57
58 339 dysfunction, as shown by the reduction in constipation phenotype on day 14 post-infection. In contrast,
59
60 340 propionate (10 mM) inhibited intestinal motility in germ-free mice [65]. In a preclinical model of antibiotic-

1
2 341 induced depletion of the gut microbiota, supplementation with SCFAs (including 25.9 mM propionate) does not
3
4 342 restore the antibiotic-induced changes in intestinal motility [66]. Similarly, acute SCFA supplementation via
5
6 343 enema delays colonic motility by activating myenteric neurons in healthy mice [67]. Since propionate may have
7
8 344 an effect opposite to that observed in our study, its beneficial influence on reducing gastrointestinal motility
9
10 345 dysfunction might occur by preventing the inflammation in CDI. Enteric glia play an important role in regulating
11
12 346 intestinal motility and inflammatory response [8]. Recent studies show that enteric glia-derived S100B
13
14 347 regulates neuronal excitability and functional connectivity in cholinergic circuits, being essential for the
15
16 348 generation and maintenance of the rhythmic motor function of the intestine [68]. During intestinal inflammation,
17
18 349 enteric glia can adopt a reactive phenotype, altering neuroglial signaling and contributing to motility disorders
19
20 350 [69]. Of note, enteric glia cells are susceptible to *C. difficile*, which promote proinflammatory responses and
21
22 351 cell death [13-19].

23 352 Our findings also showed that enteric glial cells express SCFA transporters and receptors, with *MCT1*
24
25 353 being the most highly expressed transporter in vitro. Among the receptors, *FFAR3* was the most prevalent in
26
27 354 enteric glial cells. Supporting this, a previous study reported the expression of *MCT1* and *FFAR3* in enteric
28
29 355 glial cells derived from a rat primary culture [70]. Another study did not find *FFAR3* in enteric glial cells
30
31 356 expressing glial fibrillary acidic protein (GFAP) in mouse samples [71]. However, further research into other
32
33 357 types of glial cells, such as those expressing S100B, SOX10, or PLP1, is needed to confirm whether these
34
35 358 cells indeed do not express this receptor, since *FFAR3* is a receptor with low expression under normal
36
37 359 conditions, and its levels increase when enteric glial cells are exposed to *C. difficile* toxins, as shown in our in
38
39 360 vitro study.

40 361 Additionally, our study showed that exposure to *C. difficile* toxins reduced *MCT1* gene expression and
41
42 362 increased *MCT4* in enteric glial cells. Although the role of these transporters in CDI is not well documented, in
43
44 363 the context of non-infectious ulcerative colitis, intestinal inflammation negatively regulates *MCT1* expression
45
46 364 [72, 73]. On the other hand, *MCT4* expression increases in the inflamed colon mucosa of patients with
47
48 365 inflammatory bowel disease (IBD) [74]. Our study also showed that TcdA or TcdB increased the expression of
49
50 366 *FFAR3* and *FFAR2* in enteric glial cells. Increased *FFAR3* was also observed in the distal colon of mice with
51
52 367 DSS (dextran sulfate sodium)-induced colitis [75]. In a mouse preclinical model of CDI, loss of *FFAR2*
53
54 368 prevented a high-fiber diet or SCFA supplementation from producing beneficial effects on clinical outcomes
55
56 369 and from reducing the proinflammatory response [32, 76]. Future research should clarify the roles of these
57
58 370 transporters and receptors in enteric glial cells during CDI.

59
60

1
2 371 These SCFA transporters and receptors can enable the enteric glial cell to respond to butyrate,
3
4 372 acetate, or propionate, which are decreased in patients with CDI [20]. Our previous study showed that
5
6 373 supplementation with low concentrations of butyrate reduces the death of enteric glial cells induced by *C.*
7
8 374 *difficile* toxins [19]. Prior to this study, it was unknown whether propionate could modulate the response of
9
10 375 enteric glia cells to *C. difficile* toxins.

11
12 376 Also, we showed that propionate supplementation reduced IL-6 protein levels in enteric glial cells
13
14 377 exposed to *C. difficile* toxins. In human macrophages challenged with lipopolysaccharide (LPS), propionate
15
16 378 supplementation reduced proinflammatory interleukin production, including IL-6, by inhibiting HDAC (histone
17
18 379 deacetylase) [77]. IL-6 is a pleiotropic cytokine, therefore exerting proinflammatory or anti-inflammatory effects
19
20 380 depending on the context in which it is involved [78, 79]. Since increased IL-6 is associated with the severity
21
22 381 of CDI and mortality after infection [43, 44], modulation of IL-6 expression induced by *C. difficile* toxins may be
23
24 382 involved in the positive outcomes observed in the preclinical results presented here, which require further
25
26 383 investigation.

27 384 The present study also showed that propionate supplementation reduced nuclear translocation of
28
29 385 STAT3 in enteric glial cells exposed to *C. difficile* toxins. Similarly, in previous studies using CD4-positive T
30
31 386 cells in vitro [80] or a mouse model of DSS-induced colitis [81], propionate also reduced STAT3 activation.
32
33 387 Classically, IL-6 can bind to its receptor IL-6R and activate the glycoprotein 130 on the cell membrane,
34
35 388 promoting the phosphorylation of STAT3 and, consequently, its translocation to the nucleus, where it
36
37 389 stimulates the gene expression of various genes, such as *Bcl2*, *Cyclin D1*, *VEGF*, and *HIF-1 α* [82].
38
39 390 Alternatively, IL-6 can bind to the soluble form of its receptor, sIL-6R, activating STAT3 and stimulating IL-6
40
41 391 synthesis [47, 48]. Thus, STAT3 activation can serve a dual purpose: either promoting antiapoptotic genes or
42
43 392 proinflammatory genes, depending on the context.

44 393 Here, we also showed that propionate supplementation increased *Bcl2* expression, an antiapoptotic
45
46 394 mediator, but enhanced cell death in enteric glial cells challenged with *C. difficile* toxins. This may reflect a
47
48 395 compensatory response to stress induced by the toxins, in which the positive regulation of *Bcl2* is insufficient
49
50 396 to mitigate cellular damage. Additionally, previous reports showed that propionate can induce apoptosis
51
52 397 through alternative pathways, including oxidative stress, mitophagy, and ferroptosis, suggesting that cell death
53
54 398 may also occur via mechanisms independent of *Bcl2* regulation [83-85]. Further, it is important to note that *C.*
55
56 399 *difficile* toxins can promote cell death beyond apoptosis, including necrosis, pyroptosis, and autophagy [1, 86,
57
58 400 87]. Therefore, future research should incorporate other mechanisms of cell death.

59
60

1
2 401 Another important finding of this study is that propionate supplementation reduced *S100B* gene
3
4 402 expression in enteric glial cells challenged with TcdA or TcdB. The ability of SCFAs supplementation to reduce
5
6 403 *S100B* expression has already been demonstrated in a mouse model of multiple sclerosis [88]. Our previous
7
8 404 study using a mouse model of CDI showed that *S100B* contributes to disease exacerbation by amplifying the
9
10 405 proinflammatory response in the acute phase of the disease [16]. Further, we speculate that the benefits of
11
12 406 propionate supplementation in CDI may partly result from its ability to inhibit *S100B* expression. Nonetheless,
13
14 407 future studies are needed to determine whether the protective effects of propionate rely on or are independent
15
16 408 of *S100B*.

17
18 409 In summary, our findings suggest that propionate pretreatment improves survival and reduces
19
20 410 gastrointestinal dysfunction in mice infected with *C. difficile*. In vitro, enteric glial cells express SCFA
21
22 411 transporters and receptors, which are modulated by exposure to *C. difficile* toxins. Additionally, propionate
23
24 412 supplementation modulates the response of enteric glial cells to *C. difficile* toxins, decreasing proinflammatory
25
26 413 signaling pathways, such as IL-6/STAT3/IL-6, and *S100B* upregulation (Figure 6B). Future investigations using
27
28 414 the CDI model are necessary to uncover the mechanisms underlying the beneficial effects of propionate
29
30 415 pretreatment on gastrointestinal dysfunction, as well as to define the dynamics of propionate modulation of the
31
32 416 proinflammatory versus anti-inflammatory IL-6/STAT3 pathway in enteric glial cells' response to *C. difficile*
33
34 417 toxins.

