



**Universidad
Andrés Bello**

UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Caracterización de la vía endocítica de esporas de *Clostridium difficile* en células epiteliales intestinales y su implicancia en infecciones recurrentes de *Clostridium difficile* en un modelo murino.

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar
al Grado de **Magíster en Biotecnología**.

Profesor Patrocinante:

Dr. Daniel Paredes-Sabja.

Microbiota-Host Interactions and Clostridia Research Group.

Facultad de Ciencias Biológicas.

República 217, 3° piso.

Universidad Andrés Bello.

Pablo Andrés Castro Córdova.

Santiago, Chile.

Diciembre, 2016



**Universidad
Andrés Bello**

UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Caracterización de la vía endocítica de esporas de *Clostridium difficile* en células epiteliales intestinales y su implicancia en infecciones recurrentes de *Clostridium difficile* en un modelo murino.

PABLO ANDRÉS CASTRO CÓRDOVA.

Este trabajo fue elaborado bajo la supervisión del Director de Tesis Dr. Daniel Paredes-Sabja, en el laboratorio *Microbiota-Host Interactions and Clostridia Research Group*, Universidad Andrés Bello, aprobado por los miembros de la Comisión de evaluación.

Dr. Daniel Paredes-Sabja
Director de Tesis

Dra. Carolina Otero
Comisión de Tesis

Dr. Juan Fuentes
Comisión de Tesis

Santiago-Chile
Año 2016

*“Para los árboles, el paso del tiempo es diferente que para los hombres...
Sol, tierra, agua y aire; esas son las cosas de las que ellos entienden.
No de días, ni los años, ni de siglos.
Para los hombres el tiempo es un río torrentoso,
y estamos atrapados en su corriente;
nos tumbamos del pasado al presente, siempre en la misma dirección.
Las vidas de los árboles son diferentes,
enraízan, crecen y mueren en el mismo sitio,
y el río no los arrastra, ni siquiera lo perciben.
Los humanos, sin embargo,
nos damos cuenta de que estamos en la corriente, y nos impacienta.
Nos da la necesidad de saber,
entender e intervenir el entorno para desviar la corriente
tanto como podamos.*

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no habría sido completado sin la ayuda, apoyo y paciencia de muchos de ustedes...

A mi amada familia en particular padres y hermanas, mi cuñado, mis sobrinos, mis tíos y primos, a mis amigos y personas especiales en mi vida. Es decir, a todos mis seres queridos, quienes han sido y serán, mis desinteresados benefactores. No podría sentirme más grato y ameno con la confianza que han depositado sobre mí, en especial cuando he contado con vuestro apoyo desde antes que pueda recordar. Este trabajo que en un principio parecía colosal e interminable, no lo habría alcanzado sin su apoyo...

A mis leales amigos, algunos distantes, pero siempre presentes, por brindar su apoyo y energía en las buenas y en las malas, por siempre confiar en mí y en que este trabajo sería viable.

A mi tutor y amigo, Dr. Daniel Paredes-Sabja, por tener la responsabilidad de cuidar parte de los saberes del mundo, y permitirme, junto a mis compañeros expandir nuestro conocimiento y por ayudarnos a cumplir nuestro sueño de superarnos y cada día ser mejores personas que ayer.

A todos mis formadores que me acompañaron durante todo este periodo educativo desde mis primeros años de aprendizaje. Todas personas de enorme sabiduría que, gracias a sus ganas de compartir su saber, me otorgaron esa hambre por el conocimiento y me heredaron valiosas herramientas que me han permitido explorar en este complejo y maravilloso mundo de la ciencia.

A la Universidad Andrés Bello, por haber confiado en mí, y haberme brindado un gran apoyo, y haberme permitido estudiar esta carrera.

Y por sobre todo agradecer a Dios, por permitirnos compartir juntos la magia de la vida.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
SUMMARY	2
INTRODUCCIÓN.....	3
<i>Clostridium difficile</i> y su impacto en el mundo.....	3
Epidemiología y Factores de Riesgo.	4
Patogénesis de <i>Clostridium difficile</i>	5
Modelos animales de estudio para las ICD.....	7
Implicancia de la spora en transmisión, iniciación y persistencia de la ICD.....	9
Entrada como mecanismo de persistencia.	10
Vías de endocitosis.	11
HIPÓTESIS	15
OBJETIVO GENERAL	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
METODOLOGÍA.....	16
Obtención de esporas.....	16
Cultivo celular.	16
Tratamiento de muestras para análisis por Microscopía Electrónica de Transmisión.	16
Ensayos de infección con esporas de <i>C. difficile</i> a líneas celulares.....	17
Ensayo de viabilidad celular.	18
Inhibidores Farmacológicos.....	19
Ensayo de Infección e inmunofluorescencia de esporas de <i>C. difficile</i> y marcaje de caveolina-1 y clatrina.	20
Infección con esporas etiquetadas para colocalización con macropinosomas.	21
Animales.....	21

Determinación de esporas intracelulares <i>in vivo</i>	22
Infección en ratones C57BL/6.	22
Toma de peso y determinación de puntuación de diarrea.....	23
Determinación de unidades formadoras de colonia de esporas de <i>C. difficile</i> en deposiciones.....	23
Necropsia y toma de muestras biológicas.	24
Citotoxicidad del contenido cecal.	24
Histología el ciego y el colon.	25
Abundancia de esporas en el tejido colónico.	25
RESULTADOS	26
Vesículas de clatrina, caveolina y macropinocitosis se encuentran cercanas a esporas de <i>C. difficile</i> adheridas a células epiteliales.	26
Clatrina y caveolina-1 se asocian alrededor de esporas de <i>C. difficile</i>	28
Esporas de <i>C. difficile</i> se asocian a macropinosomas y promueven un reordenamiento de citoesqueleto de actina.	30
Uso de inhibidores de la vía endocítica de clatrina reduce el proceso de entrada de esporas de <i>C. difficile</i> en células epiteliales intestinales.....	32
Uso de inhibidores de la vía endocítica de caveolina y de las Src-quinasas reduce el proceso de entrada de esporas de <i>C. difficile</i> en células epiteliales intestinales.	33
La liberación de vesículas recubiertas de clatrina o caveolina mediada por dinamina, es crucial para el proceso de entrada de esporas.	35
EL uso de fármacos inhibidores de macropinocitosis reduce el proceso de entrada de esporas de <i>C. difficile</i> en células epiteliales intestinales.....	36
Esporas de <i>C. difficile</i> son capaces de entrar en células intestinales <i>in vivo</i>	38
Un fármaco de uso comercial es capaz de reducir la entrada de esporas <i>in vitro</i>	39
La sustancia X es capaz de reducir los casos de ICD-R.	40
La sustancia X no reduce el daño del epitelio intestinal durante la ICD-R.	44

La sustancia X disminuye la carga de esporas en el tejido colónico, pero no la citotoxicidad del contenido cecal.	44
DISCUSIÓN.....	48
CONCLUSIONES	53
PROYECCIONES.....	54
REFERENCIAS.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Sales biliares tienen un impacto en la patogénesis ICD.	6
Figura 2: Esporas de <i>C. difficile</i> cepa 630 ingresa a células T84.	10
Figura 3: Esporas de <i>C. difficile</i> son capaces de entrar en células epiteliales intestinales y vesículas de clatrina, caveolina y vesículas tipo macropinosomas se encuentran cercanas a esporas adheridas.....	28
Figura 4: Esporas de <i>C. difficile</i> se asocian a vesículas recubiertas de clatrina y caveolina.	29
Figura 5: Esporas de <i>C. difficile</i> se asocian a macropinosomas y citoesqueleto de actina.	31
Figura 6: Entrada de esporas de <i>C. difficile</i> a células epiteliales es reducida por fármacos inhibidores de la vía endocítica de clatrina requiere de vesículas de clatrina.	32
Figura 7: Entrada de esporas de <i>C. difficile</i> a células epiteliales es reducida por fármacos inhibidores de la vía endocítica de caveolina y de señalización por Src-quinasa.	34
Figura 8: La liberación de vesículas de clatrina y caveolina es requerida para el ingreso de esporas de <i>C. difficile</i>	36
Figura 9: Esporas de <i>C. difficile</i> ingresan por macropinocitosis.....	37
Figura 10: Esporas de <i>C. difficile</i> son capaces de entrar en células de intestino delgado y grueso de ratón.....	38
Figura 11: Entrada de esporas de <i>C. difficile</i> a células epiteliales intestinales es inhibida por la sustancia X.	39
Figura 12: La administración por vía intraperitoneal de la sustancia X reduce la diarrea de la infección por <i>C. difficile</i> recurrente.....	42
Figura 13: La administración por vía oral de la sustancia X reduce la diarrea de la infección por <i>C. difficile</i> recurrente.....	43
Figura 14: La sustancia X no reduce el daño histológico durante la ICD-R en ratones tratados.....	45

Figura 15: La sustancia X reduce la carga de esporas del tejido colónico, pero no la citotoxicidad del contenido cecal. 46

ÍNDICE ANEXOS

Anexo 1. Esporas de <i>C. difficile</i> endocitadas no son etiquetadas por anticuerpos IgG...	65
Anexo 2. Todas las esporas de <i>C. difficile</i> R20291 son reconocidas por IgG de cabra anti-espora e IgY de gallina anti-espora.	66
Anexo 3. Posiblemente anticuerpo IgY anti-espora, es capaz marcar esporas de <i>C. difficile</i> R20291 internalizadas.	67
Anexo 4. Esporas de <i>C. difficile</i> R20291 se asocian a marcador de endosoma temprano y a Galectina-3.	68
Anexo 5. Criterios para determinación de puntaje histológico de tejido epitelial.	69
Anexo 6. La sustancia X no reduce el crecimiento de las células vegetativas de <i>C. difficile</i> ni reduce los efectos citotóxicos de sus toxinas.....	70
Anexo 7. Vinculación entre la puntuación de diarrea y la carga de esporas de <i>C. difficile</i> en el colon de ratones infectados.	71

LISTA DE ABREVIATURAS

ARN:	Ácido ribonucleico
CEI:	Células epiteliales intestinales.
cm ² :	Centímetro cuadrado.
CPZ:	Clorpromazina.
DPBS:	Tampón fosfato salino de Dubelcco (del inglés <i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>).
DYN:	Dynasore.
EIPA:	5-(N-etil-N-isopropil) amilorida.
h:	hora(s).
ICD:	Infección por <i>C. difficile</i> .
ICD-R:	Infección recurrente por <i>C. difficile</i> .
IgG:	Inmunoglobulina G.
INDO:	Indometacina.
LY:	LY294.002.
MET:	Microscopía electrónica de transmisión.
min:	Minuto(s).
MOI:	Multiplicidad de infección (del inglés <i>multiplicity of infection</i>).
MTT:	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.
ODF:	Óxido de fenilarsina.
PaLoc:	Locus de patogenicidad (del inglés <i>pathogenicity locus</i>).
PBS:	Tampón fosfato salino (del inglés <i>phosphate-buffered saline</i>).
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>polymerase chain reaction</i>).
PFA:	Paraformaldehído.
SFB:	Suero fetal bovino.
SHN:	Suero humano normal.
TA:	Temperatura ambiente.
TCCFA:	Medio Taurocolato Cicloserina Cefoxitina Fructosa Agar.

UFC: Unidad formadora de colonia.
VIH: Virus de inmunodeficiencia humana.
WM: Wortmanina.

RESUMEN

Clostridium difficile es un patógeno Gram-positivo, anaerobio estricto y formador de esporas. Este patógeno es el responsable de la mayoría de muertes causadas por diarreas asociadas a antibióticos. Las infecciones por *C. difficile* (ICD) tienen una elevada tasa de recurrencia, que varía entre el 20% después del primer episodio, a un 40 y 60% después del segundo y tercero, respectivamente. Se ha demostrado que las esporas son el morfotipo de transmisión y persistencia de *C. difficile* para generar infecciones por *C. difficile* recurrentes (ICD-R). Sin embargo, poco es conocido sobre los mecanismos de persistencia de las esporas en el hospedero. En este sentido, datos no publicados de nuestro laboratorio demuestran que las esporas de *C. difficile* son capaces de entrar en células epiteliales intestinales (CEIs) en un proceso dependiente de la polimerización actina, el cual podría ser uno de los mecanismos de persistencia. El objetivo de esta tesis es identificar las vías de endocitosis involucradas en la entrada de las esporas de la cepa R20291 de *C. difficile* y evaluar si el uso de inhibidores de la endocitosis de esporas reducen los casos de ICD-R en un modelo murino. En este trabajo encontramos que: i) mediante análisis de micrografías electrónicas de transmisión, microscopía confocal de fluorescencia e inhibidores farmacológicos, las esporas de *C. difficile* se asocian y requieren vesículas de clatrina, caveolina, y macropinosomas para ingresar a las células; ii) el uso de un inhibidor de endocitosis en ratones infectados por *C. difficile*, redujo la incidencia de diarrea durante la ICD-R en un 67% y un 80% al ser administrados de forma intraperitoneal y oral respectivamente, lo cual sugiere que la endocitosis de esporas es el mecanismo de persistencia de *C. difficile* en el hospedero para generar ICD-R. En consecuencia, este trabajo amplía las aristas para generar terapias farmacológicas combinadas para tratar infecciones recurrentes por *C. difficile*.

SUMMARY

Clostridium difficile is a Gram positive, strict anaerobic and spore-former pathogenic bacterium. This pathogen is the main responsible of deaths caused by antibiotic associated diarrhea. *C. difficile* infections have high recurrence rates that may reach up to 20% after a second episode, to a 40% and 60% after the second and third, respectively. It has been demonstrated that *C. difficile* spores are the morphotype of transmission and persistence to generate recurrent *C. difficile* infection (R-CDI). However, the mechanism(s) of spore persistence in the host remain unclear. Unpublished data from our laboratory demonstrate that *C. difficile* spores are able to enter intestinal epithelial cells, in an actin-dependent process. The main aim of this thesis is to identify the endocytic pathways involved in the entry of *C. difficile* R20291 spores and evaluate whether the use of endocytosis inhibitors can reduce the cases of R-CDI in a murine model. In this work, our results show that: i) through transmission electron microscopy, confocal microscopy and pharmacological inhibitors that some *C. difficile* spores are associated with clathrin, caveolin and macropinocytosis, and the use of endocytic inhibitors associated to each pathway reduces the entry into intestinal epithelial cells, and that the use of spore entry inhibitors *in vivo* reduced the cases of diarrhea during R-CDI by 67% and 80% upon intraperitoneal and oral administration respectively.

In summary, this work demonstrates that spore-entry to intestinal epithelial cells may represent a mechanism of persistence of *C. difficile* in the host, and have possible implications in recurrent episodes of CDI. In consequence, this work increases the therapeutics blank to make combined pharmacological therapies to treat R-CDI.