35 418
36
37 419
38
39 420
40
41 421
42
43 422
44
45 423
46
47 424
48
49 425
50
51 426
52
53 427
54
55 428
56
57 429
58
59 430
60 431

1

2 432 Author contributions

3

4 433 AVL conceptualized the main ideas, participated in the design, performed all experiments, analyzed the data,
5
6 434 and wrote the manuscript. CSMR helped with data acquisition. RFCL helped to revise the manuscript. CAW
7
8 435 and GACB helped conceptualize the main ideas, supervised the project, provided funding for its development,
9
10 436 and reviewed the manuscript. DVSC conceptualized the main ideas, participated in the design and helped with
11
12 437 some of the experiments, supervised the project, and helped write the manuscript.

13

14

15 438

16

17 439 Acknowledgments

18

19 440 The authors would like to thank TechLab for kindly providing the *C. difficile* toxins A and B for our in vitro
20
21 441 studies. Fig. 6B was made using Biorender.com.

22

23

24 442

25

26 443 Funding

27

28 444 This study was also partially supported by the FUNCAP/Brazil (PS1-0186-00230.01.00/21). AVL was
29
30 445 supported by the FUNCAP/Brazil scholarship and the UVA visitor research stipend provided by CAW. GACB
31
32 446 is supported by CNPQ (303319/2022-4).

33

34

35 447

36

37 448 Conflicts of Interest

38

39 449 The authors certify that they have no affiliations with or involvement in any organization or entity that has a
40
41 450 financial or non-financial interest in the subject matter or materials described in this manuscript.

42

43

44 451

45

46 452 Data Availability Statement

47

48 453 All data and details are provided in the manuscript and supplementary materials. For additional questions
49
50 454 regarding data, analytical methods, and study materials, please reach out to the corresponding author (s).

51

52

53 455

54

55 456

56

57

58 457

59

60 458

61

62 459

63

64 460

65

66 461

References

1. Kordus, S.L., A.K. Thomas, and D.B. Lacy, *Clostridioides difficile* toxins: mechanisms of action and antitoxin therapeutics. *Nat Rev Microbiol*, 2022. **20**(5): p. 285-298.
2. Spigaglia, P., *Clostridioides difficile* and Gut Microbiota: From Colonization to Infection and Treatment. *Pathogens*, 2024. **13**(8).
3. Cymbal, M., et al., *Management of Clostridioides difficile* Infection: Diagnosis, Treatment, and Future Perspectives. *Am J Med*, 2024. **137**(7): p. 571-576.
4. Guh, A.Y. and L.C. McDonald, *Changes in the Epidemiology of Clostridioides difficile* Infection. *Infect Dis Clin North Am*, 2025. **39**(4): p. 567-580.
5. Abt, M.C., P.T. McKenney, and E.G. Pamer, *Clostridium difficile* colitis: pathogenesis and host defence. *Nat Rev Microbiol*, 2016. **14**(10): p. 609-20.
6. Costa, D.V.S., et al., *Clostridioides difficile* infection promotes gastrointestinal dysfunction in human and mice post-acute phase of the disease. *Anaerobe*, 2024. **87**: p. 102837.
7. Sharkey, K.A. and G.M. Mawe, *The enteric nervous system*. *Physiol Rev*, 2023. **103**(2): p. 1487-1564.
8. Grubišić, V., et al., *Enteric glia regulate gut motility in health and disease*. *Brain Res Bull*, 2018. **136**: p. 109-117.
9. Rao, M., et al., *Enteric Glia Regulate Gastrointestinal Motility but Are Not Required for Maintenance of the Epithelium in Mice*. *Gastroenterology*, 2017. **153**(4): p. 1068-1081.e7.
10. Seguella, L., et al., *Functional Intraregional and Interregional Heterogeneity between Myenteric Glial Cells of the Colon and Duodenum in Mice*. *J Neurosci*, 2022. **42**(46): p. 8694-8708.
11. Wattchow, D.A., et al., *Gut Neuropathies and Intestinal Motility Disorders*. *Neurogastroenterol Motil*, 2025. **37**(8): p. e14995.
12. Barbosa, M.L.L., et al., *Role of TLR4 in Enteric Glia Response to Clostridioides Difficile Toxins: Insights From In Vivo and In Vitro Studies*. *J Cell Mol Med*, 2025. **29**(22): p. e70943.
13. Pacifico, D.M., et al., *TRPV4 modulates inflammatory responses and apoptosis in enteric glial cells triggered by Clostridioides difficile* toxins A and B. *J Inflamm (Lond)*, 2025. **22**(1): p. 3.
14. Fettucciari, K., et al., *Enteric glial cells are susceptible to Clostridium difficile* toxin B. *Cell Mol Life Sci*, 2017. **74**(8): p. 1527-1551.
15. Macchioni, L., et al., *Enteric glial cells counteract Clostridium difficile* Toxin B through a NADPH oxidase/ROS/JNK/caspase-3 axis, without involving mitochondrial pathways. *Sci Rep*, 2017. **7**: p. 45569.
16. Costa, D.V.S., et al., *S100B Inhibition Attenuates Intestinal Damage and Diarrhea Severity During Clostridioides difficile* Infection by Modulating Inflammatory Response. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021. **11**: p. 739874.
17. Costa, D.V.S., et al., *Adenosine receptors differentially mediate enteric glial cell death induced by Clostridioides difficile* Toxins A and B. *Front Immunol*, 2022. **13**: p. 956326.
18. Loureiro, A.V., et al., *Role of Pannexin-1-P2X7R signaling on cell death and pro-inflammatory mediator expression induced by Clostridioides difficile* toxins in enteric glia. *Front Immunol*, 2022. **13**: p. 956340.
19. Sousa, A.P.R., et al., *A Low Concentration of Butyrate has a Protective Action Against the Deleterious Effects of Clostridioides difficile* Toxins on Enteric Glia. *J Biochem Mol Toxicol*, 2025. **39**(9): p. e70475.
20. Sayol-Altarriba, A., et al., *Normalization of short-chain fatty acid concentration by bacterial count of stool samples improves discrimination between eubiotic and dysbiotic gut microbiota caused by Clostridioides difficile* infection. *Gut Microbes*, 2024. **16**(1): p. 2415488.

- 1
- 2 512 21. Wu, Z., et al., *The impact of dietary fibers on Clostridioides difficile infection in a mouse*
- 3 513 *model*. Front Cell Infect Microbiol, 2022. **12**: p. 1028267.
- 4 514 22. Hryckowian, A.J., et al., *Microbiota-accessible carbohydrates suppress Clostridium difficile*
- 5 515 *infection in a murine model*. Nat Microbiol, 2018. **3**(6): p. 662-669.
- 6 516 23. Brown, A.J., et al., *The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are*
- 7 517 *activated by propionate and other short chain carboxylic acids*. J Biol Chem, 2003.
- 8 518 **278**(13): p. 11312-9.
- 9 519 24. Hirdaramani, A., et al., *A selective and augmentable butyrate-FFAR2 signal circuitry*
- 10 520 *programs the cellular identity of enteroendocrine L-cells*. Commun Biol, 2026.
- 11 521 25. Le Poul, E., et al., *Functional characterization of human receptors for short chain fatty*
- 12 522 *acids and their role in polymorphonuclear cell activation*. J Biol Chem, 2003. **278**(28): p.
- 13 523 25481-9.
- 14 524 26. Facchin, S., M. Calgaro, and E.V. Savarino, *Rethinking Short-Chain Fatty Acids: A Closer*
- 15 525 *Look at Propionate in Inflammation, Metabolism, and Mucosal Homeostasis*. Cells, 2025.
- 16 526 **14**(15).
- 17 527 27. Bagaev, A., et al., *Maternal oral sodium propionate supplementation restores gut integrity*
- 18 528 *and mitigates stress-induced metabolic and behavioral outcomes in offspring*. Transl
- 19 529 *Psychiatry*, 2025. **15**(1): p. 235.
- 20 530 28. O'Riordan, K.J., et al., *The gut microbiota-immune-brain axis: Therapeutic implications*.
- 21 531 *Cell Rep Med*, 2025. **6**(3): p. 101982.
- 22 532 29. Warren, C.A., et al., *Amixicile, a novel inhibitor of pyruvate: ferredoxin oxidoreductase,*
- 23 533 *shows efficacy against Clostridium difficile in a mouse infection model*. Antimicrob Agents
- 24 534 *Chemother*, 2012. **56**(8): p. 4103-11.
- 25 535 30. Chandra, S., et al., *The gut microbiome controls reactive astrocytosis during Abeta*
- 26 536 *amyloidosis via propionate-mediated regulation of IL-17*. J Clin Invest, 2025. **135**(13).
- 27 537 31. Wang, X., et al., *Bacteroides methylmalonyl-CoA mutase produces propionate that*
- 28 538 *promotes intestinal goblet cell differentiation and homeostasis*. Cell Host Microbe, 2024.
- 29 539 **32**(1): p. 63-78 e7.
- 30 540 32. Fachi, J.L., et al., *Fiber- and acetate-mediated modulation of MHC-II expression on*
- 31 541 *intestinal epithelium protects from Clostridioides difficile infection*. Cell Host Microbe,
- 32 542 2025. **33**(2): p. 235-251 e7.
- 33 543 33. Jin, B., et al., *Colonic Motility Is Improved by the Activation of 5-HT(2B) Receptors on*
- 34 544 *Interstitial Cells of Cajal in Diabetic Mice*. Gastroenterology, 2021. **161**(2): p. 608-622 e7.
- 35 545 34. Singh, R., et al., *miR-10b-5p Rescues Diabetes and Gastrointestinal Dysmotility*.
- 36 546 *Gastroenterology*, 2021. **160**(5): p. 1662-1678 e18.
- 37 547 35. Fettucciari, K., et al., *Clostridium difficile toxin B induces senescence in enteric glial cells:*
- 38 548 *A potential new mechanism of Clostridium difficile pathogenesis*. Biochim Biophys Acta
- 39 549 *Mol Cell Res*, 2018. **1865**(12): p. 1945-1958.
- 40 550 36. Gao, W., et al., *Propionate alleviates palmitic acid-induced endoplasmic reticulum stress by*
- 41 551 *enhancing autophagy in calf hepatic cells*. J Dairy Sci, 2021. **104**(8): p. 9316-9326.
- 42 552 37. Li, M., et al., *IL-33 Is Involved in the Anti-Inflammatory Effects of Butyrate and Propionate*
- 43 553 *on TNFalpha-Activated Endothelial Cells*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(5).
- 44 554 38. Nshanian, M., et al., *Short-chain fatty acid metabolites propionate and butyrate are unique*
- 45 555 *epigenetic regulatory elements linking diet, metabolism and gene expression*. Nat Metab,
- 46 556 2025. **7**(1): p. 196-211.
- 47 557 39. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time*
- 48 558 *quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
- 49 559 40. Gutiérrez, R.L., M.S. Riddle, and C.K. Porter, *Increased risk of functional gastrointestinal*
- 50 560 *sequelae after Clostridium difficile infection among active duty United States military*
- 51 561 *personnel (1998-2010)*. Gastroenterology, 2015. **149**(6): p. 1408-14.
- 52 562 41. Barlam, T.F., et al., *Retrospective analysis of long-term gastrointestinal symptoms after*
- 53 563 *Clostridium difficile infection in a nonelderly cohort*. PLoS One, 2018. **13**(12): p. e0209152.

- 1
- 2 564 42. Wadhwa, A., et al., *High risk of post-infectious irritable bowel syndrome in patients with*
- 3 565 *Clostridium difficile* infection. *Aliment Pharmacol Ther*, 2016. **44**(6): p. 576-82.
- 4 566 43. Abhyankar, M.M., et al., *Immune Profiling To Predict Outcome of Clostridioides difficile*
- 5 567 *Infection*. *mBio*, 2020. **11**(3).
- 6 568 44. Yu, H., et al., *Cytokines Are Markers of the Clostridium difficile-Induced Inflammatory*
- 7 569 *Response and Predict Disease Severity*. *Clin Vaccine Immunol*, 2017. **24**(8).
- 8 570 45. Harre, E.M., et al., *Selected contribution: role of IL-6 in LPS-induced nuclear STAT3*
- 9 571 *translocation in sensory circumventricular organs during fever in rats*. *J Appl Physiol*
- 10 572 (1985), 2002. **92**(6): p. 2657-66.
- 11 573 46. Gyamfi, J., et al., *Interleukin-6/STAT3 signalling regulates adipocyte induced epithelial-*
- 12 574 *mesenchymal transition in breast cancer cells*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 8859.
- 13 575 47. Hu, Z., et al., *IL6-STAT3-C/EBPbeta-IL6 positive feedback loop in tumor-associated*
- 14 576 *macrophages promotes the EMT and metastasis of lung adenocarcinoma*. *J Exp Clin Cancer*
- 15 577 *Res*, 2024. **43**(1): p. 63.
- 16 578 48. Wang, Y., et al., *STAT3 activation in response to IL-6 is prolonged by the binding of IL-6*
- 17 579 *receptor to EGF receptor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(42): p. 16975-80.
- 18 580 49. Samad, M.A., et al., *STAT3 Signaling Pathway in Health and Disease*. *MedComm* (2020),
- 19 581 2025. **6**(4): p. e70152.
- 20 582 50. Bhattacharya, S., R.M. Ray, and L.R. Johnson, *STAT3-mediated transcription of Bcl-2, Mcl-*
- 21 583 *1 and c-IAP2 prevents apoptosis in polyamine-depleted cells*. *Biochem J*, 2005. **392**(Pt 2): p.
- 22 584 335-44.
- 23 585 51. Czabotar, P.E. and A.J. Garcia-Saez, *Mechanisms of BCL-2 family proteins in mitochondrial*
- 24 586 *apoptosis*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023. **24**(10): p. 732-748.
- 25 587 52. Lan, Y.J., et al., *Anti-apoptotic BCL-2 regulation by changes in dynamics of its long*
- 26 588 *unstructured loop*. *Commun Biol*, 2020. **3**(1): p. 668.
- 27 589 53. Haghighia, A., et al., *Propionate attenuates atherosclerosis by immune-dependent regulation*
- 28 590 *of intestinal cholesterol metabolism*. *Eur Heart J*, 2022. **43**(6): p. 518-533.
- 29 591 54. Gruter, T., et al., *Propionate exerts neuroprotective and neuroregenerative effects in the*
- 30 592 *peripheral nervous system*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2023. **120**(4): p. e2216941120.
- 31 593 55. Ramesh, V., et al., *Propionate reinforces epithelial identity and reduces aggressiveness of*
- 32 594 *lung carcinoma*. *EMBO Mol Med*, 2023. **15**(12): p. e17836.
- 33 595 56. Wang, X. and Y. Hu, *High-dose sodium propionate contributes to tumor immune escape*
- 34 596 *through the IGF2BP3/PD-L1 axis in colorectal cancer*. *Oncol Lett*, 2025. **29**(6): p. 303.
- 35 597 57. Kim, K., et al., *Propionate of a microbiota metabolite induces cell apoptosis and cell cycle*
- 36 598 *arrest in lung cancer*. *Mol Med Rep*, 2019. **20**(2): p. 1569-1574.
- 37 599 58. Trend, S., et al., *Associations of serum short-chain fatty acids with circulating immune cells*
- 38 600 *and serum biomarkers in patients with multiple sclerosis*. *Sci Rep*, 2021. **11**(1): p. 5244.
- 39 601 59. Cummings, J.H., et al., *Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and*
- 40 602 *venous blood*. *Gut*, 1987. **28**(10): p. 1221-7.
- 41 603 60. Alberts, D.S., et al., *Disposition and metabolism of topically administered alpha-tocopherol*
- 42 604 *acetate: a common ingredient of commercially available sunscreens and cosmetics*. *Nutr*
- 43 605 *Cancer*, 1996. **26**(2): p. 193-201.
- 44 606 61. Martin-Gallausiaux, C., et al., *SCFA: mechanisms and functional importance in the gut*.
- 45 607 *Proc Nutr Soc*, 2021. **80**(1): p. 37-49.
- 46 608 62. Lange, O., M. Proczko-Stepaniak, and A. Mika, *Short-Chain Fatty Acids-A Product of the*
- 47 609 *Microbiome and Its Participation in Two-Way Communication on the Microbiome-Host*
- 48 610 *Mammal Line*. *Curr Obes Rep*, 2023. **12**(2): p. 108-126.
- 49 611 63. Apgar, M., et al., *Dietary fiber reduces mortality from secondary sepsis in a murine model*
- 50 612 *of Clostridioides difficile* infection. *iScience*, 2026. **29**(4): p. 115258.
- 51 613 64. Ciarlo, E., et al., *Impact of the microbial derived short chain fatty acid propionate on host*
- 52 614 *susceptibility to bacterial and fungal infections in vivo*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 37944.