INTRODUCCIÓN

***Clostridium difficile* y su impacto en el mundo.**

Las diarreas asociadas a los antibióticos han afectado a la población desde el comienzo de su uso. No obstante, a partir del año 2000 la incidencia mundial ha ido en aumento. *C. difficile* es el principal agente responsable de colitis asociadas a antibióticos presente en el ~30% al ~60% de los casos (Pépin *et al.*, 2004; Boletín ISP Chile, 2014; Report CDC DHHS, 2013), convirtiéndose en el principal patógeno de transmisión intrahospitalaria en países desarrollados. Entre el 0,6 a un 2,1% del total de pacientes hospitalizados en el mundo son afectados por *C. difficile*, de los cuales el ~1 al 5% muere (Herrera *et al.*, 2003; Karas *et al.*, 2010; Zilberberg *et al.*, 2008). Gran parte de los pacientes afectados responde bien al tratamiento consistente en vancomicina o metronidazol; sin embargo, el 20% presenta una infección recurrente. La probabilidad de recurrencia puede incrementar hasta un 40 o 60% en un segundo o tercer episodio respectivamente, lo cual finalmente puede terminar en una colectomía o en la muerte (Hernández-Rocha *et al.*, 2012; McFarland *et al.*, 1994). Según el último reporte del año 2013 emitido por *U.S Department of Health and Human Services: Centers for Disease and Prevention*; anualmente en Estados Unidos al menos 250.000 personas son hospitalizadas a causa de ICD, de las cuales, 14.000 mueren, generando en su conjunto un costo al sistema de salud de mil millones de dólares anuales (Report CDC DHHS, 2013). Datos no publicados de nuestro laboratorio indican que en Chile al menos 16600 casos positivos para *C. difficile* ocurren anualmente, lo cual genera un gasto al sistema de salud de alrededor de 8,17 millones de dólares anualmente.

Las epidemias intrahospitalarios de ICD de la última década se han caracterizado por ser masivos y graves, principalmente los ocurridos en Canadá y en Estados Unidos, los que estarían relacionados a la aparición de cepas de alta virulencia del toxinotipo III y PCR-ribotipo 027, las que tienen la capacidad de producir 10 veces más toxinas que cepas de brotes anteriores (O'Connor *et al.*, 2009; Pépin *et al.*, 2005; Warny *et al.*, 2005). Las epidemias producidas por estas cepas tienen una menor respuesta al tratamiento convencional y una mayor probabilidad de recurrencia (Hookman y Barkin, 2009). En consecuencia, las epidemias de *C. difficile* están siendo causadas por cepas de *C. difficile*

que tienen una mayor capacidad infectiva, de persistencia y recurrencia, los cuales están asociadas a una mayor probabilidad de muerte.

Epidemiología y Factores de Riesgo.

Aunque, las esporas de *C. difficile* son ubicuas, existen factores de riesgo que están relacionados con mayor probabilidad de presentar ICD. Entre ellos están los tratamientos que alteran la flora intestinal y/o el sistema inmune como los antimicrobianos o quimioterapia. Influyendo también la condición de limpieza de las salas hospitalarias. Por otro lado, existen factores de riesgo asociados al estado de salud del paciente, por ejemplo, que presenten co-morbilidades, inmunosupresión (VIH), cáncer, enfermedades gastrointestinales como la enfermedad inflamatoria intestinal. Asimismo adultos mayores de 65 años y/o pacientes que hayan sido hospitalizados previamente tienen mayor probabilidad de presentar una ICD (Hernández-Rocha *et al.*, 2012; Hookman y Barkin, 2009; Sanchez *et al.*, 2005). *C. difficile* es conocido por ser el principal patógeno asociado a infecciones nosocomiales en centros de atención de salud, lo cual sugiere que éstos estarían actuando como reservorios del morfotipo de persistencia de *C. difficile*, las esporas (Hernández-Rocha *et al.*, 2012).

Las esporas de *C. difficile* son transmitidas por contacto directo entre el paciente y el personal del hospital, quienes pueden diseminarlas a otros pacientes que presentan las condiciones propicias para generar una ICD (Guerrero *et al.*, 2012); es por esto que la mayoría de los estudios existentes son realizados en pacientes hospitalizados y existen pocos trabajos basados en estudios poblacionales. Uno de ellos fue realizado por un grupo de Olmsted Country en Minnesota, quienes determinaron que el 41% de los casos positivos para *C. difficile* fueron adquiridos por la población fuera del hospital, además se observó que entre 1991 y 2005 los casos adquiridos fuera del hospital y los adquiridos en hospital aumentaron en 5.3 veces y 19.3 veces respectivamente. Cabe considerar que los pacientes que adquirieron *C. difficile* fuera de recintos hospitalarios eran jóvenes sin antecedentes de exposición a los factores de riesgo anteriormente descritos, (Khanna *et al.*, 2012).

Patogénesis de *Clostridium difficile*.

C. difficile es un bacilo Gram-positivo, anaerobio estricto que posee la capacidad de generar esporas (Sarker y Paredes-Sabja, 2012). Fue aislado por primera vez de heces de un niño sano en 1935 (Hall y O'Toole, 1935) y el nombre de la especie reflejaba inicialmente la dificultad de su cultivo y aislamiento (Kelly y LaMont, 2008), no obstante, las colitis pseudomembranosas fueron descritas por primera vez en 1893 (Finney, 1893), pero no fue hasta 1978 en que se asoció *C. difficile* con colitis pseudomembranosas en humanos y se descubrió que era el organismo responsable de la mayoría de los casos de diarreas asociadas a antibióticos (Bartlett *et al.*, 1978; George *et al.*, 1978).

Las esporas entran al sistema digestivo por ingesta oral, y no son degradadas por los jugos gástricos, logrando llegar sin dificultad al intestino delgado, lugar donde las sales biliares como el queno-desoxicolato y el taurocolato son liberadas, y actúan como germinantes de esporas de *C. difficile* las que se transforman en células vegetativas; sin embargo, estas no toleran las concentraciones de oxígeno aún presentes y mueren (Sorg y Sonenshein, 2009). El 5% de las sales biliares ingresan al intestino grueso, zona carente de oxígeno y lugar donde las sales biliares primarias como el queno-desoxicolato y el taurocolato son convertidas en sales biliares secundarias por hidrolasas del metabolismo de bacterias de la microbiota normal, generando deoxicolato, entre otras (Figura 1) (Sorg y Sonenshein, 2010). El deoxicolato inhibe el crecimiento de las células vegetativas de *C. difficile* (Ridlon *et al.*, 2006; Sorg y Sonenshein, 2010). Por lo tanto, en pacientes sanos *C. difficile* no podría colonizar (Figura 1). No obstante, cuando la microbiota normal es alterada por antimicrobianos, en el colon se genera un incremento de los niveles de queno-desoxicolato y taurocolato, desencadenando la germinación de esporas de *C. difficile* y su crecimiento ya no es inhibido debido a la baja disponibilidad de sales biliares secundarias, lo que permite que *C. difficile* prolifere y cause la ICD (Figura 1) (Sorg y Sonenshein, 2008; Wilson *et al.*, 1982; Wilson, 1983).

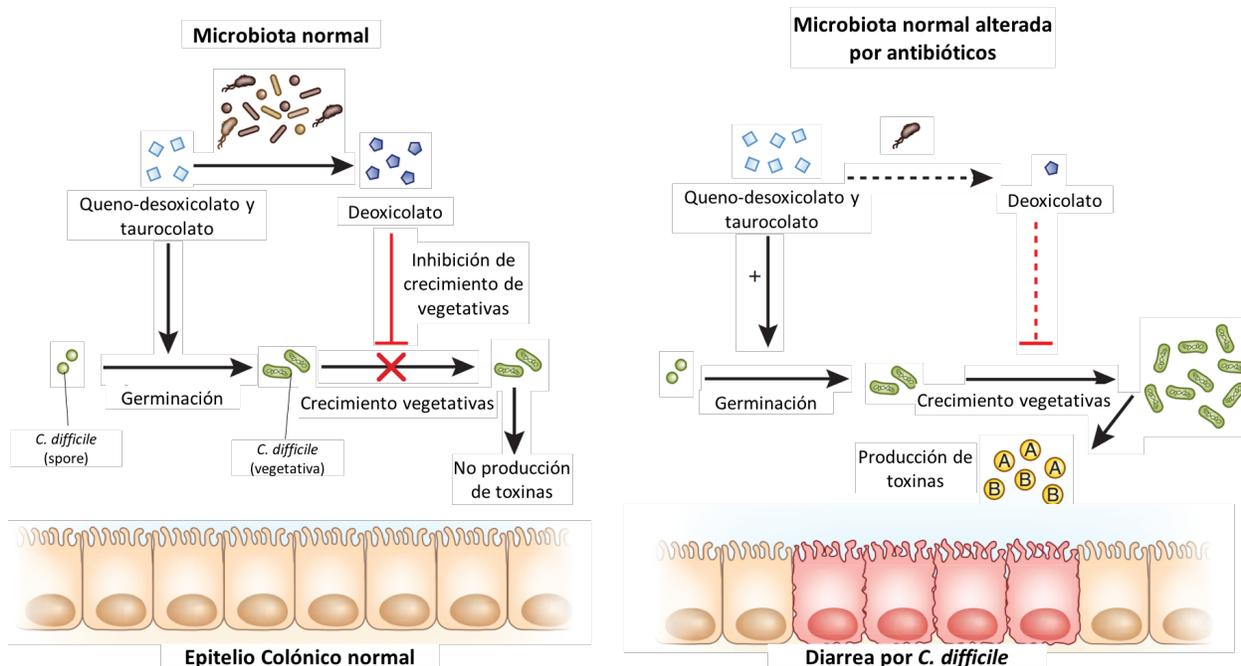


Figura 1: Sales biliares tienen un impacto en la patogénesis ICD.

Sales biliares primarias como queno-desoxicolato y taurocolato producidas por el hígado son liberadas en el intestino delgado donde circulan, actuando como germinantes para esporas de *C. difficile* para transformarlas en células vegetativas. Principalmente en el ciego, las sales biliares primarias son convertidas en sales biliares secundarias como el deoxicolato por miembros de la microbiota intestinal normal. Las sales biliares secundarias, inhiben el crecimiento de células vegetativas, lo cual evita la producción de toxinas y la consecuente diarrea. En una ICD, la alteración de la microbiota intestinal, permite una disminución de la conversión de sales biliares primarias a secundarias, de esta forma, incrementa el crecimiento células vegetativas de *C. difficile* y la subsecuente colitis mediada por toxinas. Traducida del inglés de Taur y Pamer, (2014).

El principal factor de virulencia de *C. difficile* son las toxinas (Goulding *et al.*, 2009), las cuales se encuentran codificadas en una isla de patogenicidad llamada *locus* de patogenicidad (PaLoc). En esta región se encuentran los genes codificantes para la enterotoxina TcdA, y para la citotoxina TcdB (Goulding *et al.*, 2009). Estas toxinas ingresan a las células epiteliales mediante endocitosis mediada por clatrina (Papatheodorou *et al.*, 2010), produciendo la glicosilación de las proteínas Rho, y en consecuencia la disgregación de los filamentos de actina y la redistribución de las uniones estrechas (Voth y Ballard, 2005). Ambas toxinas activan los nervios entéricos, induciendo la producción de neuropéptidos como la sustancia P y neurotensina (Keates *et al.*, 1998;

Pothoulakis *et al.*, 1998), las que actúan sobre las células epiteliales del intestino y generan liberación de cloruro al medio extracelular con el consecuente arrastre de agua, generando la diarrea (Castagliuolo *et al.*, 1999).

Durante el curso de la infección, *C. difficile* genera esporas (Denève *et al.*, 2009; Roberts *et al.*, 2008), las cuales pueden ser eliminadas por las heces o bien, pueden persistir en el intestino durante el tratamiento antimicrobiano contra *C. difficile*, hasta que los antibióticos son suspendidos, y las esporas persistentes en el intestino podrían germinar y provocarían una recurrencia del cuadro clínico (Baines *et al.*, 2009).

Modelos animales de estudio para las ICD.

Las ICD han sido estudiadas en una amplia variedad de modelos animales, como hámster, conejillos de indias, conejos, ratas, ratones comunes, ratones y lechones libre de gérmenes (Abrams *et al.*, 1980; Czuprynski *et al.*, 1983; Fekety *et al.*, 1979; Knoop, 1979; Pawlowski *et al.*, 2010). De todos estos, los modelos de ratón y lechones se asemejan de mejor manera a los síntomas de la ICD en seres humanos. Uno de estos modelos consisten en administrar una mezcla de cinco antibióticos y un dosis de clindamicina a ratones unos días antes de ser infectados por *C. difficile* (Chen *et al.*, 2008).

Para cada uno de los modelos disponibles existen ventajas y desventajas, la utilización de uno u otro depende de la complejidad y la conveniencia de utilizar un modelo, y de la pregunta científica que vaya a plantearse.

La importancia principal de elegir uno u otro modelo depende de que las características a evaluar sean similares a las observadas en humanos. La enfermedad que se manifiesta en los diferentes modelos animales está influenciada por la respuesta inmune a la infección. Gran parte estos animales, necesitan ser tratados previamente con antibióticos para inducir la ICD. El modelo de hámster, los animales son pretratados con clindamicina, y desafiados con cepas toxigénicas de *C. difficile* y los hámster desarrollan colitis hemorrágica con presencia de diarrea, y también otros síntomas fulminantes como pelaje alborotado, encorvamiento y letargo, terminando con la muerte (Bartlett *et al.*, 1977; Price *et al.*, 1979). La infección en hámster ocurre en el ciego, y no en el colon como ocurre en humanos (Price *et al.*, 1979). Sin embargo, han sido ampliamente

utilizados como modelo para estudio de ICD. El uso del modelo de ratón ha sido el favorito, dado que han incrementado los métodos para inducir la susceptibilidad a la enfermedad en ratones y la alta disponibilidad de agentes tales como anticuerpos para desarrollar un análisis de muestras de tejido en detalle. Ratones no tratados con antibióticos no son susceptibles a la infección por *C. difficile*, debido a la resistencia a la colonización por la microbiota residente. Además los ratones pueden ser portadores asintomáticos persistentes que eliminan un bajo número de esporas (Lawley *et al.*, 2009). De igual modo que en humanos, la susceptibilidad a la infección de ratones debe ser inducida por la disrupción de la microbiota por medio de tratamiento antibiótico. Tres modelos de infección han sido descritos. Uno de ellos utiliza ratones xenobióticos o libres de gérmenes (Pawlowski *et al.*, 2010; Reeves *et al.*, 2012), el segundo utiliza un solo antibiótico para inducir la susceptibilidad (Buffie *et al.*, 2012) y el tercero utiliza un cóctel de antibióticos para provocar una disrupción de las comunidades de la microbiota normal y reproduciblemente induce la infección (Chen *et al.*, 2008). Este último modelo simula bastante bien las características claves de la ICD en humanos, incluyendo diarrea, pérdida de peso y daño histológico. Este modelo luego fue utilizado como base para inducir la recurrencia de la infección, lo cual imita aspectos comunes de la infección en humano (Sun *et al.*, 2011) y también ha sido utilizado para estudiar las ICD, y también como para mejorar la comprensión de los tratamientos actuales. Además, se ha observado variación entre ratones infectados con la misma cepa, donde no todos los ratones del grupo, muestran los mismos síntomas de la infección. Por ejemplo Reeves *et al.*, 2011, reportó que ratones infectados con la cepa VPI 10463 (10^5 esporas) coloniza a todos los ratones, pero 7 de 12 ratones presentó signos de la infección. Otro estudio, donde se utilizó la cepa UK1, reportó una mortalidad de 30% y diarrea en el 70% de los ratones (Sun *et al.*, 2011). En sus trabajos concluyen que cuando las dosis de inóculo son bajas, existe mayor variabilidad, y a mayores dosis de infección, se genera una infección más consistente, aunque dependerá de la cepa y del modelo de ratones utilizado para permitir la susceptibilidad para la CDI. (Chen *et al.*, 2008; Reeves *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2011).