- 1
- 2 615 65. Vincent, A.D., et al., *Abnormal absorptive colonic motor activity in germ-free mice is*
- 3 616 *rectified by butyrate, an effect possibly mediated by mucosal serotonin.* Am J Physiol
- 4 617 Gastrointest Liver Physiol, 2018. **315**(5): p. G896-G907.
- 5 618 66. Vicentini, F.A., et al., *Intestinal microbiota shapes gut physiology and regulates enteric*
- 6 619 *neurons and glia.* Microbiome, 2021. **9**(1): p. 210.
- 7 620 67. Wongkrasant, P., et al., *Short-Chain Fatty Acids Activate Myenteric Neurons and Delay*
- 8 621 *Colonic Motility via Free Fatty Acid Receptors 2 and 3 in the Mouse.* Neurogastroenterol
- 9 622 Motil, 2026. **38**(4): p. e70299.
- 10 623 68. Thomasi, B., et al., *Enteric glial S100B controls rhythmic colonic functions by regulating*
- 11 624 *excitability and specificity in gut motor neurocircuits.* J Physiol, 2025. **603**(19): p. 5723-
- 12 625 5749.
- 13 626 69. Grubisic, V., et al., *Enteric glia regulate gut motility in health and disease.* Brain Res Bull,
- 14 627 2018. **136**: p. 109-117.
- 15 628 70. Cossais, F., et al., *Postnatal development of the myenteric glial network and its modulation*
- 16 629 *by butyrate.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2016. **310**(11): p. G941-51.
- 17 630 71. Caetano, M.A.F., et al., *Butyrate Protects Myenteric Neurons Loss in Mice Following*
- 18 631 *Experimental Ulcerative Colitis.* Cells, 2023. **12**(13).
- 19 632 72. Erdmann, P., et al., *Dysregulation of Mucosal Membrane Transporters and Drug-*
- 20 633 *Metabolizing Enzymes in Ulcerative Colitis.* J Pharm Sci, 2019. **108**(2): p. 1035-1046.
- 21 634 73. Thibault, R., et al., *Down-regulation of the monocarboxylate transporter 1 is involved in*
- 22 635 *butyrate deficiency during intestinal inflammation.* Gastroenterology, 2007. **133**(6): p. 1916-
- 23 636 27.
- 24 637 74. He, L., et al., *Evaluation of Monocarboxylate Transporter 4 in Inflammatory Bowel Disease*
- 25 638 *and Its Potential Use as a Diagnostic Marker.* Dis Markers, 2018. **2018**: p. 2649491.
- 26 639 75. Salaga, M., et al., *Activation of Free Fatty Acid Receptor 4 Affects Intestinal Inflammation*
- 27 640 *and Improves Colon Permeability in Mice.* Nutrients, 2021. **13**(8).
- 28 641 76. Fachi, J.L., et al., *Acetate coordinates neutrophil and ILC3 responses against C. difficile*
- 29 642 *through FFAR2.* J Exp Med, 2020. **217**(3).
- 30 643 77. Wang, W., et al., *Butyrate and propionate are microbial danger signals that activate the*
- 31 644 *NLRP3 inflammasome in human macrophages upon TLR stimulation.* Cell Rep, 2024. **43**(9):
- 32 645 p. 114736.
- 33 646 78. Garcia-Juarez, M. and A. Camacho-Morales, *Defining the Role of Anti- and Pro-*
- 34 647 *inflammatory Outcomes of Interleukin-6 in Mental Health.* Neuroscience, 2022. **492**: p. 32-
- 35 648 46.
- 36 649 79. Luo, Y. and S.G. Zheng, *Hall of Fame among Pro-inflammatory Cytokines: Interleukin-6*
- 37 650 *Gene and Its Transcriptional Regulation Mechanisms.* Front Immunol, 2016. **7**: p. 604.
- 38 651 80. Han, K., et al., *Propionate functions as a feeding state-dependent regulatory metabolite to*
- 39 652 *counter proinflammatory signaling linked to nutrient load and obesity.* J Leukoc Biol, 2024.
- 40 653 **115**(4): p. 738-749.
- 41 654 81. Tong, L.C., et al., *Propionate Ameliorates Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis by*
- 42 655 *Improving Intestinal Barrier Function and Reducing Inflammation and Oxidative Stress.*
- 43 656 Front Pharmacol, 2016. **7**: p. 253.
- 44 657 82. Lin, Y., et al., *Progress in Understanding the IL-6/STAT3 Pathway in Colorectal Cancer.*
- 45 658 Onco Targets Ther, 2020. **13**: p. 13023-13032.
- 46 659 83. Wei, Y., et al., *Propionate promotes ferroptosis and apoptosis through mitophagy and*
- 47 660 *ACSL4-mediated ferroptosis elicits anti-leukemia immunity.* Free Radic Biol Med, 2024.
- 48 661 **213**: p. 36-51.
- 49 662 84. Filippone, A., et al., *Sodium Propionate Contributes to Tumor Cell Growth Inhibition*
- 50 663 *through PPAR-gamma Signaling.* Cancers (Basel), 2022. **15**(1).
- 51 664 85. Tang, Y., et al., *Short-chain fatty acids induced autophagy serves as an adaptive strategy*
- 52 665 *for retarding mitochondria-mediated apoptotic cell death.* Cell Death Differ, 2011. **18**(4): p.
- 53 666 602-18.

- 1
2
3 667 86. Chumbler, N.M., et al., *Clostridium difficile* Toxin B causes epithelial cell necrosis through
4 668 an autoprocesing-independent mechanism. PLoS Pathog, 2012. **8**(12): p. e1003072.
5 669 87. Chan, H., et al., *Clostridium difficile* toxin B induces autophagic cell death in colonocytes. J
6 670 Cell Mol Med, 2018. **22**(4): p. 2469-2477.
7 671 88. Lin, X., et al., *Short-chain fatty acids suppresses astrocyte activation by amplifying Trp-*
8 672 *AhR-AQP4* signaling in experimental autoimmune encephalomyelitis mice. Cell Mol Life
9 673 Sci, 2024. **81**(1): p. 293.
10
11 674
12
13 675
14
15 676
16
17 677
18
19 678
20
21 679
22
23 680
24
25 681
26
27 682
28
29 683
30 684
31
32 685
33
34 686
35
36 687
37
38 688
39
40 689
41
42 690
43
44 691
45
46 692
47
48 693
49
50 694
51 695
52
53 696
54
55 697
56
57 698
58
59 699
60
700

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

701 Figure legends

702

703 **Figure 1. Pretreatment with propionate improves GI transit in *C. difficile***
 704 infection (CDI) experimental model and scheme of continuous treatment with propionate (150 mM in drinking
 705 water). (B) Survival curve post-infection. Log-rank (Mantel-Cox) test. (C) Change in body weight of C57BL/6
 706 mice. Line graphs represent mean $\pm$ SEM. Multiple Student's t-test. * $p = 0.02$. (D) Diarrhea score (median
 707 and range) of infected mice and infected mice receiving propionate ($n = 8$). Multiple Mann-Whitney test. * $p =$
 708 0.01, and ** $p = 0.004$. (E) Disease severity score (median and range) of infected mice ($n = 8$) and infected
 709 mice receiving propionate. Multiple Mann-Whitney test. * $p = 0.03$, ** $p = 0.009$ and *** $p = 0.004$. (F) *C. difficile*
 710 shedding in stools in infected mice and infected mice receiving propionate ($n = 6$). Multiple Student's t-test. *
 711 $p = 0.05$, and ** $p = 0.04$. (G) Total GI transit time (TGITT) in minutes (mean $\pm$ SEM) measured by the Evans
 712 blue method. Unpaired Student's t-test.

713

714

715

716

717

718

719

720

721

722

723

724

725

726

727

728

729

730

731

732

733

734

735

736

737

738

739

740

741

742

743

744

745

746

747

748

749

750

751

752

753

754

755

756

757

758

759

760

761

762

714 **Figure 2. Enteric glial cells express receptors and transporters for SCFAs. (A)** Heatmap of gene
 715 expression (Ct values) of *FFAR2*, *FFAR3*, *MCT1*, and *MCT4* in rat enteric glia cells not challenged. (B-E) Gene
 716 expression of *MCT1* (B), *MCT4* (C), *FFAR3* (D), and *FFAR2* (E), in enteric glial cells challenged with TcdA (50
 717 ng/mL) or TcdB (1 ng/mL) for 2h, 12h, and 18h. Mean $\pm$ SEM ($n = 6$), two-way ANOVA followed by the Tukey
 718 test. * $p < 0.03$, ** $p < 0.003$, e *** $p < 0.0001$.

720 **Figure 3. Pretreatment with propionate reduces IL-6 synthesis in enteric glial cells challenged with *C.***
 721 ***difficile* toxins. (A)** The intensity of IL-6 staining was measured in enteric glia exposed to TcdA or TcdB, with
 722 or without 10 mM propionate, after 18 hours. Data are mean $\pm$ SEM ($n = 5$). A one-way ANOVA followed by
 723 Tukey's test was used. (B) Representative images showing IL-6 (pink) immunostaining in enteric glia
 724 challenged with TcdA or TcdB, with or without 10 mM propionate, for 18 hours. The control group involved
 725 cells incubated only with culture media.

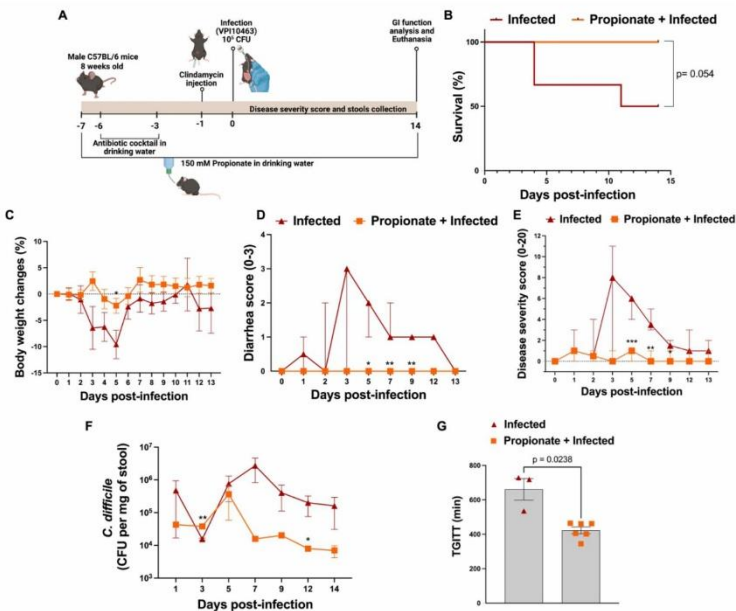
727 **Figure 4. Pretreatment with propionate reduces pSTAT3 nuclear translocation in enteric glial cells**
 728 **challenged with TcdA or TcdB. (A)** The percentage of cells with nuclear pSTAT3 positive staining in enteric
 729 glia exposed to TcdA (50 ng/mL) or TcdB (1 ng/mL), with or without 10 mM propionate, for 18 hours. Data are
 730 mean $\pm$ SEM ($n = 6-7$). (B) Representative images showing pSTAT3 (green), phalloidin (red, cytoplasm marker)
 731 and DAPI (blue) nuclear staining in enteric glia challenged with TcdA (50 ng/mL) or TcdB (1 ng/mL), incubated

1
2 732 or not with 10mM propionate, for 18h. Merge represents the combined image of pSTAT3, phalloidin, and
3
4 733 nuclear staining. **(A-B)** A one-way ANOVA followed by Tukey's test was used. The control group involved cells
5
6 734 incubated only with culture media.
7

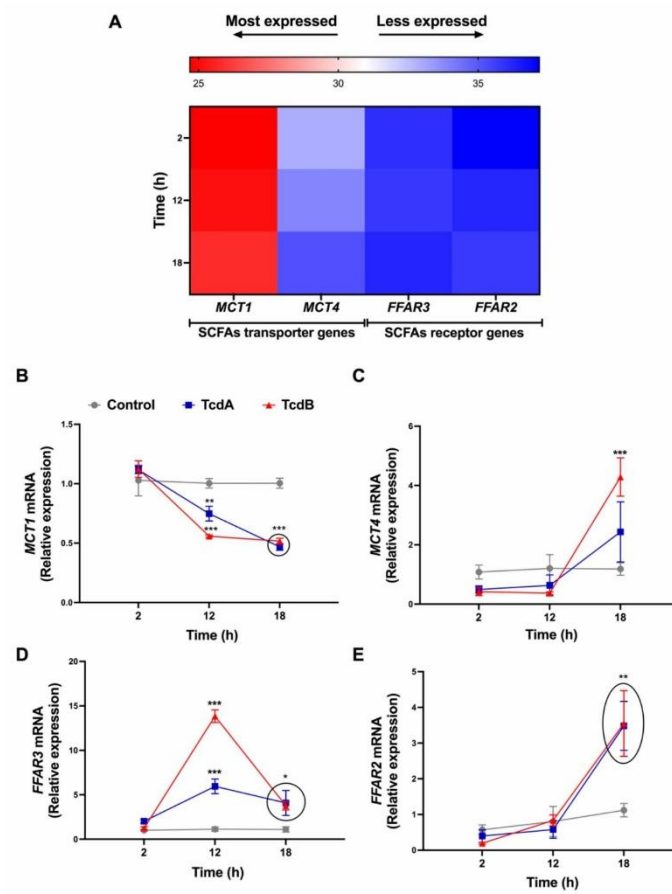
8 735

9
10 736 **Figure 5. Pretreatment with propionate boosts Bcl2 production in enteric glial cells exposed to TcdA**
11
12 737 **or TcdB. (A)** *Bcl2* gene expression was evaluated by qPCR in enteric glia exposed to TcdA (50 ng/mL) or
13
14 738 TcdB (1 ng/mL), with or without 10 mM propionate, for 18 hours. Data are mean $\pm$ SEM (n=5-6). **(B)** The
15
16 739 intensity of Bcl2 staining was measured in enteric glia exposed to TcdA or TcdB, with or without 10 mM
17
18 740 propionate, after 18 hours. Data are mean $\pm$ SEM (n=5). **(C)** Representative images showing Bcl2 (green)
19
20 741 immunostaining in enteric glia challenged with TcdA or TcdB, with or without 10 mM propionate, for 18 hours.
21
22 742 **(A-B)** One-way ANOVA followed by Tukey's test was used. The control group involved cells incubated only
23
24 743 with culture media.
25
26 744

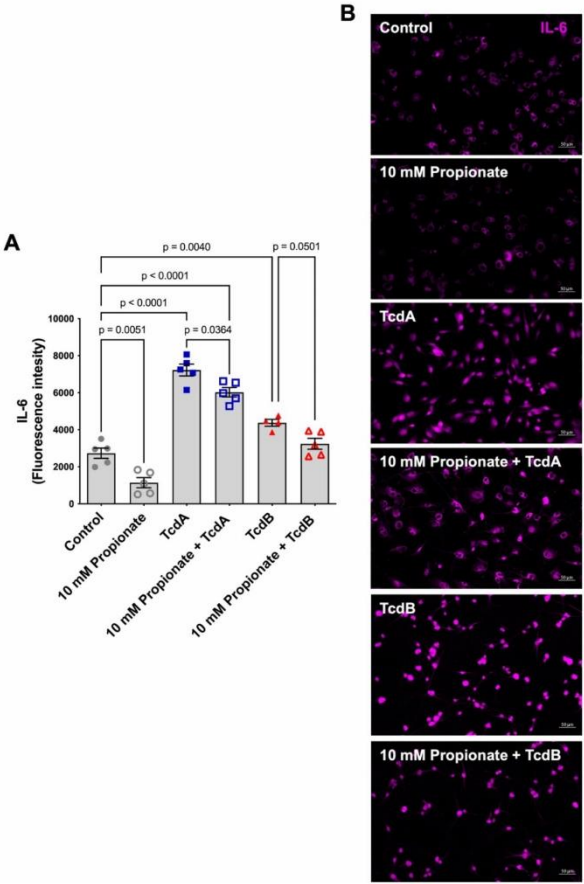
27 745 **Figure 6. Pretreatment with propionate decreases S100B upregulation induced by TcdA or TcdB in**
28
29 746 **enteric glial cells. (A)** *S100B* gene expression was evaluated by qPCR in enteric glia exposed to TcdA (50
30
31 747 ng/mL) or TcdB (1 ng/mL), with or without 10 mM propionate, for 18 hours. Data are mean $\pm$ SEM (n= 6-7).
32
33 748 One-way ANOVA followed by Tukey's test was used. The control group involved cells incubated only with
34
35 749 culture media. **(B)** Summary of the contribution of pretreatment with propionate to prevent GI complications
36
37 750 post-CDI and enteric glial damage promoted by *C. difficile* toxins. In a preclinical model of CDI (top image),
38
39 751 propionate pretreatment decreases disease severity, improves survival, and, after the acute phase of the
40
41 752 disease, reduces *C. difficile* colonization and decreases the delay in TGITT. In vitro, enteric glial cells express
42
43 753 transporters and receptors for SCFAs, which are modified by exposure to *C. difficile* toxins (left bottom image).
44
45 754 In enteric glial cells, TcdA or TcdB promotes cell death, increases expression of proinflammatory mediators
46
47 755 (IL-6 and *S100B*), and nuclear translocation of STAT3 (right bottom image). On the other hand, propionate
48
49 756 supplementation reduces IL-6/STAT3 signaling, increases Bcl2, and decreases *S100B* gene expression in
50
51 757 enteric glial cells challenged with *C. difficile* toxins (right bottom image).
52
53
54
55
56
57
58
59
60