Para estudiar la recurrencia de la ICD, se realiza la infección según el modelo de infección inicial descrito por Chen *et al.*, (2008), con las modificaciones descritas por Sun

et al., (2011) para generar los cuadros de recurrencia. Luego se administra vancomicina por 5 - 10 días y 2 a 3 días después de finalizar el tratamiento con antibiótico se presenta la recurrencia de la infección.

Implicancia de la espora en transmisión, iniciación y persistencia de la ICD.

Las esporas de *C. difficile* son el morfotipo esencial para diseminación ambiental y persistencia de la ICD en pacientes (Denève *et al.*, 2009; Roberts *et al.*, 2008). Estudios realizados en modelo murino con cepas que son incapaces de generar esporas dado que son mutantes para el gen codificante del regulador maestro de la esporulación de *C. difficile*: Spo0A, no generan ICD recurrentes y no se transmite entre hospederos (Deakin *et al.*, 2012).

Por lo general, el reclutamiento de macrófagos y neutrófilos producto de una inflamación ayuda a eliminar las bacterias invasoras, sin embargo, el proceso inflamatorio desencadenado por las toxinas de *C. difficile* no contribuye a eliminar las esporas. Paredes-Sabja *et al.* (2012) demostraron que las esporas son capaces de mantenerse dormantes y sobrevivir dentro de macrófagos causándole efectos citotóxicos, y observó en micrografías electrónicas que esporas de *C. difficile* interactúan directamente con macrófagos.

Posteriormente se demostró que entre el 60-80% de las esporas de *C. difficile* son capaces de adherirse a CEI *in vitro* (Paredes-Sabja y Sarker, 2012) y que la adherencia depende de la capa externa de la espora denominada exosporium.

Paralelamente ensayos de *pull down* muestran que cuatro especies de proteínas podrían estar implicadas en la interacción con las espora (Paredes-Sabja y Sarker, 2012). Estos resultados sugieren que la adherencia de esporas de *C. difficile* en CEI es mediada por una o más proteínas de la espora y de la célula (Paredes-Sabja *et al.*, 2012; Paredes-Sabja y Sarker, 2012). Sin embargo, a la fecha se desconocen los mecanismos que determinan la supervivencia y persistencia de las esporas de *C. difficile* en el tracto gastrointestinal.

Entrada como mecanismo de persistencia.

Trabajos preliminares en nuestro laboratorio, han demostrado mediante microscopía confocal (Figura 2) y microscopía electrónica de transmisión (Figura 3A) que esporas cepa 630 de *C. difficile* son capaces de entrar en CEIs. Mediante inmunofluorescencia hemos observado que el fenómeno de entrada ocurre con diversas cepas de esporas de *C. difficile* obtenidas de muestras clínicas de pacientes chilenos, como de cepas que han causado epidemias en el mundo, sugiriendo que es un fenómeno transversal para esporas de *C. difficile*. Se ha observado además que el fenómeno de entrada es favorecido drásticamente por componentes termolábiles del suero, indicando que componentes del suero fomentan la entrada de espора por parte de la célula, además se observó que el proceso de entrada es dependiente de la polimerización de filamentos de actina, el cual fue inhibido por citocalasina-D.

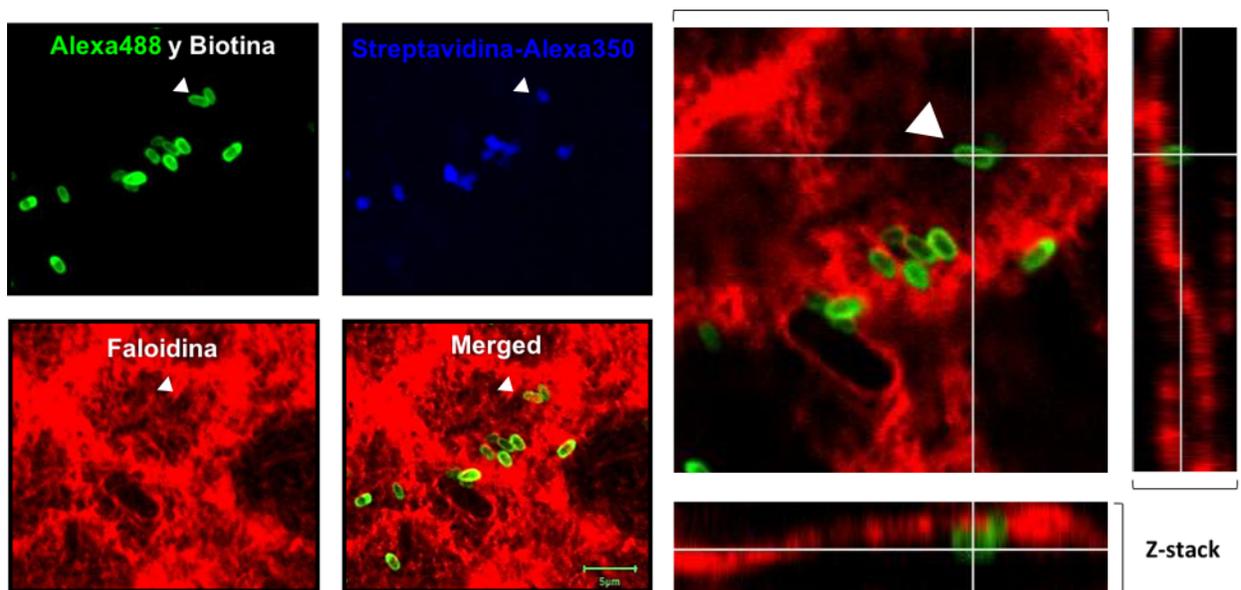


Figura 2: Esporas de *C. difficile* cepa 630 ingresa a células T84.

Monocapas de células T84 fueron infectadas en un MOI de 10 (del inglés *multiplicity of infection*) con esporas de *C. difficile* cepa 630 durante 5 h, las cuales previamente fueron marcadas con Alexa Fluor 488 y biotina. Luego fueron fijadas y las esporas adheridas fueron etiquetadas con estreptavidina-Alexa Fluor 350, y el citoesqueleto de actina fue marcado con faloidina 568 y luego fueron observadas en microscopía confocal. Las puntas de flechas indican una espора endocitada. (Cofré-Araneda, et al. datos no publicados).

Los filamentos de actina juegan un rol primordial en la mayoría de los mecanismos de endocitosis descritos (ver más adelante). No obstante, hasta el momento desconocemos la naturaleza del fenómeno de entrada de esporas de *C. difficile*, siendo de interés ya que la endocitosis de esporas podría ser el o uno de los mecanismos que permite que esporas de *C. difficile* persistan en el hospedero para producir ICD recurrentes, por lo cual su inhibición podría ser una forma eficaz para reducir o eliminar los casos de ICD-R.

Vías de endocitosis.

Tradicionalmente las vías de endocitosis son utilizadas para la translocación de moléculas a través de la membrana celular, proceso vital para la mantención de la homeostasis celular, el ingreso de nutrientes, lípidos y proteínas, tales como el factor de crecimiento epidérmico (Conner y Schmid, 2003; Di Fiore y De Camilli, 2001). Sin embargo, se ha reportado que bacterias patogénicas como, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Staphylococcus aureus* o *Salmonella* Typhimurium secretan moléculas dentro del citoplasma de células hospederas mediante el sistema de secreción de tipo III (SSTT), lo cual genera modificaciones en el citoesqueleto en las cercanías de las bacterias lo que les permite ingresar a las células hospederas, mientras que *Listeria monocytogenes* posee unas proteínas de superficie llamadas internalina A e internalina B (InIA, InIB), las cuales se unen a E-cadherina y al factor de crecimiento epidérmico de hepatocito, permitiendo la adherencia y entrada de estas bacterias a las células *in vitro* (Cossart y Veiga, 2008; Lin y Guttman, 2010; Veiga y Cossart, 2005; Veiga *et al.*, 2007). Un grupo de Texas A&M Health Science Center, EE.UU., identificó por primera vez que un organismo dormante como las esporas de *Bacillus anthracis* son capaces de ser endocitadas por células epiteliales en un proceso dependiente de polimerización de actina, la familia de Rho-GTPasas Cdc42 de PI3K y c-Src, pero no de RhoA o Rac1 y que la inhibición farmacológica de Src-quinasa reduce la translocación de esporas de *B. anthracis* e incrementa la supervivencia de ratones infectados (Xue *et al.*, 2011, 2010).

Las vías de endocitosis se clasifican en primera instancia dependiendo del tipo celular, separando el proceso de fagocitosis con el de pinocitosis. Fagocitosis es un proceso llevado a cabo por células especializadas como células fagocíticas, que involucra

el recubrimiento y eliminación de partículas grandes como debris celular o patógenos. Mientras que las células no fagocíticas, como las células epiteliales, realizan pinocitosis, este proceso permite el ingreso de pequeñas moléculas a la célula. El proceso de pinocitosis puede ser clasificado en base a la dependencia de la proteína dinamina-2, la cual forma un anillo alrededor del cuello de la vesícula en formación, y por hidrólisis de GTP produce constricción del anillo acercando las membranas lo suficiente para generar fusión espontánea, y la consecuente liberación de vesículas al medio intracelular (Bashkirov *et al.*, 2008; Pucadyil y Schmid, 2008). Además, los procesos de endocitosis que requieren dinamina-2 pueden subclasificarse dependiendo la proteína encargada de recubrir la vesícula endocítica, pudiendo ser endocitosis mediada por clatrina o por caveolina-1, mientras que los procesos independientes de dinamina-2 se subdividen en macropinocitosis y endocitosis mediada por balsas lipídicas (Lin y Guttman, 2010).

Endocitosis mediada por clatrina: este tipo de endocitosis gatilla la entrada mediada por interacción ligando-receptor. La vesícula es formada por adosamiento de la estructura trimérica de clatrina. Este tipo de endocitosis depende de la polimerización de filamentos de actina (Kaksonen *et al.*, 2006). Por su estructura geométrica se ha estimado que puede llegar a formar vesículas de hasta 150 nm (Cheng *et al.*, 2007; Fotin *et al.*, 2006; McMahan y Boucrot, 2011), **teniendo un tamaño insuficiente para rodear una espora de *C. difficile*** la cuales tienen un tamaño al menos 6 veces mayor (1 - 1,5 μm), no obstante, durante el proceso de invasión de *Listeria monocytogenes* dependiente de las proteínas de superficie InIA e InIB es rodeada de clatrina y dinamina, las cuales son reclutadas en un mayor tiempo que el requerido para endocitosis de pequeñas moléculas, sugiriendo que clatrina y dinamina juegan un rol no clásico que no ha sido caracterizado hasta el momento (Pizarro-Cerdá *et al.*, 2010; Veiga y Cossart, 2005).

Endocitosis mediada por caveolina: la formación de vesículas recubiertas de caveolina está estrechamente relacionada a las balsas lipídicas, el proceso es dependiente de la polimerización de filamentos de actina (Kaksonen *et al.*, 2006). Proteínas externas de estas vesículas se unen a colesterol y glicolípidos para estabilizar las vesículas recubiertas de caveolina llamadas caveolae (Stan, 2002). Esta vía de endocitosis es dependiente de receptor, uno de ellos es el receptor de la albúmina del suero Gp60, la

cual desencadena el ingreso de las vesículas por activación de las Src-quinazas (Minshall *et al.*, 2000). Las caveolae pueden alcanzar un tamaño de unos 60-80 nm (Parton y Simons, 2007), que al igual que las vesículas recubiertas de clatrina, **las vesículas de caveolina son incapaces de rodear una espora de *C. difficile***. Sin embargo, se ha observado que la invasión de *Listeria innocua* requiere caveolina-1 y colesterol, siendo independiente de clatrina (Seveau *et al.*, 2004), asimismo, la proteína SopE producida por bacterias del género *Salmonella* que es inyectada en el citoplasma de las células epiteliales mediante SSTT, interactúa con Rac1 para regular la reorganización de filamentos de actina y ambas proteínas colocalizan con caveolina-1, siendo esta última necesaria para la invasión (Lim *et al.*, 2014). No obstante, se desconoce su rol en la entrada de partículas de mayor tamaño que su capacidad máxima. De igual modo en endocitosis dependiente de clatrina, creemos que es poco probable que esta vía esté involucrada en la entrada de esporas.

Endocitosis dependiente de balsas lipídicas (independiente de clatrina y caveolina-1):

Este tipo de endocitosis ocurre en las balsas lipídicas las cuales difunden libremente en la superficie celular, a diferencia de los anteriores, no requiere de proteínas de cubierta de vesículas. Por esta vía ingresan partículas de un tamaño máximo de 40 - 50nm. Se sabe que moléculas como IL-1 ingresa a la célula por esta vía. Este tipo de endocitosis puede depender o no de dinamina (Conner y Schmid, 2003). Como este tipo de endocitosis está limitado a pequeñas partículas, hace inviable que una espora pueda entrar por esta vía.

Macropinocitosis: Proceso independiente de ligando, que puede ser inducida por activación de las vías de señalización del factor de crecimiento, el cual se encuentra presente en el suero. El proceso de macropinocitosis comienza por la extensión de la membrana celular en un proceso dependiente de la polimerización de filamentos de actina. Luego la extensión se une nuevamente a la membrana, llevando así volumen del medio extracelular al medio intracelular. Esta vesícula intracelular se denomina macropinosoma, (Kerr y Teasdale, 2009). **Se han visto macropinosomas con diámetro de hasta 10µm, tamaño suficiente para incluir una o más esporas de *C. difficile***. Este proceso depende de polimerización de actina, de señalización por PI3K y del pH (El-

Sayed y Harashima, 2013). Dado que estas vesículas son grandes y la macropinocitosis es independiente de receptor, nos hace creer que las esporas debieran ingresar a células epiteliales intestinales por esta vía.

Dado el desconocimiento del (los) mecanismos de persistencia de las esporas de *C. difficile* en células epiteliales intestinales para causar los episodios de recurrencia, en este trabajo se busca conocer mediante el uso de fármacos, la(s) vía(s) de endocitosis involucrada(s) en la entrada de las esporas de *C. difficile* y luego evaluar en un modelo murino de infección recurrente por *C. difficile* si el uso de un fármaco inhibidor de los mecanismos de endocitosis, reducen la endocitosis de esporas *in vitro*, y en consecuencia los casos de las ICD-R, lo cual permitiría el desarrollo de un nuevo tratamiento para prevenir las ICD-R.

HIPÓTESIS

En resumen, resultados de nuestro laboratorio demuestran que esporas de *C. difficile* son capaces de ingresar a CEIs. Además, se ha reportado que algunas bacterias son capaces de entrar a CEIs en un proceso dependiente de clatrina y/o caveolina-1, mediante modulación de citoesqueleto de actina de la célula, mediado por el SSTT, o por efecto de proteínas de superficie de la bacteria. Sin embargo, las esporas de *C. difficile* son inertes y carecen del SSTT, y sumado a que las vesículas de caveolina-1 y clatrina tienen un tamaño de 60-80nm y de 150nm respectivamente, es decir, serían incapaces volumétricamente de recubrir una espora de *C. difficile* (las que tienen un tamaño de $\sim 1\mu\text{m} \times \sim 1,5\mu\text{m}$), por esta razón, hace poco viable que clatrina y caveolina-1 estén involucrados en la entrada de esporas a CEIs. No obstante, se han visto macropinosomas con diámetro de hasta $10\mu\text{m}$, los cuales tienen un tamaño suficiente para incluir una o más esporas de *C. difficile*, lo cual convertiría la macropinocitosis en la vía más atractiva para la entrada de esporas en CEIs. En base a esto, levantamos la siguiente hipótesis de trabajo.

Las esporas de *C. difficile* ingresan a células epiteliales intestinales vía macropinocitosis, y la inhibición de la endocitosis de esporas de *C. difficile* reduce los casos de recurrencia de la infección por *Clostridium difficile* en un modelo murino.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el proceso de endocitosis de esporas de *C. difficile* en células epiteliales intestinales y su papel en la recurrencia de la infección por *C. difficile* en un modelo murino.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar si macropinocitosis y/o endocitosis mediada por clatrina o caveolina están involucradas en la entrada de esporas de *C. difficile* a células epiteliales intestinales.
2. Evaluar si el uso de un fármaco inhibidor de la endocitosis de esporas de *C. difficile* reduce los cuadros de infecciones recurrentes por *C. difficile* en un modelo murino.

METODOLOGÍA

Obtención de esporas.

Las esporas de *C. difficile* se obtuvieron según el protocolo utilizado en nuestro laboratorio (Barra-Carrasco *et al.*, 2013), el cual consiste en crecer *C. difficile* R20291 bajo condiciones anaeróbicas en cámara de anaerobiosis Bactron III-2 (Shel Lab EE.UU.) en placas 3,7% *brain heart infusion broth* (Becton, Dickinson and Company, EE.UU.) suplementado con 0,5% de extracto de levadura (Becton, Dickinson and Company, EE.UU.). Para la obtención de la suspensión de esporas se sembró de una solución 1:500 de cultivo O/N en placas 3% tripticasa de soya (Becton, Dickinson and Company, EE.UU.) con 0,5% de extracto de levadura (Becton, Dickinson and Company, EE.UU.) las cuales se incubaron por 5 días a 37 °C bajo condiciones anaeróbicas. Las esporas se cosecharon con agua miliQ estéril y dado que las esporas tienen mayor densidad que las células vegetativas, se purificaron por gradiente de densidad con 50% Nicodenz (Axell, EE.UU.), luego se contaron en cámara de Neubauer y se ajustó la concentración a 5×10^9 esporas/mL y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Cultivo celular.

Las células Caco-2 y Vero se crecieron en medio esencial mínimo modificado Dubelcco's DMEM alto en Glucosa (Hyclone, Thermo Scientific, EE.UU.), y células T84 (gentilmente facilitadas por Dr. Mauricio Farfán) se cultivaron con medio esencial mínimo modificado Dubelcco's mezcla de nutrientes F-12 DMEM/F12 (Hyclone, Thermo Scientific EE.UU.), suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB) (Hyclone, EE.UU.) el cual previamente se inactivó por calor a 60 °C por 30 min, con adición de penicilina (100U/mL) y estreptomina (100µg/mL) (Corning Cellgro, EE.UU.) como se describió anteriormente (Paredes-Sabja y Sarker, 2012).

Tratamiento de muestras para análisis por Microscopía Electrónica de Transmisión.

Para demostrar que las esporas de *C. difficile* son capaces de ingresar en CEI diferenciadas; se procedió a diferenciar células Caco-2, cultivándose en monocapas confluentes por 8 días, mientras que, células T84 se cultivaron en Transwell (Corning, EE.UU.) hasta una resistencia de 1000 - 2000Ω (~14 días post-confluencia) y fueron

infectadas por 5 h con un MOI de 20 con esporas de *C. difficile* preincubadas con suero humano normal (SHN). Luego fueron lavadas para remover las esporas no adheridas y fueron fijadas durante toda la noche a 4°C con una solución fresca de glutaraldehído al 2,5% con 1% de paraformaldehído (PFA) en tampón cacodilato 0,1M (pH 7,2). Una segunda fijación fue realizada con 1% de tetróxido de osmio en 0,1M de tampón cacodilato (pH 7,2), luego fueron lavadas con tampón cacodilato (pH 7,2) y teñidas por 30 min con 1% de ácido tánico. Las muestras luego fueron deshidratadas en un gradiente de acetona al 30% por 30 min (conteniendo 2% de acetato de uranilo en este paso), 50% por 30 min, 70% durante toda la noche, 90% durante 30 min y 2 veces con acetona 100%. Las muestras deshidratadas fueron embebidas en resina en una proporción de acetona:resina de 3:1, 1:1 y 1:3 durante 40 min cada una y finalmente resuspendida en resina por 4 h y luego incubadas por 12 h a 65 °C. Finas secciones de 90nm fueron obtenidas con un micrótomo y se colocaron en una rejilla revestida de carbono para la tinción negativa y doble tinción con 2% de acetato de uranilo y citrato de plomo. Las secciones fueron observadas en el Microscopio Electrónico de Transmisión Phillip Tecnai 12 bioTWEIN de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

Ensayos de infección con esporas de *C. difficile* a líneas celulares.

Se realizó ensayos de entrada como están previamente descritos con mínimas modificaciones (Paredes-Sabja y Sarker, 2012). Se sembraron células sobre cubreobjetos de vidrio (Marienfeld GmbH, Alemania) en placas de 24 pocillos (Costar, Corning Incorporated), las que se infectaron 48 h después de conseguir monocapas confluentes no diferenciadas. Las células se lavaron 2 veces con tampón Dubelcco's PBS (DPBS) (Hyclone, Thermo Scientific, EE.UU.) y se incubaron con diluciones seriadas los inhibidores farmacológicos para células Caco-2 y la máxima concentración para células T84 en DMEM, penicilina (100U/mL) y estreptomina (100µg/mL) por 1 h. Paralelamente esporas de *C. difficile* se incubaron con SFB por 1 h, luego las células se infectaron con un MOI de 10 con SFB 10% en presencia del inhibidor farmacológico por 3 h a 37 °C. Se utilizó como control células tratadas con el solvente del inhibidor (control) y SFB 10%. Luego los pocillos se lavaron dos veces con DPBS para remover esporas no adheridas y se fijaron con PFA 4% (Merck Millipore, EE.UU.) por 10 min a temperatura ambiente (TA) y se lavaron 2 veces con DPBS.

Para determinar si las esporas de *C. difficile* se encuentran dentro de las células, las monocapas celulares previamente fijadas se bloquearon toda la noche con 1% de SFB a 4 °C y las esporas extracelulares se marcaron con suero de cabra anti-espora diluido 1:50 en 1% SFB-DPBS por 1 h a TA. Las esporas marcadas fueron lavadas 2 veces con DPBS y se incubaron con IgG bovina anti-cabra conjugado con CFL 488 (verde) (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.) diluido 1:400 y se lavaron 3 veces con DPBS y finalmente se realizó un lavado final con agua destilada para remover el exceso de sales. Las muestras se secaron a 37 °C por 30 min, se montaron con medio de montaje fluorescente Dako (Dako, Dinamarca) y se sellaron con esmalte de uñas transparente. Las muestras se analizaron en microscopio de epifluorescencia Olympus BX53. Las esporas de *C. difficile* que ingresaron a la célula, se analizaron una a una como esporas visibles en contraste de fase y que no son visibles en fluorescencia verde, mientras que las esporas extracelulares o adheridas se identificaron como esporas en fase brillante que se marcaron en fluorescencia verdes (Véase Anexo 1).

Para demostrar que el inhibidor tiene un efecto directo sobre la entrada de esporas y que ésta no se afectó por una disminución de la adherencia de esporas, la adherencia será evaluada bajo microscopía de fase y se representó como cantidad promedio de esporas adheridas por célula relativizadas respecto a la condición control.

Ensayo de viabilidad celular.

Para evaluar si las células se mantienen íntegras y activas metabólicamente durante los tratamientos farmacológicos, se realizó ensayos de viabilidad celular con azul de tripán (Invitrogen EE.UU.) con el cual se evaluó la integridad de la membrana (Strober, 2001) y bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Life Technologies, EE.UU.), el cual es reducido por mitocondrias activas en células vivas (Liu *et al.*, 1997). Los protocolos utilizados fueron los descritos por el fabricante. Brevemente, monocapas confluentes en placas de 96 pocillos (Corning, EE.UU.) tratadas farmacológicamente durante 4 h, se les eliminó el medio, y se lavaron 2 veces con DPBS y se agregó una gota de azul de tripán 0,4% y se observaron en un microscopio de campo claro dentro de los próximos 2 min. Los valores fueron relativizados respecto a células que se incubaron solamente con medio de cultivo. Paralelamente, para determinar viabilidad por MTT,

células previamente sembradas e incubadas con los inhibidores en placas de 96 pocillos, fueron lavadas 2 veces con DPBS y se les agregó 100µL medio de cultivo fresco DMEM alto en glucosa sin rojo fenol (Hyclone, EE.UU.). Se agregó 10µL de MTT 12mM a cada pocillo y, como blanco se agregó 10µL de MTT a 100µL a un pocillo con medio de cultivo sin células. Luego se incubó por 3 h a 37 °C con 5% CO₂ y de adición 100µL de 10% SDS (Sigma, EE.UU.) en 0.01M de HCl (Winkler, Chile). Se mezcló e incubó a 37 °C hasta que los cristales de formazán fueron disueltos (~3 h). Luego homogenizó con pipeta y se midió absorbancia a 570 nm, como control se utilizó células no tratadas con inhibidor.

Inhibidores Farmacológicos.

Para ver dependencia de vesículas recubiertas de clatrina, se utilizará óxido de fenilarsina (ODF) (Sigma EE.UU.), inhibidor de la fosfotirosina fosfato y proteínas RhoA, involucrada en la formación de filamentos de actina (Gerhard *et al.*, 2003) y clorpromazina (CPZ) (Sigma EE.UU.), el cual previene la formación de las vesículas recubiertas de clatrina, además provoca el enrejado de clatrina en membranas endosomales previniendo su reciclaje (McMahon y Boucrot, 2011).

Con intención de estudiar si las esporas de *C. difficile* requieren de vesículas recubiertas de caveolina para ingresar a la célula, se utilizará indometacina (INDO) (Sigma EE.UU.) el cual inhibe la entrada al citoplasma de vesículas de caveolae y el reciclaje de caveolina-1 a la membrana celular (Sato *et al.*, 2009) y dado que la familia Src-quinasa fosforila a caveolina, gatillando su ingreso a la célula después de la activación del receptor de albumina de suero Gp60, esta familia de proteínas será inhibida específicamente por SU6656 (Sigma EE.UU.), (Blake *et al.*, 2000). Por otro lado se evaluará si la liberación mediada por dinamina-2 de las vesículas recubiertas de clatrina y caveolina-1 son requeridas para el proceso de entrada se utilizará *dynasore* (Dyn) (Merck Millipore Alemania), el cual se une específicamente a dinamina-1 y dinamina-2 (Kirchhausen *et al.*, 2009). Por otro lado para evaluar macropinocitosis se utilizaron varios inhibidores que tienen efecto en distintas etapas del proceso; 5-(N-etil-N-isopropil) amilorida (EIPA) (Sigma EE.UU.) es un inhibidor de una bomba de sodio/hidrogeno necesaria para generar la extensión de la membrana, LY294.002 (LY) (Sigma EE.UU.) y wortmanina (WM) (Sigma EE.UU.) se unen a la PI3K de forma reversible e irreversible

respectivamente, esta proteína está involucrada en múltiples procesos de señalización celular, en este caso, está involucrada en la fusión de la extensión de la membrana generando el macropinosoma (El-Sayed y Harashima, 2013).

Ensayo de Infección e inmunofluorescencia de esporas de *C. difficile* y marcaje de caveolina-1 y clatrina.

Se infectaron monocapas de células Caco-2 y Vero con esporas de *C. difficile* R20291 como se describió más arriba. Sin embargo, las células cultivaron 16 h antes de la infección con 0,5% de FBS en DMEM alto en glucosa y la infección se realizó por 3 h. Las células fijadas se bloquearon con BSA 1% por 1 h, y se permeabilizaron con 0,2% de Tritón X-100 (Merck, Alemania) por 10 min, se lavaron y se incubaron con IgY anti-espora R20291 (Aveslab, EE.UU.) en 1% de BSA-DPBS por 1 h a TA, luego se lavaron 2 veces con DPBS y se marcaron con IgG de cabra anti-IgY conjugado a fluoróforo Alexa Fluor 647 (Life Technologies, EE.UU.), etiquetándose así las esporas. Luego las muestras se lavaron 2 veces con DPBS y se incubaron con IgG de conejo anti-caveolina-1 (Abcam, Reino Unido) o anti-cadena pesada de clatrina (anti-clatrina) (Abcam, Reino Unido) 1:150 por 1 h y se detectaron por IgG de cabra anti-conejo conjugado a Alexa Fluor 568 (Rojo) (Life Technologies, EE.UU.) por 1 h. Posteriormente el citoesqueleto de actina se marcó con 1:400 faloidina conjugado a Alexa Fluor 488 (Verde) (Life Technologies, EE.UU.). Entonces, las muestras se lavaron 2 veces con DPBS y se incubaron durante 10 min con hoeschst 4,5µg/mL (Sigma, EE.UU.), y finalmente fueron lavadas 2 veces con DPBS y una vez con agua destilada. Las muestras se secaron a 37 °C por 30 min y se montaron con Medio de Montaje Fluorescente Dako (Dako, Dinamarca) y se sellaron con esmalte de uñas transparente. Las muestras fueron fotografiadas en el microscopio confocal Leica TCS LSI del departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad Andrés Bello, utilizando un objetivo de inmersión de 63x APO (apertura numérica 1,3) con un zoom digital de 2x. *Stacks* de imágenes de 0,3µm fueron capturados. Las imágenes obtenidas fueron analizadas y editadas en ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) y se evaluaron al menos 100 esporas por cada muestra.

Infección con esporas etiquetadas para colocalización con macropinosomas.

Para estudiar si las esporas entran por macropinocitosis, la infección se realizó como se describe en el objetivo 1, pero considerando las sugerencias previamente reportadas (Wang *et al.*, 2014). Básicamente, durante el protocolo de inmunofluorescencia, la permeabilización de la membrana celular debe evitarse ya que los macropinosomas se permeabilizan y su contenido podría liberarse. Para ello, se utilizó esporas previamente etiquetadas con el kit de marcaje de proteínas Alexa Fluor 488 NHS Ester (Ester Succinimidil) (Life Technologies, EE.UU.). Brevemente las esporas fueron resuspendidas en Alexa Fluor 488 NHS Ester (Ester Succinimidil) en 50mM de bicarbonato de sodio (pH 8,3) e incubadas a TA por 1 h. La tinción no conjugada a las esporas fue removida por 5 lavados con agua miliQ. Una vez teñidas las esporas, las células Caco-2 y Vero se incubaron con 0,5% de SFB en DMEM alto en glucosa 16 h previas a la infección y las esporas etiquetadas se incubaron con SHN. Luego las esporas con SHN fueron resuspendidas con DMEM alto en glucosa, quedando el SHN en un 10%. La fase fluida (DMEM 10% SHN) se marcó con 100µg/mL de dextrano conjugado a Alexa Fluor 594 (rojo) de peso molecular 10.000kDa (Life Technologies, EE.UU.), previamente centrifugado el cual entra a la célula en los macropinosomas, marcándolos así de rojo. La infección fue realizada por 3 h. Luego las muestras se lavaron y se fijaron como se describió en el objetivo 1. Luego las células infectadas se bloquearon toda la noche con 1% de BSA y luego las esporas adheridas se marcaron con IgY anti-espora R20291 en 1% BSA-DPBS por 1 h a TA, las muestras se lavaron 2 veces con DPBS y se marcó el citoesqueleto de actina con 1:20 Faloidina conjugado con Alexa Fluor 350 (Life Technologies, EE.UU.) y nuevamente se lavaron 2 veces con DPBS, y una vez con agua destilada. Se secaron y montaron como se describió en el objetivo 1. Las muestras se analizaron en el microscopio confocal Leica TCS LSI utilizando un objetivo de inmersión de 63x APO (apertura numérica 1,3) del departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad Andrés Bello y, se evaluó al menos 100 esporas por cada muestra.