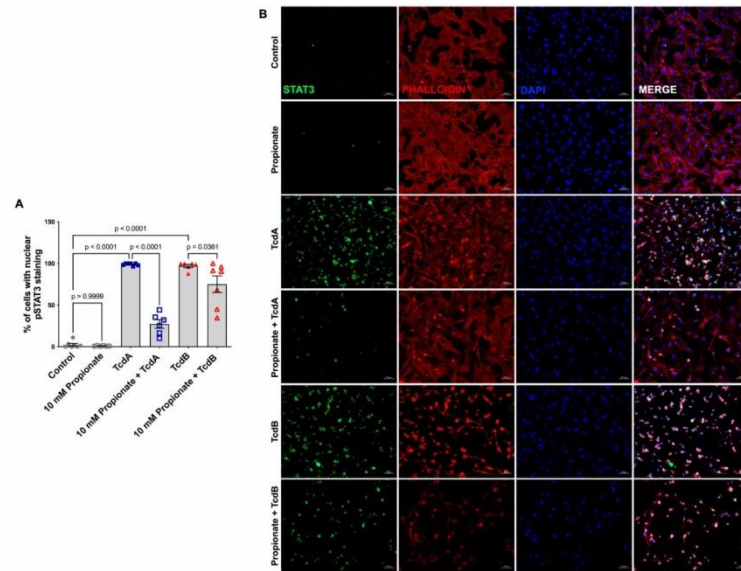
190x157mm (300 x 300 DPI)



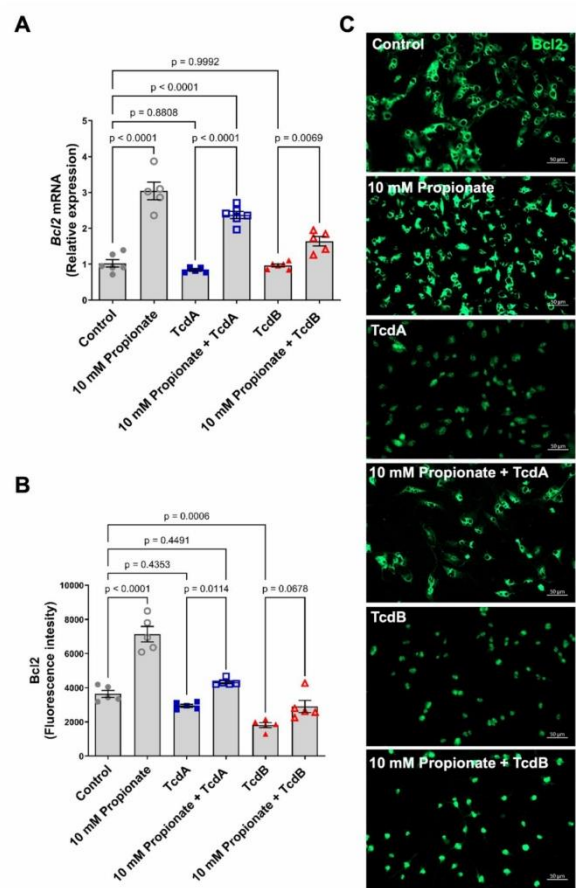
169x221mm (300 x 300 DPI)



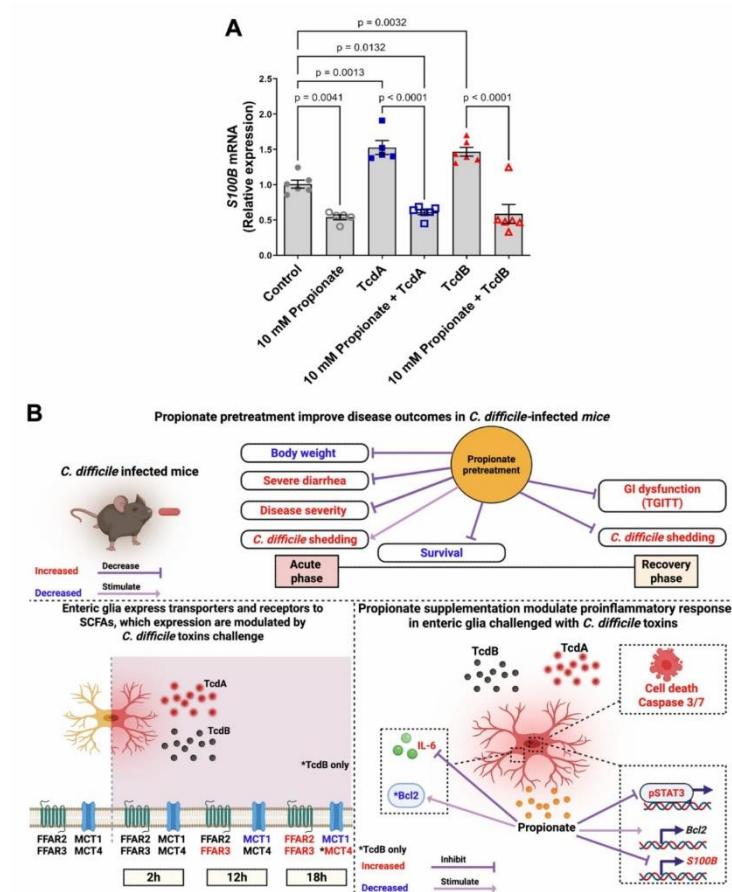
170x222mm (300 x 300 DPI)



190x151mm (300 x 300 DPI)



165x222mm (300 x 300 DPI)



180x222mm (300 x 300 DPI)

Pretreatment with propionate prevents gastrointestinal dysfunction following infection and modulates proinflammatory responses in enteric glia challenged with *Clostridioides difficile* toxins

Andrea V. Loureiro^{1,2*}, Conceição S. M. Rebouças², Renata F. C. Leitão², Cirle A. Warren^{3,4}, Gerly A. C. Brito^{1,2,4*}, Deiziane V. S. Costa^{3,4*}

¹Department of Medical Sciences, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil.

²Department of Morphology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil.

³Division of Infectious Diseases and International Health, University of Virginia, Charlottesville, USA

⁴These authors jointly supervised this work

***Correspondence:** Andrea V. Loureiro, andrea.vianaloureiro@gmail.com; Cirle A. Warren, ca6t@virginia.edu; Gerly A. C. Brito, gerlybrito@hotmail.com; Deiziane V. S. Costa, dv2t@virginia.edu.

Table S1. Primers used in qPCR for investigations of gene expression in rat enteric glia cells.