Animales.

Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad Andrés Bello, o por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias

Biológicas de la Universidad Andrés Bello, según lo indicado en las Actas de aprobación de protocolos de trabajo con animales de investigación adjuntas a este trabajo de Tesis.

Determinación de esporas intracelulares *in vivo*.

3 ratones de 1 año de edad fueron anestesiados con 100mg/kg de ketamina (Agrovet, Chile) y 10mg/kg de xilacina (Centrovét, Chile). Una vez anestesiados se realizó una pequeña incisión en la pared abdominal y se expuso el ciego, y con sutura quirúrgica de hilo de seda, se realizó una obstrucción del íleon (parte final de intestino delgado) y del intestino grueso ascendente (parte inicial del intestino grueso) y se inyectó dentro de la zona obstruida $2,5 \times 10^8$ esporas por cm^2 . Los intestinos se regresaron a la cavidad abdominal y esta se suturó con hilo de seda (cirugía realizada en condiciones de esterilidad quirúrgica). Los ratones se recuperaron de la anestesia y se mantuvieron durante 6 h después de la cirugía ante una fuente de calor de luz infrarroja. Pasadas las 6 h los ratones fueron anestesiados con la dosis anestésica anteriormente descrita y se realizó perfusión con 10mL de PFA 4%. Se extrajeron las regiones de tejido infectado cortando a los extremos de los nudos. Los tejidos se limpiaron y lavaron bajo campana de bioseguridad. Los tejidos se fijaron toda la noche con PFA 4% con sacarosa 30%. Luego fueron lavados, y se realizó cortes de 5x5 mm para realizar tinción. Los tejidos fueron permeabilizados con tritón X-100 (Merck, Alemania) al 0,2% en PBS por 2 h, lavados con PBS y bloqueados con BSA 3% en PBS por 3 h, e incubados con anticuerpos IgY anti-espora 1:1000 durante toda la noche. Luego fueron lavados y se incubaron con anticuerpos anti-IgY Alexa Fluor 568 (rojo) 1:300 por 3 h. Se lavó 2 veces con DPBS y para marcar filamentos de actina se incubó con Faloidina Alexa Fluor 488 (verde) 1:50 durante toda la noche. Las muestras fueron lavadas y se etiquetaron con hoeschst $8\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 30 min. Luego los tejidos fueron montados, y fotografiados en microscopio confocal Leica TCS LSI del departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad Andrés Bello con un objetivo inmersión de 63x realizando *stacks* de $0,8\mu\text{m}$. Las imágenes fueron procesadas con ImageJ.

Infección en ratones C57BL/6.

Ratones silvestres C57BL/6, de 8-9 semanas fueron alojados en jaulas individuales previamente esterilizadas con viruta estéril, y fueron mantenidos en ciclos de

luz/oscuridad de 12 h con alimentación y agua (estéril) *ad libitum*. Para generar una disbiosis de la microbiota intestinal y hacerlo propenso a una ICD, se les suministró por 3 días un tratamiento antimicrobiano por vía orogástrica. El tratamiento antimicrobiano consiste en una solución compuesta por kanamicina 40mg/Kg (Sigma, EE.UU.), gentamicina 3,5mg/Kg (Sigma, EE.UU.), colistina 4,2mg/Kg (Sigma, EE.UU.), metronidazol 12,5mg/Kg (Sigma, EE.UU.) y vancomicina 4,5mg/Kg (Laboratorios Chile, Chile) en un volumen de 100µL de solución salina. Un día previo a la infección, a los ratones se les administró 30mg/Kg de clindamicina (Sigma, EE.UU.) de forma intraperitoneal. Al día de la infección se evaluó el peso de los ratones y se tomó una muestra de deposiciones para comprobar que ninguno estuviera infectado por *C. difficile*, luego se infectaron oralmente con 1×10^6 esporas de *C. difficile* R20291 y paralelamente se les administró una solución de la sustancia X entre el día -1 y 10 (11 días) con la intención de reducir la endocitosis de esporas. A partir del día 3 post-infección a los ratones se les suministró vancomicina 50mg/Kg para matar células vegetativas de *C. difficile*, durante 5 o 7 días y entonces los ratones se observaron hasta la aparición de la ICD-R (véase Figuras 12A y 13).

Toma de peso y determinación de puntuación de diarrea.

Los ratones fueron observados a diario y se les midió el peso, el cual se comparó con el peso del día de la infección. Mientras que la diarrea se evaluó visualmente según una puntuación de diarrea, otorgándose un valor de 0 para deposiciones normales, de 1 cuando se observa ablandamiento y/o cambio de coloración (amarillo) respecto al día 1, de 2 cuando se observa la cola de los ratones mojada y/o mucosidad en las deposiciones y un valor de 3 cuando la deposición es líquida o hay ausencia de deposición (Warren *et al.*, 2013).

Determinación de unidades formadoras de colonia de esporas de *C. difficile* en deposiciones.

Las muestras de deposiciones recolectadas se hidrataron con 500µL de PBS toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, las muestras se homogenizaron se seleccionó organismos resistentes al etanol (como las esporas) agregando 500µL de etanol 100% por 20 min, luego se realizó diluciones seriadas de las muestras las que se sembraron

en placas proteasa peptona 4% (Becton, Dickinson and Company, EE.UU.), Fructosa 0,6%, Na₂HPO₄ 0,1% (Merck, Alemania), KH₂PO₄ 0,1% (Merck, Alemania), NaCl 0,2% (Merck, Alemania), MgSO₄ 0,02% (Merck, Alemania), cicloserina 250 µg/mL (Sigma, EE.UU.), cefoxitina 15mg/mL (Sigma, EE.UU.), suplementado con taurocolato de sodio 0,1% (HIMEDIA, India) denominado TCCFA (del inglés *taurocholate cycloserine-cefoxicin-fructose agar*) siendo este un medio selectivo para *C. difficile* el cual permite su germinación y realizar conteo de unidad formadoras de colonia (UFC).

Necropsia y toma de muestras biológicas.

El último día del ensayo, los ratones fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal con una solución de 100mg/Kg de ketamina y 20mg/Kg de xilacina disuelta en PBS 1X en un volumen final de 150µL y se esperó la ausencia de reflejos del ratón (~10 min) antes de proceder a la toma de muestras.

Una vez anestesiado, se realizó una incisión en la zona del abdomen donde se encuentra el intestino grueso y se procedió a extraer tanto el ciego como el colon. Para evaluar los efectos citotóxicos del contenido luminal del ciego, se tomó una muestra de este y luego tanto el ciego como el colon se lavaron con abundante PBS, y se fijaron en una solución de PFA 4% (Sigma EE.UU.) durante toda la noche a 4°C.

Citotoxicidad del contenido cecal.

El contenido luminal del ciego se pesó y se ajustó a 0,1mg/µL de PBS, luego las muestras fueron homogeneizadas y se realizó diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000, de las cuales 100µL de cada dilución fueron agregadas sobre monocapas de células Vero sembradas en placas de 96 pocillos. Se utilizó como control negativo suero antitoxina y como control positivo toxinas purificadas. Las células fueron incubadas toda la noche a 37°C en 5% de CO₂. Dado que las células Vero tienen una forma alargada, estas al morir pierden esa estructura y se redondean. El porcentaje de células muertas fue determinado luego de 20 h al observar las células con un microscopio invertido. El título de citotoxicidad se calculó como el recíproco de la mayor dilución en la cual se produce un redondeo de al menos un 80% de las células por gramo de contenido cecal.

Histología el ciego y el colon.

Una vez extraídos los tejidos, estos fueron fijados toda la noche con PFA 4% y luego lavado 3 veces con 1mL de PBS estéril. Para embeber los tejidos en parafina estos son deshidratados en concentraciones crecientes de etanol 70%, 95%, 100% por 30 min cada una. Luego los tejidos se dejaron reposar en Histo-Clear (National Diagnostics EE.UU.) por 30 min, luego los tejidos se incubaron en solución 1:1 de parafina líquida incolora y Histo-Clear durante 30 min a 56-60 °C, luego se incubaron con parafina por 2 h a 56-60 °C en un recipiente donde se amoldan y se dejan reposar hasta que se solidifique. Los tacos se guardaron a -20 °C hasta que se realizaron los cortes. Los tacos fueron procesados con un micrótopo y se realizaron cortes con 5µm de espesor. Luego a los tejidos se les removió la parafina con Histo-Clear durante 5 min, y fueron hidratados con soluciones descendentes de etanol 100%, 95% y 70% durante 5 min cada una. A continuación, las muestras se secaron y se agregó hematoxilina (Merck, Alemania) por 2 min, luego se lavó 2 veces con agua destilada durante 5 min y se dejó secar, luego se agregó eosina (Merck, Alemania) durante 1 min. Luego los tejidos fueron deshidratados nuevamente con soluciones crecientes de etanol 70%, 95% y 100% durante 5 min. Entonces se realizó un lavado final con Histo-Clear durante 10 min y se dejó secar. Luego las muestras se montaron con solución de montaje HistoMount (National Diagnostics, EE.UU.) y fueron tapadas con cubreobjetos y finalmente selladas con esmalte de uñas transparente y se analizaron al microscopio de campo claro. Las muestras histológicas fueron analizadas por un médico veterinario según los criterios que se muestran en el Anexo 1.

Abundancia de esporas en el tejido colónico.

Para evaluar la carga de esporas que tiene el colon, estos fueron extraídos como se indicó anteriormente y fueron pesados y se ajustaron a una concentración de 0,1mg/µL con PBS para ser macerados mecánicamente en un homogeneizador Dounce. Luego las muestras sometidas a sonicación y se realizaron diluciones seriadas en PBS y se sembraron en placas TCCFA, las cuales fueron incubadas en anaerobiosis durante 2 días y se contaron las UFC.

RESULTADOS

Vesículas de clatrina, caveolina y macropinocitosis se encuentran cercanas a esporas de *C. difficile* adheridas a células epiteliales.

En trabajos previos de nuestro laboratorio se había encontrado mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), que esporas de *C. difficile* cepa 630 son capaces de entrar en células T84, (Figura 3A-C). De las micrografías se observó que más de una spora es capaz de ingresar a una misma célula (Figura 3A) y las esporas que ingresan a la célula se encuentran dentro de una vesícula que se asocia estrechamente a ellas (Figura 3B, C). Sin embargo, la cepa 630 posee ribotipo 012 e históricamente ha sido utilizada para el estudio de *C. difficile*. Sin embargo, no ha sido vinculada a casos clínicos por lo que nos preguntamos si una cepa hipervirulenta como la cepa R20291 del ribotipo 027, la cual ha sido conocida por ocasionar pandemias en Estados Unidos, Canadá, Europa y también Chile, es capaz de entrar a las células epiteliales intestinales. Para ello infectamos células Caco-2 con esporas de la cepa R20291 por 8 h y fueron procesadas para MET, y de igual modo observamos que las esporas de la cepa R20291 son capaces de entrar en células Caco-2 (Figura 3D), y que más de una spora puede entrar en una célula. Dada la dificultad que tuvimos para encontrar este fenómeno en ambas líneas celulares nos hace creer que ocurre en pocas células de la población. Para nuestra perplejidad, encontramos una célula vegetativa dentro de la célula, lo cual da un indicio por primera vez de la existencia de un mecanismo intracelular durante la patogenicidad de *C. difficile* (Figura 3F).

Interesantemente, junto a gran parte de las esporas que encontramos adheridas y/o que ingresaron a células observamos pequeñas vesículas ubicadas en los lugares donde las esporas se adhieren al epitelio, las cuales tienen un tamaño menor a 200 nm (Figura 3G-K). Encontramos que esporas de *C. difficile* cepa 630 en T84 (Figura 3G, H) y cepa R20291 en células Caco-2 (Figura 3I) y la célula vegetativa (Figura 3J) se asocian a vesículas, las que, según su morfología y lo reportado en el estado del arte, corresponden a vesículas de clatrina las cuales son distinguibles por su alta densidad electrónica alrededor de la vesícula (Oh *et al.*, 1998). Del mismo modo observamos que en células T84 infectadas con la cepa 630 que esporas se asocian a vesículas, las que,

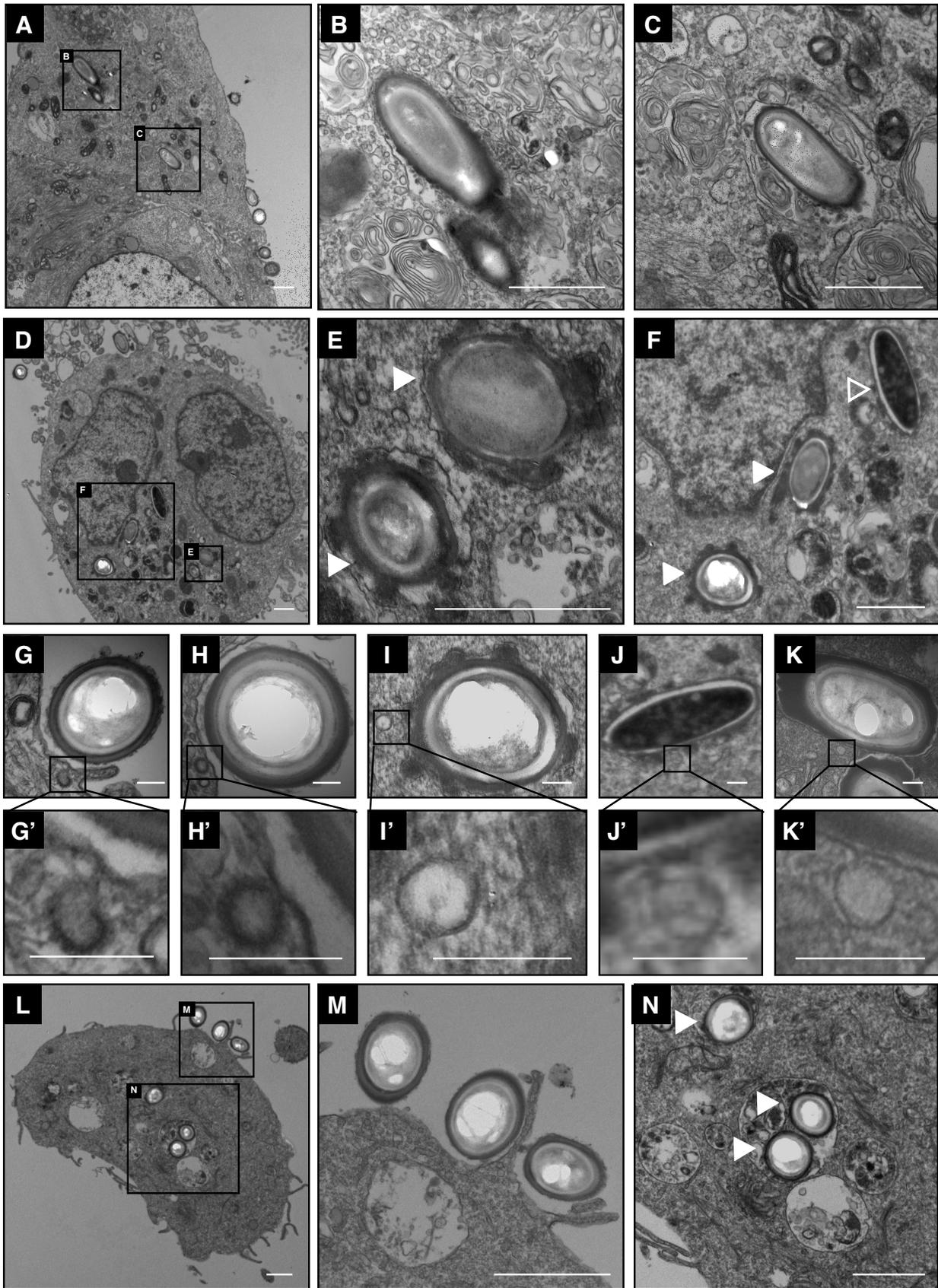


Figura 3: Esporas de *C. difficile* son capaces de entrar en células epiteliales intestinales y vesículas de clatrina, caveolina y vesículas tipo macropinosomas se encuentran cercanas a esporas adheridas.

Micrografías electrónicas de Transmisión de células polarizadas T84 **A)** y Caco-2 **D)** las que fueron infectadas por 5 h con células vegetativas y esporas de *C. difficile* de la cepa 630 y R20291 respectivamente, previamente incubadas SHN. Las células fueron lavadas y procesadas para ser analizadas por microscopía electrónica de transmisión. **B)** y **C)** corresponden a ampliaciones de **A)** donde se observan esporas intracelulares; **E)** y **F)** ampliaciones de **D)**, donde se observan tanto esporas **E)** como una célula vegetativa internalizada **F)**. En **G)**, **H)**, **I)** se observan vesículas, que, según su morfología, corresponden a vesículas cubiertas de clatrina asociadas a esporas de *C. difficile* adheridas e internalizadas. En **J)** y **K)** se observan vesículas, que, según su morfología corresponden a vesículas cubiertas de caveolina asociadas a una célula vegetativa y a una espora de *C. difficile* respectivamente. **G)**, **H)** y **K)** corresponden a esporas cepa 630 en T84 y **I)** y **J)** corresponden a esporas y a una célula vegetativa de la cepa R20291 respectivamente, en células Caco-2. Ampliaciones son mostradas abajo. Micrografía de células T84 **L)** infectadas esporas de la cepa 630. **M)** y **N)** ampliaciones de **L)**, donde se observa extensión de la membrana celular alrededor de una espora adherida **M)** y esporas dentro de vesículas tipo macropinosomas. **A) - D)**, **L) - N)** barras de escala representan 1µm y **G) - K)**, 200nm. [**L)**, tomadas con autorización de Cofré-Araneda, datos no publicados].

según su morfología y lo reportado en el estado del arte, corresponden a vesículas recubiertas de caveolina (Figura 3J y K), las cuales son distinguibles por su doble membrana y su baja densidad electrónica alrededor de ellas (Oh *et al.*, 1998). Además, observamos una espora que estaba siendo rodeada por un lamelipodium celular y la membrana celular bajo la espora se redondea tomando la forma de esta para lo que podría corresponder al comienzo de la formación una vesícula tipo macropinosoma alrededor de la espora (Figura 3L). Estos datos en su conjunto, sugieren que vesículas, que según su morfología y lo previamente reportado, tienen la estructura de vesículas recubiertas de caveolina, clatrina y macropinosomas, las cuales se asocian a esporas de *C. difficile* y podrían estar involucradas en la endocitosis de esporas mediada por macropinocitosis.

Clatrina y caveolina-1 se asocian alrededor de esporas de *C. difficile*.

Para corroborar que las vesículas recubiertas por clatrina o caveolina se asocian alrededor de las esporas de *C. difficile*, realizamos inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos IgY anti-espora y anticuerpo IgG de conejo anti-clatrina o caveolina. En este caso, se descartó el uso del suero de cabra anti-espora, ya que los secundarios anti-

conejo asociados a fluoróforo reconocen también la IgG de cabra, y en consecuencia se observa falsos positivos de colocalización. Es por ello que utilizamos IgY de pollo anti-espora, las que carecen del dominio Fc, eliminando así la reactividad cruzada entre el anticuerpo secundario anti-conejo con la IgY anti-espora. A diferencia de las células Vero las que sí expresan caveolina-1, las células Caco-2, no expresan (Lim *et al.*, 2009; Muehlhoefer *et al.*, 2000). Es por ello que decidimos utilizar ambas líneas celulares. En

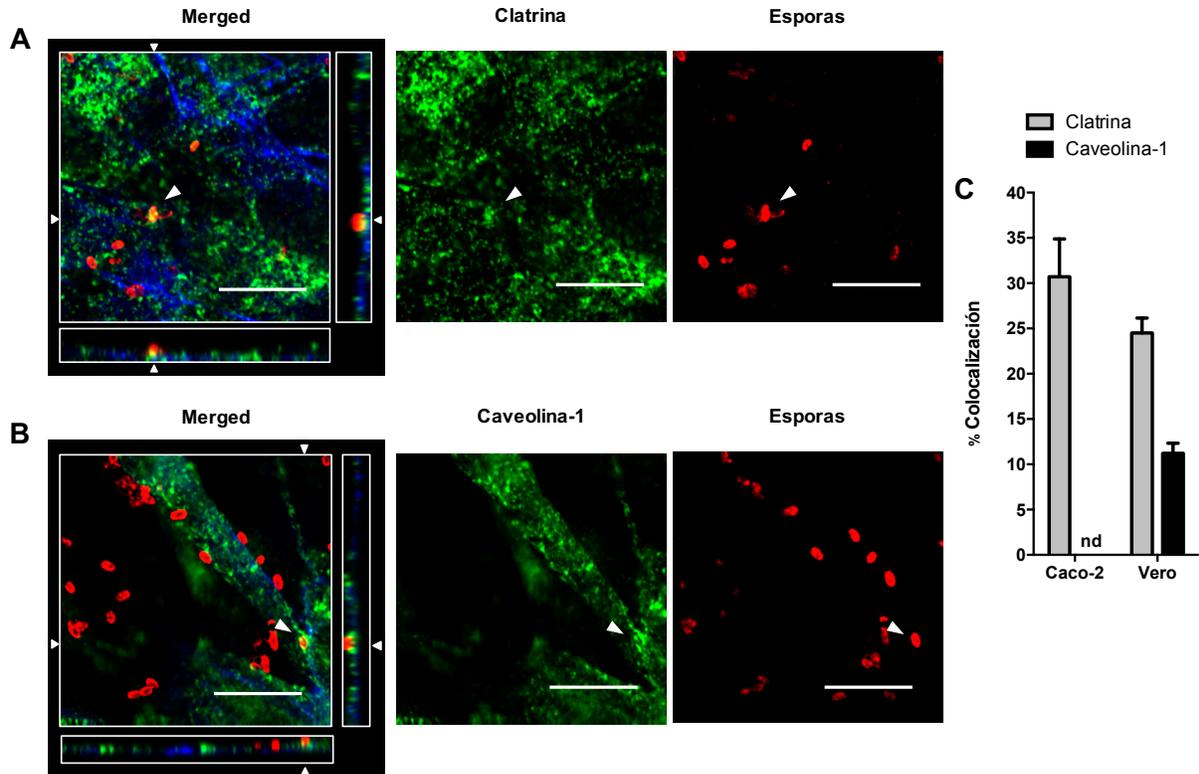


Figura 4: Esporas de *C. difficile* se asocian a vesículas recubiertas de clatrina y caveolina.

Células Vero fueron infectadas con esporas de la cepa R20291 con un MOI de 10 las cuales fueron detectadas mediante inmuno-indirecta con anticuerpos IgY anti-espora, y anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 647 (mostrado en rojo). Clatrina y caveolina endógena fueron detectadas con anticuerpos policlonales anti-clatrina y caveolina levantados en conejo y detectados con un anticuerpo anti-conejo conjugado a Alexa Fluor 568 (mostrado en verde). Filamentos de actina (mostrados en *merged*) fueron detectados con Faloidina conjugada a Alexa Fluor 488 (mostrado en azul). **A)** Clatrina, **B)** caveolina-1 de células Vero. En las zonas indicadas por cabeza de flechas se muestra que las vesículas se asocian alrededor de la espora en las 3 dimensiones espaciales. Las imágenes mostradas son representativas de al menos 300 esporas analizadas. Barras 10 μ m. **C)** Muestra el porcentaje de los casos positivos de colocalización tanto en células Caco-2 y Vero. En Caco-2 no se obtuvo datos para caveolina-1 (nd).

consecuencia, las células fueron infectadas por 3 h con esporas de la cepa R20291 con un MOI de 10. Las muestras fueron observadas mediante microscopía confocal y el análisis se realizó en los 3 planos cartesianos mediante la reconstrucción del plano ortogonal. En el caso de clatrina, observamos que esta proteína estaba estrechamente asociada al ~24% de las esporas de la cepa R20291 en células Vero (Figura 4A y C) y al ~30% del total de esporas en células Caco-2, se pudo observar que clatrina se asocia cercana a la espora marcándola y que en algunos casos que la rodean casi completamente en su base como se pudo observar en marcaje amarillo en el *merged* de la Figura 4A, la cual corresponde a una imagen representativa de lo observado. De igual modo en células Vero observamos que caveolina-1, se asocian al ~11% del total de esporas (Figura 4B y C). Nos intriga el por qué vesículas de aproximadamente 200 nm se asocian a esporas de *C. difficile* (las cuales son al menos 5 veces más grandes que las vesículas) y si son requeridas por las esporas para su ingreso. Por nuestras condiciones experimentales fue posible analizar ~100 esporas por condición. Estos resultados concuerdan con las micrografías de MET (Figura 3G-K), y en su conjunto sugieren que las vesículas recubiertas de clatrina y caveolina son reclutadas por las esporas.

Ya que observamos que las esporas de *C. difficile* se asocian a estructuras que, según la morfología y lo previamente reportado corresponden a lisosomas (Figura 3A y C), nos preguntamos si las esporas se asocian a endosomas tempranos, o si eran capaces de romper los endosomas. Para evaluar ello, monocapas de células Vero fueron infectadas con esporas de la cepa R20291 durante 3 h, y evaluamos si las esporas se asocian a EEA-1 (marcados de endosomas temprano) (Di Russo Case y Samuel, 2016) y a galactina-3 (marcador de rompimiento de endosoma) (Paz *et al.*, 2010) y que las esporas se asocian a estos marcadores en un 13,7% y un 5,3% respectivamente (Anexo 4).

Esporas de *C. difficile* se asocian a macropinosomas y promueven un reordenamiento de citoesqueleto de actina.

A continuación, nos preguntamos si macropinosomas se asocian directamente a las esporas de *C. difficile*. Para observar esto, realizamos ensayos de infección sobre

células Caco-2 con esporas de *C. difficile* R20291 previamente etiquetadas con Alexa Fluor 488. Para observar los macropinosomas marcamos la fase fluida con dextrano conjugado a Alexa Fluor 568 y mediante inmunofluorescencia indirecta marcamos esporas extracelulares con IgY anti-esporas R20291, el que fue detectado con un secundario asociado a Alexa Fluor 647, como fue descrito en metodología y finalmente las muestras fueron observadas por microscopía confocal. Observamos que algunas de las esporas que entraron a las células se asocian a macropinosomas, y que del total de esporas adheridas el ~5,4% de las esporas se asocia a macropinosomas (Figura 5A).

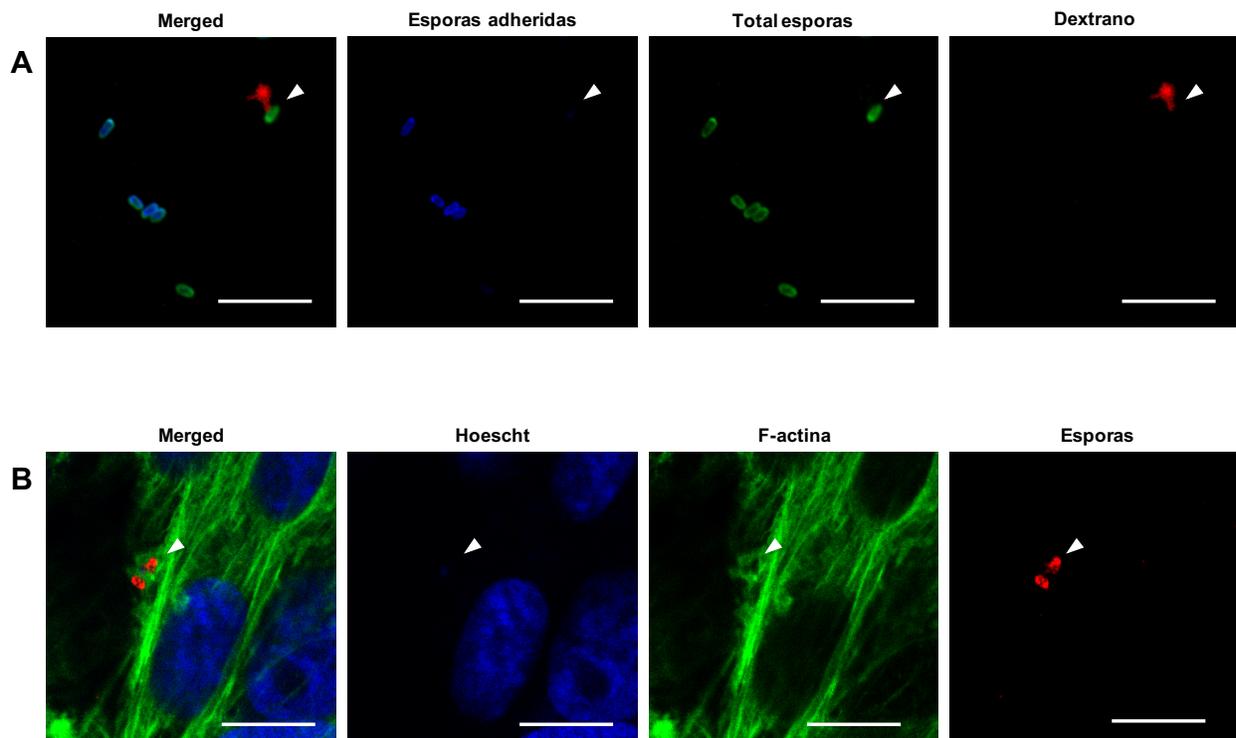


Figura 5: Esporas de *C. difficile* se asocian a macropinosomas y citoesqueleto de actina. Macropinosomas se asocian a esporas internalizadas de *C. difficile* **A**). Esporas *C. difficile* fueron previamente etiquetadas con ester succinimidil conjugado a Alexa Fluor 488 (verde) y el medio de infección fue marcado con dextrano conjugado a Alexa Fluor 568 (rojo). Las esporas adheridas fueron detectadas mediante inmunofluorescencia indirecta con IgY anti-espora, el que fue detectado con anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 647 (azul), del total de esporas solo el 5% se encontró asociado a macropinosomas. La imagen mostrada es representativa del análisis de al menos 300 esporas. Citoesqueleto de actina se reordena ante esporas de *C. difficile* **B**), esporas fueron detectadas con anticuerpo IgY anti-espora de *C. difficile* el que fue detectado con anticuerpo secundario anti-pollo 568 (rojo), F-actina fue detectado con faloidina conjugada a Alexa Fluor 488 (verde). Barras 10 μ m.