Gene	Forward	Reverse
<i>GAPDH</i>	AGACAGCCGCATCTTCTTGT	CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT
<i>S100B</i>	TTCAGGGAGAGAGGGTGACAA	CTTCCTGCTCTTTGATTTCCTCC
<i>Bcl2</i>	CAGCATGCGACCTCTGTTTG	CAGGTATGCACCCAGAGTGA
<i>MCT1</i>	CTGTGGGCTTGGTGACCATT	AGGTAGAGGCCTGCGATGAT
<i>MCT4</i>	ATGTGTGTGAACCGCTTTGG	ATGACCCCTGTGGTGAGGTA
<i>FFRA3</i>	CTGCTTCGGCCCTACAATA	GTGCTGAGGAGAAGCACGTA
<i>FFRA2</i>	GGTGTGGTGACGCTTCTTA	GAGGGACTCTGCCTCAAGTG

For Review Only

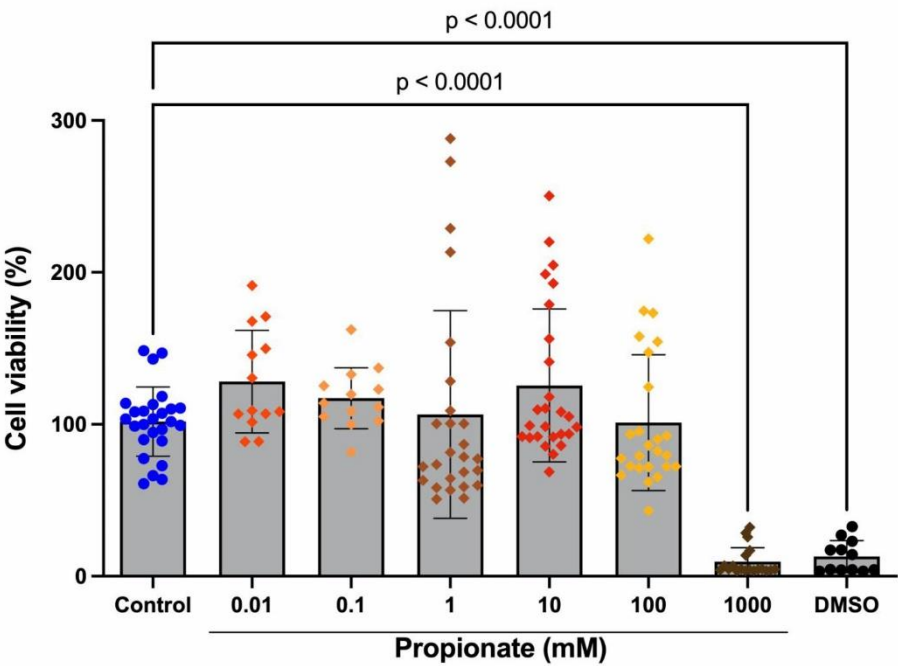


Figure S1. Determination of viable propionate concentrations for exposing enteric glia in vitro. (A) Cell viability assay performed on enteric glia incubated with propionate (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 and 1000 mM), with medium only (control group) or with DMSO (death control group) for 24h. Cell viability was determined by MTT assay. Data are presented as mean $\pm$ SEM (n=7). For statistical analysis, one-way ANOVA followed by Tukey's test was used.

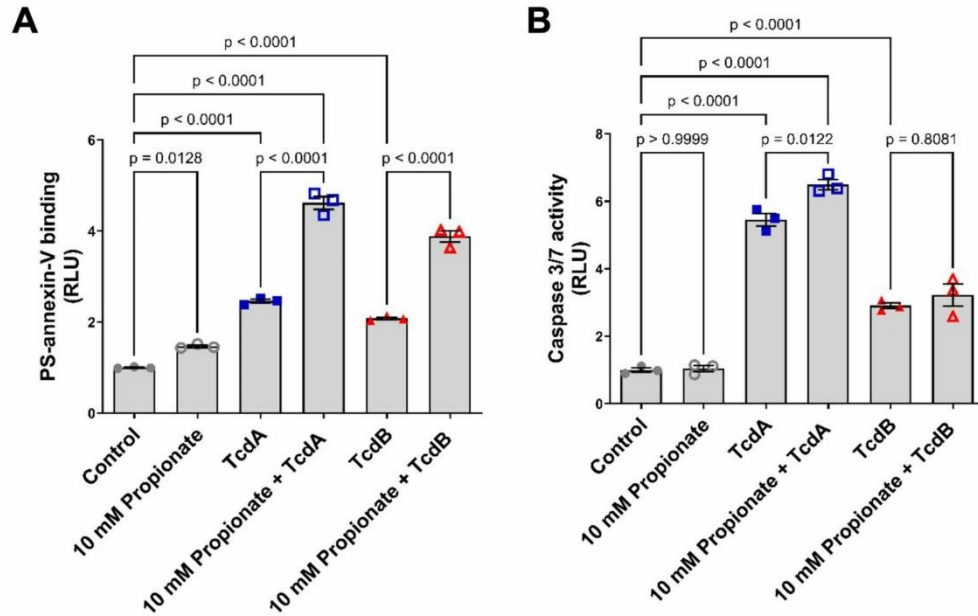


Figure S2. Supplementation with propionate does not prevent cell death in enteric glial cells exposed to TcdA or TcdB. (A) Phosphatidylserine (PS)-annexin V binding, a marker of cell death, was measured in real-time in enteric glia exposed to TcdA (50 ng/mL) or TcdB (1 ng/mL), with or without 10 mM propionate, for 18 hours. Data are shown as mean $\pm$ SEM (n=3). The relative luminescence unit (RLU) reflects the level of PS-annexin V binding. (B) Caspase 3/7 activity was measured in enteric glia exposed to TcdA (50 ng/mL) or TcdB (1 ng/mL), with or without 10 mM propionate, for 18 hours. Data are mean $\pm$ SEM (n=3). (A-B) A one-way ANOVA followed by Tukey's test was used. The control group involved cells incubated only with culture media.

RESEARCH ARTICLE

A Low Concentration of Butyrate has a Protective Action Against the Deleterious Effects of *Clostridioides difficile* Toxins on Enteric Glia

Arkila P. R. Sousa¹  | Andrea V. Loureiro² | Renata F. C. Leitão²  | Cirle A. Warren³ | Gerly A. C. Brito^{1,2}  | Deiziane V. S. Costa³ 

¹Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil | ²Department of Morphology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil | ³Division of Infectious Diseases and International Health, University of Virginia, Charlottesville, Virginia, USA

Correspondence: Renata F. C. Leitão (renata.carvalho@ufc.br) | Gerly A. C. Brito (gerlybrito@hotmail.com) | Deiziane V. S. Costa (dv2t@virginia.edu)

Received: 14 April 2025 | **Revised:** 5 June 2025 | **Accepted:** 25 August 2025

Funding: This project was also partially supported by the FUNCAP/Brazil (PS1-0186-00230.01.00/21).

ABSTRACT

Microbiota, which plays a vital role in susceptibility to *Clostridioides difficile* infection (CDI), synthesizes butyrate. Enteric glia is a component of the enteric nervous system (ENS) and is affected by *C. difficile* toxins A (TcdA) and B (TcdB). Here, we evaluated whether butyrate modulates the response of enteric glia to *C. difficile* toxins. In vitro, rat enteric glia were incubated with TcdA or TcdB alone, or in combination with butyrate 1 h before the toxin challenge. After 18 h incubation, enteric glia were collected to analyze cell death and expression of *Bcl2* (an antiapoptotic factor), *S100B*, and *IL-6* by qPCR. *C. difficile* toxins induced enteric glia death, increased levels of caspase 3/7, downregulated *Bcl2*, and upregulated the expression of pro-inflammatory mediators (*S100B* and *IL-6*). In high concentration, butyrate (200 μ M) potentialized the effects of *C. difficile* toxins in promoting enteric glia death and caspase 3/7 activity. In contrast, a low butyrate concentration (0.2 μ M) decreased enteric glia death and caspase 3/7 activity induced by *C. difficile* toxins. In addition, a low concentration of butyrate (0.2 μ M) upregulated *Bcl2* expression compared to control cells and decreased the downregulation of *Bcl2* and upregulation of *IL-6* induced by TcdB. Further, a low butyrate concentration (0.2 μ M) also diminished *S100B* upregulation induced by TcdA. Our findings suggest that low and high concentrations of butyrate can differentially affect the susceptibility of enteric glia to *C. difficile* toxins. These findings bring new perspectives on how microbiota-derived products may modulate the response of enteric glia to *C. difficile* toxins.

1 | Introduction

Clostridioides difficile (*C. difficile*) is a gram-positive, anaerobic, spore-forming, toxin-producing bacillus [1–3]. *C. difficile* infection (CDI) is considered the tenth leading cause of hospital readmissions and the fifth leading cause of death from gastrointestinal diseases in the United States [4, 5]. In Latin American countries (Argentina, Brazil, Chile, and Mexico), patients with

CDI have a three times greater risk of death and an overall hospital stay of 14.5 days longer compared to patients without the infection [6].