Paralelamente observamos que en células Vero (Figura 5B), y células Caco-2 (Resultados no mostrados) que las esporas de *C. difficile* generan la remodelación del citoesqueleto de actina. En su conjunto estos datos sugieren que la entrada de esporas depende del citoesqueleto de actina y que las esporas podrían ingresar en grandes vesículas tipo macropinosomas.

Uso de inhibidores de la vía endocítica de clatrina reduce el proceso de entrada de esporas de *C. difficile* en células epiteliales intestinales.

Dado que observamos que vesículas de clatrina se asocian a las esporas, nos

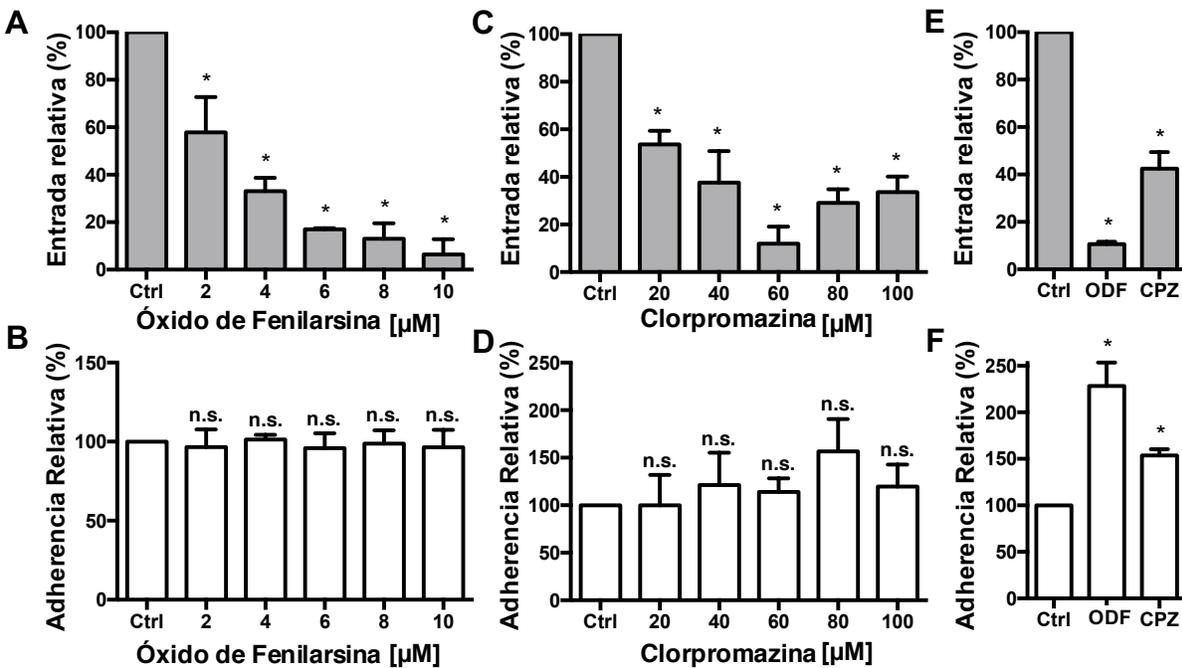


Figura 6: Entrada de esporas de *C. difficile* a células epiteliales es reducida por fármacos inhibidores de la vía endocítica de clatrina requiere de vesículas de clatrina. Monocapas de células Caco-2 **A-D)** y T84 **E), F)** fueron tratadas durante 1 h con inhibidores de endocitosis dependiente de clatrina; ODF en **A)** y **B)**, de clorpromazina en **C)** y **D)** con diferentes concentraciones de inhibidor. Luego las monocapas fueron infectadas con esporas de *C. difficile* de la cepa R20291 a un MOI de 10, en presencia de inhibidor durante 3 h. **E), F)** células T84 tratadas con la máxima concentración utilizada en Caco-2. Luego las células fueron fijadas, y, sin permeabilizar se etiquetó las esporas extracelulares con suero de cabra anti-espora, el que fue detectado con anticuerpo anti-cabra conjugado a Alexa Fluor 488. Las muestras fueron analizadas en microscopía de epifluorescencia como se describe en Materiales y Métodos. Los valores fueron comparados mediante t-test respecto al control. Asteriscos indican $P < 0.05$, n.s. indica diferencias no significativas.

preguntamos estas vesículas están involucradas en la entrada de esporas, para evaluar ello, realizamos infecciones con esporas de *C. difficile* R20291 en presencia de ODF, un inhibidor de la fosfotirosina fosfato y las proteínas RhoA, (Gerhard *et al.*, 2003), clorpromazina previene la formación de las fosas recubiertas de clatrina y provoca el enrejado de estas en membranas endosomales previniendo su reciclaje (McMahon y Boucrot, 2011) y, observamos que ambos inhibidores reducen la entrada de esporas de manera dependiente a la concentración de inhibidor (Figura 6A y C), reduciéndose hasta un 6,4% y un 33% respectivamente, y en células T84, la entrada se redujo en hasta un 10% y un 42% respectivamente (Figura 6E). Esta reducción no se debe a que los inhibidores afecten la adherencia de esporas y en consecuencia se registren menos esporas endocitadas, ya que no se observó variaciones en adherencia respecto al control en Caco-2 (Figura 6B y D), mientras que en T84 incrementó significativamente (Figura 6F). Para evaluar si la reducción en la entrada se debe a los efectos tóxicos producidos por los inhibidores utilizados, realizamos ensayos de viabilidad celular con azul de tripán y con MTT, y no observamos variaciones respecto a las células control (datos no mostrados). Interesantemente con el uso de estos inhibidores la entrada no se redujo a cero, incluso en la concentración máxima utilizada que no posee efectos tóxicos en las células, la cual en su conjunto sugiere que vesículas recubiertas de clatrina podrían estar involucradas en la entrada de esporas y que podrían existir otros mecanismos de ingreso independientes de clatrina.

Uso de inhibidores de la vía endocítica de caveolina y de las Src-quinasas reduce el proceso de entrada de esporas de *C. difficile* en células epiteliales intestinales.

En vista de que las vesículas de caveolina que también se asocian a las esporas de *C. difficile*, evaluamos si éstas eran requeridas para la entrada de esporas en células epiteliales intestinales, para lo cual utilizamos INDO para inhibir la entrada al citoplasma de caveolae y el reciclaje de caveolina-1 a la membrana celular (Sato *et al.*, 2009). En células Caco-2, tal como esperábamos no observamos una reducción en la entrada ni en la adherencia dependiente de la concentración de inhibidor (Figura 7A, B), dado que estas células no expresan caveolina-1. Sin embargo, en células T84 que sí expresan caveolina-1 la entrada se redujo en hasta un 41,5% (Figura 7E) respecto al control y la adherencia se incrementó en un 60% respecto al control. Otra familia de proteínas involucradas en

la endocitosis dependiente de caveolina es la familia de las Src-quinasasa, las cuales están involucradas en múltiples procesos de señalización celular, donde su activación es regulada por factores de crecimiento, citoquinas, adhesión y receptores de antígenos, lo cual es crítico para generar una respuesta a estímulos externos (Boggon y Eck, 2004). En el caso de la endocitosis mediada por caveolina, Las Src-quinasa fosforilan directamente a caveolina-1, gatillando así su ingreso a la célula luego de la activación del receptor de la albúmina del suero Gp60 (Blake *et al.*, 2000). Se ha reportado que el inhibidor SU6656 inhibe específicamente esta familia de proteínas. Sin embargo, esta familia está involucrada en varias vías de señalización, por lo cual, no es un inhibidor

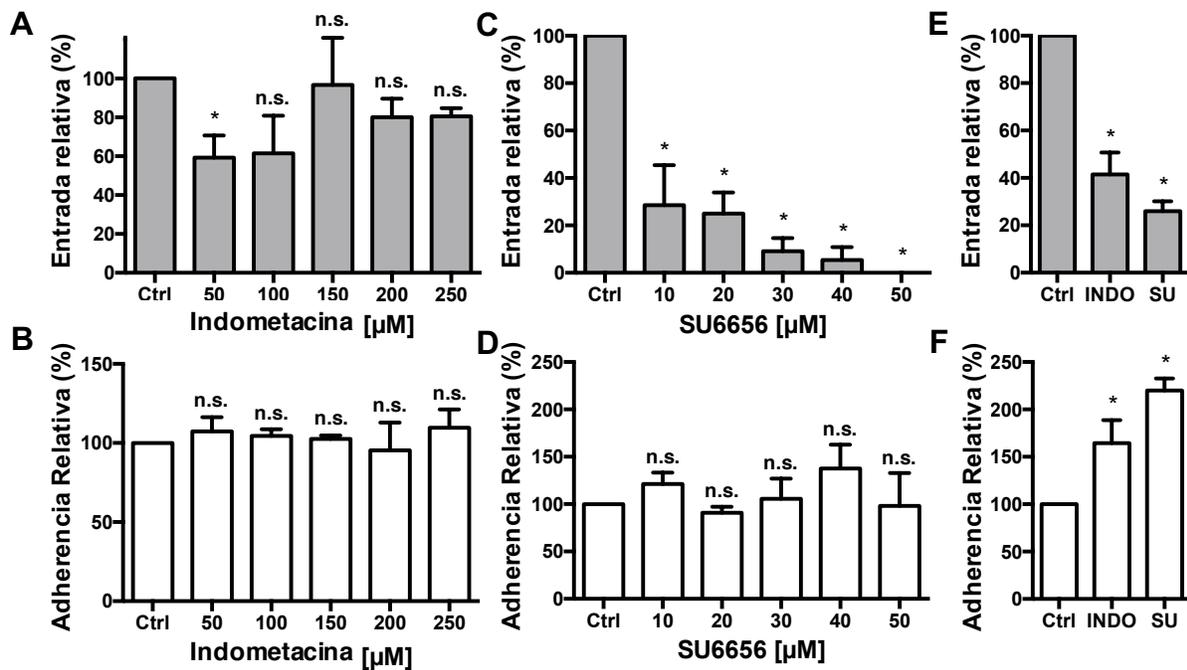


Figura 7: Entrada de esporas de *C. difficile* a células epiteliales es reducida por fármacos inhibidores de la vía endocítica de caveolina y de señalización por Src-quinasa.

Monocapas de células Caco-2 **A)-D)** y T84 **E), F)** fueron tratadas durante 1h con INDO como inhibidor de endocitosis dependiente de caveolina **A), B)** y SU6656 como inhibidor de la familia Src-quinasa **C), D)** con diferentes concentraciones de inhibidor. Luego las monocapas fueron infectadas con esporas de la cepa R20291, en un MOI de 10, en presencia del inhibidor durante 3 h. **E), F)** células T84 tratadas con la máxima concentración utilizada en Caco-2. Luego las células se trataron para ser analizadas en microscopía de epifluorescencia como se indica en Figura 6. Los valores fueron comparados mediante t-test respecto al control. Asteriscos indican $P < 0.05$, n.s. indica diferencias no significativas.

determinarte para descartar la vía de ingreso de caveolina-1. Observamos que en células Caco-2 SU6656 reduce la internalización completamente al ser agregado en una concentración de 50 μ M (Figura 7C) mientras que en células T84 la entrada se redujo hasta un 26% (Figura 7E) en comparación al control. Las concentraciones utilizadas de ambos inhibidores en las dos líneas celulares utilizadas no afectan la viabilidad celular conformacional ni metabólica (datos no mostrados).

Estos resultados nos sugieren que el uso de inhibidores que afectan la vía endocítica de caveolina reduce la entrada de esporas en células T84 y que podría existir un mecanismo de señalización río abajo de la célula donde la señalización por la familia Src-quinasa es crucial para permitir la entrada de las esporas.

La liberación de vesículas recubiertas de clatrina o caveolina mediada por dinamina, es crucial para el proceso de entrada de esporas.

Pues, dado que nuestros resultados sugieren que las vesículas recubiertas de clatrina y caveolina están involucradas en la entrada de las esporas de *C. difficile*, nos preguntamos si la liberación de las vesículas hacia el medio intracelular es requerida para el proceso de entrada de las esporas de *C. difficile*, lo cual sería un indicio de que existen mecanismos de señalización por interacciones entre componentes de la superficie de la espora con receptores acoplados a las vesículas de endocitosis. Para evaluar esta hipótesis realizamos ensayos de infección en presencia de DYN, el cual inhibe específicamente dinamina-1 y 2 (Kirchhausen *et al.*, 2009). En células Caco-2 observamos que DYN reduce la entrada de las esporas a un 26,5% respecto al control en células (Figura 8A) y a un 22% en T84 (Figura 8C). Interesantemente en células Caco-2 observamos un incremento en la adherencia dependiente de la concentración de inhibidor utilizado, hasta un 56% respecto al control (Figura 8B) y no hubo variaciones en la adherencia en T84 (Figura 8D). Las concentraciones utilizadas de DYN no causaron efectos citotóxicos a las células evaluadas con azul de tripán y MTT (datos no mostrados). Lo cual en su conjunto sugiere que la liberación de las vesículas hacia el medio intracelular es requerida para el ingreso de esporas, aunque un ~20% de las esporas en relación al control aún ingresa incluso inhibiendo dinamina-2, lo cual indicaría que existen mecanismos de entrada de esporas de *C. difficile* independientes de dinamina.

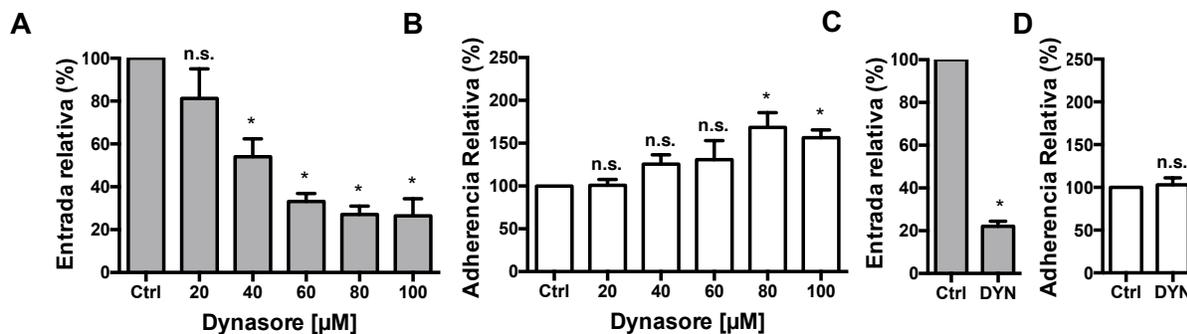


Figura 8: La liberación de vesículas de clatrina y caveolina es requerida para el ingreso de esporas de *C. difficile*.

Monocapas de células Caco-2 **A), B)** y T84 **C), D)** fueron tratadas durante 1 h con diferentes concentraciones de DYN, inhibidor de dinamina-2. Luego, las monocapas fueron infectadas con un MOI de 10 con esporas de *C. difficile* de la cepa R20291 en presencia del inhibidor durante 3 h. Luego las muestras fueron procesadas para microscopía de epifluorescencia como se describe en la Figura 6 y en Materiales y Métodos. Los valores fueron comparados mediante t-test respecto al control. Asteriscos indican $P < 0.05$, n.s. indica diferencias no significativas.

EL uso de fármacos inhibidores de macropinocitosis reduce el proceso de entrada de esporas de *C. difficile* en células epiteliales intestinales.