CDI is characterized by intense intestinal inflammation and diarrhea at the peak of the infection and intestinal motility dysfunction post-infection [7]. *C. difficile* toxins A (TcdA) and B (TcdB) are the main virulence factors associated with intestinal

Arkila P.R. Sousa and Andrea V. Loureiro share the first authorship, and Cirle A. Warren, Gerly A.C. Brito, and Deiziane V.S. Costa share the last authorship.

© 2025 Wiley Periodicals LLC.

Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 2025; 39:e70475
<https://doi.org/10.1002/jbt.70475>

1 of 11



Clostridioides difficile (including epidemiology)

Clostridioides difficile infection promotes gastrointestinal dysfunction in human and mice post-acute phase of the disease

Deiziane V.S. Costa^{a,*,**}, Natalie Pham^a, Andrea V. Loureiro^b, Suemin E. Yang^a, Brian W. Behm^c, Cirle A. Warren^{a,*}

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

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

^c Division of Gastroenterology and Hepatology, University of Virginia, Charlottesville, VA, USA



ARTICLE INFO

Handling Editor: Shan Goh

Keywords:

Clostridioides difficile
Irritable bowel syndrome
Gastrointestinal disorders

ABSTRACT

Objectives: In the US, *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) infection (CDI) is the 8th leading cause of hospital readmission and 7th for mortality among all gastrointestinal (GI) disorders. Here, we investigated GI dysfunction post-CDI in humans and mice post-acute infection.

Materials and methods: From March 2020 to July 2021, we reviewed the clinical records of 67 patients referred to the UVA Complicated *C. difficile* clinic for fecal microbiota transplantation (FMT) eligibility. C57BL/6 mice were infected with *C. difficile* and clinical scores were determined daily. Stool samples from mice were collected to measure the shedding of *C. difficile* and myeloperoxidase (MPO) levels. On day 21 post-infection, Evans's blue and FITC-70kDa methods were performed to evaluate GI motility in mice.

Results: Of the 67 patients evaluated at the *C. difficile* clinic, 40 patients (59.7%) were confirmed to have CDI, and 22 patients (32.8%) with post-CDI IBS (diarrhea-type, constipation-type, and mixed-type). In infected mice, levels of MPO in stools and clinical score were higher on day 3. On day 21, mice recovered from body weight loss induced by CDI, and fecal MPO was undetectable. The total GI transit time (TGITT) and FITC-70kDa levels on the proximal colon were increased in infected mice ($p = 0.002$), suggesting a constipation phenotype post-acute phase of CDI. A positive correlation intestinal inflammation on day 3 and TGITT on day 21 was observed.

Conclusion: In conclusion, post-infection intestinal dysfunction occurs in humans and mice post-CDI. Importantly, we have validated in the mouse model that CDI causes abnormal GI transit in the recovery phase of the disease, indicating the potential utility of the model in exploring the underlying mechanisms of post-infectious IBS in humans.

1. Introduction

In the US, *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) infection (CDI) is the eighth leading cause of hospital readmission and seventh for mortality among all gastrointestinal (GI) disorders [1]. *C. difficile* is an anaerobic, Gram-positive, spore-forming bacterium that is transmitted by oral ingestion of spores. Once intestinal microbiota is disrupted by antibiotic use, *C. difficile* spores can germinate and grow into vegetative cells, which in turn secrete toxins [2]. *C. difficile* toxins A (TcdA) and B (TcdB) are the main virulence factors involved in CDI [3–5].

In humans, CDI has been shown to promote long-term GI symptoms after resolution of infection including irritable bowel syndrome (IBS),

gastroesophageal reflux disease (GERD), functional diarrhea, dyspepsia and constipation [6]. IBS and constipation were the most common GI complications in patients post-CDI [6].

The enteric nervous system (ENS), which is formed by enteric glia and neurons, is composed of two major plexuses: submucosal (Meissner's) and myenteric (Auerbach's). The submucosal plexus is situated on the submucosa layer close to circular muscle layer, while the myenteric plexus is located between the circular and longitudinal muscle layers [7]. ENS plays a crucial role in regulating important GI functions such as permeability, secretion and intestinal motility [7]. Previously, we showed that CDI causes changes in the ENS, including loss of enteric neurons and reactive gliosis in the acute phase of the disease [3,4,8].

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: deiziane2009@gmail.com (D.V.S. Costa), ca6t@virginia.edu (C.A. Warren).

<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2024.102837>

Received 30 December 2023; Received in revised form 4 March 2024; Accepted 7 March 2024

Available online 26 March 2024

1075-9964/© 2024 Elsevier Ltd. All rights reserved.



Host and *Clostridioides difficile*-Response Modulated by Micronutrients and Glutamine: An Overview

Andréa V. Loureiro^{1†}, Maria L. L. Barbosa^{2†}, Maria L. G. S. Moraes², Ismael P. Souza², Leticia S. Terceiro¹, Conceição S. Martins², Arkila P. R. Sousa³, Renata F. C. Leitão², Jae H. Shin⁴, Cirle A. Warren^{4†}, Deiziane V. S. Costa^{4†} and Gerly A. C. Brito^{1,2,3*†}

¹ Department of Medical Sciences, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil, ² Department of Morphology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil, ³ Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil, ⁴ Division of Infectious Diseases and International Health, University of Virginia, Charlottesville, Virginia, VA, United States

OPEN ACCESS

Edited by:

Christophe Lacroix,
ETH Zürich, Switzerland

Reviewed by:

Anthony Buckley,
University of Leeds, United Kingdom

*Correspondence:

Gerly A. C. Brito
gerlybrito@hotmail.com

[†]These authors have contributed
equally to this work and share first
authorship

[‡]These authors have contributed
equally to this work and share last
authorship

Specialty section:

This article was submitted to
Nutrition and Microbes,
a section of the journal
Frontiers in Nutrition

Received: 05 January 2022

Accepted: 16 May 2022

Published: 20 June 2022

Citation:

Loureiro AV, Barbosa MLL,
Moraes MLGS, Souza IP, Terceiro LS,
Martins CS, Sousa APR, Leitão RFC,
Shin JH, Warren CA, Costa DVS and
Brito GAC (2022) Host and
Clostridioides difficile-Response
Modulated by Micronutrients and
Glutamine: An Overview.
Front. Nutr. 9:849301.
doi: 10.3389/fnut.2022.849301

Changes in intestinal microbiota are integral to development of *Clostridioides difficile* (*C. difficile*)—associated nosocomial diarrhea. Certain diets, especially Western diets, increase susceptibility to *C. difficile* infection (CDI). Here, we discuss recent findings regarding how nutrients modulate response of the host and *C. difficile* during infection. Calcium has a role in the sporulation and germination process. Selenium is effective in reducing the total amount of *C. difficile* toxin A (TcdA) and toxin B (TcdB) and in decreasing its cytotoxicity. In addition, selenium phosphate synthetase deficiency reduces *C. difficile* growth and spore production. On the other hand, iron has a dual role in *C. difficile* growth. For instance, high intracellular levels can generate reactive hydroxyl radicals, whereas low levels can reduce its growth. In humans, zinc deficiency appears to be related to the recurrence of CDI, in contrast, in the CDI model in mice a diet rich in zinc increased the toxin's activity. Low vitamin D levels contribute to *C. difficile* colonization, toxin production, and inflammation. Furthermore, glutamine appears to protect intestinal epithelial cells from the deleterious effects of TcdA and TcdB. In conclusion, nutrients play an important role in modulating host and pathogen response. However, further studies are needed to better understand the mechanisms and address some controversies.

Keywords: *Clostridium difficile*, calcium, selenium, iron, zinc, vitamin D, glutamine

INTRODUCTION

Clostridioides difficile (*C. difficile*), a gram-positive, spore-forming, toxin-producing anaerobic bacterium, is a major cause of nosocomial diarrhea associated with antibiotic use (1, 2). Age (>65 years), female gender, comorbidities (such as chronic kidney disease, diabetes mellitus, leukemia, cancer, and inflammatory bowel disease), hospitalization, and immunosuppression are risk factors for acquiring *C. difficile* infection (CDI) (3). The incidence of CDI worldwide increased between 2001–2011, when it is stabilized (4). However, it remains a challenge in hospitals around the world and in the community. In European hospitals, seven cases of CDI occur for every 10,000 patients, costing ~\$6,000 for each first case of CDI (5, 6). CDI is the tenth cause of 30-day readmission scans