Micrografías de MET y confocal sugieren que macropinosomas se asocian a esporas de *C. difficile* y dado que vesículas con un tamaño de al menos 5 veces más pequeñas serían requeridas para que las esporas entren en células epiteliales intestinales, y ante la obvia diferencia de tamaño es imposible que una espora entre a las células por estas vesículas, entonces nos preguntamos si finalmente las esporas ingresan a las células epiteliales mediante un mecanismo tipo macropinocitosis. Para evaluar esto, utilizamos varios inhibidores que tienen efecto en distintas etapas del proceso; EIPA el cual es un inhibidor de una bomba de Na^+/H^+ , la cual, al ser inhibida, acidifica el medio intracelular e inactiva a proteínas necesarias para generar la extensión que ingresa a la célula. PI3K es una proteína que está involucrada en múltiples procesos de señalización celular. En el caso de macropinocitosis, PI3K está involucrada en la fusión de la extensión de la membrana generando el macropinosoma (El-Sayed y Harashima, 2013). La PI3K se inhibió específicamente con LY y WM, fármacos que se unen de forma

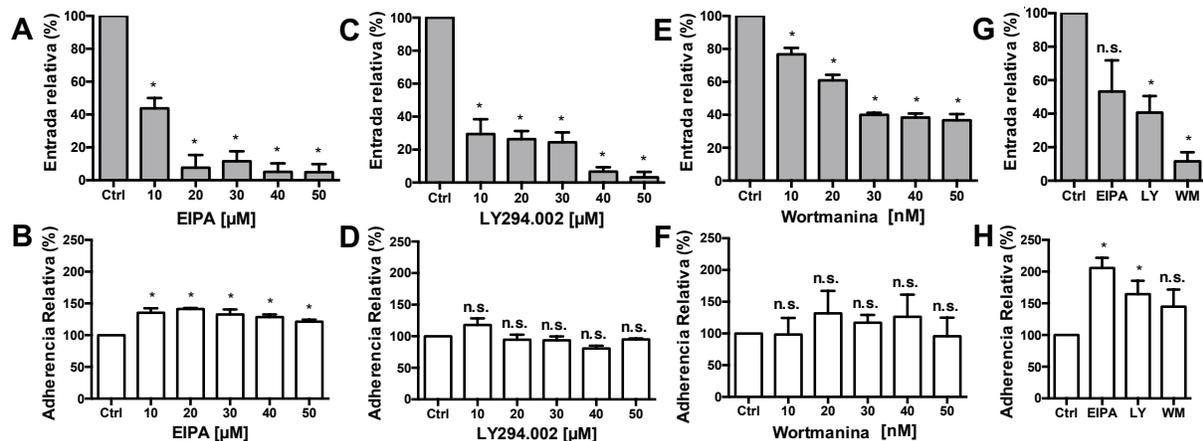


Figura 9: Esporas de *C. difficile* ingresan por macropinocitosis.

Monocapas de células Caco-2 **A) - F)** y T84 **G), H)**, fueron tratadas durante 1 h con concentraciones crecientes de inhibidores de macropinocitosis; EIPA **A), B)**, LY **C), D)** y WM **E), F)**. Luego, las monocapas fueron infectadas con esporas de la cepa R20291 a un MOI de 10, en presencia del inhibidor durante 3 h. Células T84 **G), H)** fueron tratadas con la máxima concentración utilizada en Caco-2. Entonces las células fueron tratadas para ser analizadas en microscopía de epifluorescencia como se describe en Figura 6 y Materiales y Métodos. Los valores fueron comparados mediante t-test respecto al control. Asteriscos indican $P < 0.05$, n.s. indica diferencias no significativas.

reversible e irreversible respectivamente. Al evaluar estos inhibidores en células Caco-2 y T84 encontramos que todos los inhibidores utilizados reducen la entrada de esporas, lo cual sugiere que la endocitosis de esporas depende de un proceso tipo macropinocitosis. EIPA reduce la entrada hasta un 5% en Caco-2 (Figura 9A) y 53% en T84 (Figura 9G). La inhibición de PI3K por LY reduce la entrada a 3% y 40% en Caco-2 y T84 respectivamente (Figura 9C y G), mientras que WM reduce la entrada hasta un 36% y un 11% en células Caco-2 y T84 respectivamente (Figura 9E y G). En células Caco-2 no observamos diferencias significativas en la adherencia al utilizar LY o WM (Figura 9D y F), pero con EIPA, la adherencia incrementó en ~50% respecto al control (Figura 9B). Interesantemente observamos que el uso de estos inhibidores en células T84 incrementó la adherencia un 100% para EIPA, 64% para LY y un 44% para WM (Figura 9H). Para todas las concentraciones de inhibidores utilizadas no hubo disminución en la viabilidad celular determinadas por métodos de azul de tripán o MTT (datos no mostrados).

Esporas de *C. difficile* son capaces de entrar en células intestinales *in vivo*.

Para evaluar si el proceso de entrada de esporas de *C. difficile* ocurre *in vivo*, ratones de 1 año fueron infectados en el íleon del intestino delgado, y en la zona ascendente del intestino grueso mediante la técnica de obstrucción intestinal durante 6 h, y los tejidos infectados extraídos y procesados para ser analizados por microscopía confocal. De estos tejidos, observamos que las esporas se adhieren tanto a intestino delgado y grueso, pero se adhieren en mayor medida al intestino delgado que al intestino grueso (datos no mostrados). Además, observamos que las esporas pueden entrar en criptas de intestino grueso (Figura 10A) y vellosidades del intestino delgado (Figura 10B)

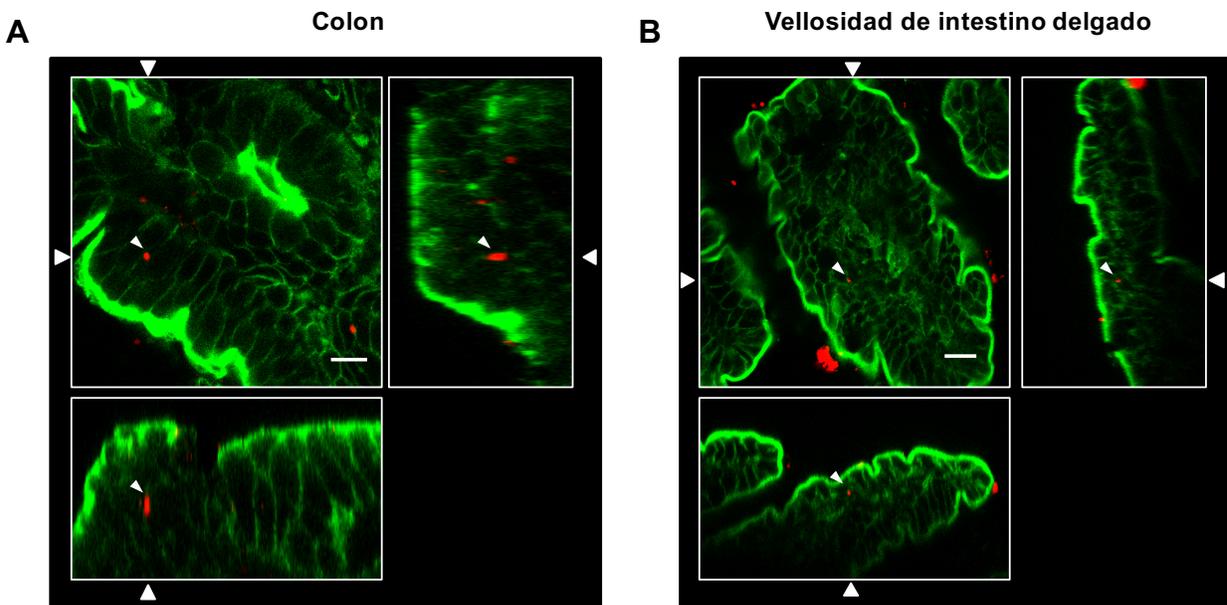


Figura 10: Esporas de *C. difficile* son capaces de entrar en células de intestino delgado y grueso de ratón.

Secciones de 1cm² de intestino delgado y grueso de ratones C57BL/6 fueron infectados 5x10⁸ esporas de *C. difficile* durante 6 h mediante técnica de asa ileal. Luego las secciones de intestino infectado fueron extraídos, fijado con PFA 4% con sacarosa 30% durante toda la noche y fueron procesados para inmunofluorescencia directa. Los tejidos fueron bloqueados, y el citoesqueleto de actina fue etiquetado con Faloidina (verde), y las esporas fueron teñidas con anticuerpos policlonales IgY contra esporas de *C. difficile* y detectadas con anticuerpo secundario (rojo). Y finalmente fueron observadas en microscopía confocal. **A)** Colon **B)** intestino delgado. Imágenes son representativas de 3 sitios diferentes, analizados en 3 ratones diferentes. Flechas indican esporas que se encuentran dentro del tejido. Barra de escala 10µm.

y en las criptas de intestino delgado (resultado no mostrado). Solo algunas esporas son capaces de entrar en tejido, como se puede observar en las esporas que están indicadas con cabeza de flecha en las Figuras 10A y B. Lo cual demuestra que las esporas de *C. difficile* pueden entrar en células epiteliales intestinales, y este podría ser un mecanismo para promover la persistencia de esporas en el intestino para causar infecciones recurrentes.

Un fármaco de uso comercial es capaz de reducir la entrada de esporas *in vitro*.

El hecho de que las esporas de *C. difficile* sean endocitadas por células epiteliales intestinales *in vitro* e *in vivo*, nos hace presumir que este sería uno de los mecanismos por los cuales las esporas podrían persistir en el hospedero para causar infecciones recurrentes, es por ellos que recurrimos a buscar fármacos comerciales de uso humano que, *in vitro* fueran capaces de reducir la entrada de las esporas. Es así como llegamos a un fármaco, denominado como sustancia X, el cual fue probado del mismo modo que los otros inhibidores descritos en metodología para el objetivo 1. Y observamos que la sustancia X reduce la entrada de las esporas significativamente en células Caco-2 hasta un 21% en relación al control (Figura 11A), en un proceso dependiente de la

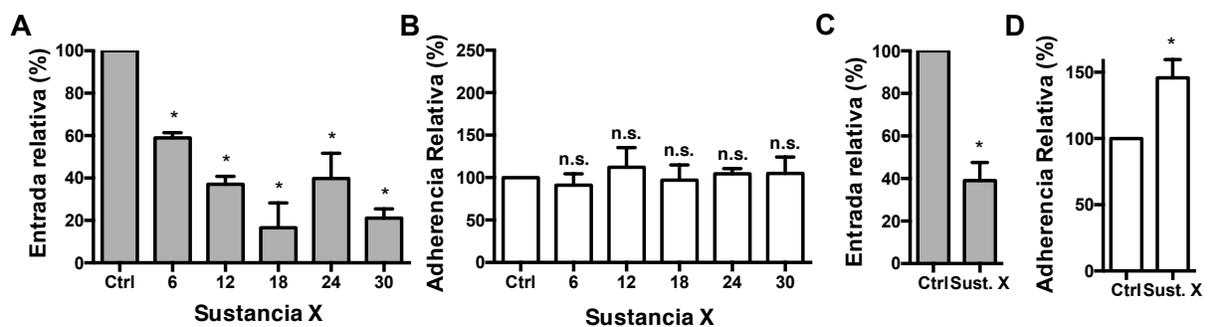


Figura 11: Entrada de esporas de *C. difficile* a células epiteliales intestinales es inhibida por la sustancia X.

Células Caco-2 **A)**, **B)** y T84 **C)**, **D)** fueron tratadas con concentraciones crecientes de la sustancia X por 1 h y luego infectadas durante 3 h en presencia de la sustancia X con MOI de 10 de esporas R20291 preincubadas durante 1h con SFB. Células T84 fueron infectadas con la máxima concentración utilizada en Caco-2. Luego fueron fijadas y tratadas para ser analizadas mediante microscopía de epifluorescencia como se describe en la Figura 6 y en Materiales y Métodos. Los valores fueron comparados mediante t-test respecto al control. Asteriscos indican $P < 0.05$, n.s. indica diferencias no significativas.

concentración de inhibidor. En células T84, la sustancia X redujo la entrada hasta un 39% respecto al control (Figura 11C). En células Caco-2 y T84 no se observó diferencias en la viabilidad celular por métodos de azul de tripán y MTT (resultados no mostrados). En células Caco-2 la adherencia no se vio afectada (Figura 11B), sin embargo, en T84 la adherencia incrementó en un 46% (Figura 11D), lo cual sugiere que en esta línea celular existen mecanismos de compensación ante el uso de este fármaco, lo cual es utilizado por las esporas para su adherencia. Cabe destacar que este fármaco está aprobado por la FDA y los efectos secundarios son mínimos.

La sustancia X es capaz de reducir los casos de ICD-R.

En base a que fuimos capaces de encontrar un fármaco de uso comercial el que reduce la endocitosis de esporas *in vitro*, nos preguntamos si el uso de este fármaco reduce los casos de ICD-R *in vivo*, para ello infectamos ratones C57BL/6 con esporas de *C. difficile* cepa R20291, y fueron tratados con la sustancia X la que fue administrada de forma intraperitoneal y de forma oral. Inicialmente evaluamos el efecto de la sustancia X administrada de forma intraperitoneal, según el diseño experimental indicado en la Figura 12A, y evaluamos los parámetros de pérdida de peso, cantidad de esporas en deposiciones y diarrea. Los ratones fueron observados diariamente, y se midió el peso, el aspecto. Se tomó muestras de deposiciones para análisis observacional de diarrea y de UFC de esporas de *C. difficile*. Durante el curso de ensayo observamos que no existen variaciones de peso significativas entre ambos grupos. Sin embargo, los ratones tratados con la sustancia X administrada de forma intraperitoneal, tienden a incrementar ligeramente su peso, alcanzando a observar un incremento del 6% en el día 11 respecto al día 0 (Figura 12B). La abundancia de esporas en las deposiciones comienza a incrementar al día siguiente de la infección tanto para el grupo tratado con la sustancia X y el no tratado (control). Una vez comenzada la administración de vancomicina el día 3 la cantidad de UFC decrece el día 4 hasta el límite de detección de la técnica utilizada. Una vez suspendido el tratamiento con vancomicina el día 9, se observa un incremento de las UFC el día 10, a niveles comparables con la cantidad de esporas en deposiciones en el cuadro inicial (Figura 12C). Interesantemente observamos que la diarrea del cuadro inicial, observada el día 2, el 60% (6/10) de los ratones control presentó diarrea, mientras que el 11% (1/9) de los ratones tratados con la vancomicina más sustancia X presentó

diarrea (Figura 12D y E). El día 7, finalizado el tratamiento con vancomicina, 3 ratones fueron escogidos azarosamente para evaluar histología, y en variables de daño, edema e infiltración celular, no obstante, no observamos diferencias significativas entre ambos grupos (resultados no mostrados). Observamos que la recurrencia se manifestó el día 9 (2 días después de finalizar el tratamiento con vancomicina) y esta se fue agravando con el paso de los días. Por ejemplo, el día 12 el 57% (4/7) de los ratones control presentó diarrea, mientras que solamente el 16% (1/6) de los ratones tratados con la sustancia X presentó diarrea (Figura 12D y F). Los ratones fueron monitoreados hasta el día 16 (9 días después de vancomicina) y observamos que el 100% de los ratones control presentó recurrencia 5 días finalizado el tratamiento con vancomicina, mientras que el 33% de los ratones tratados no presentó recurrencia (Figura 12G). En resumen, la administración de la sustancia X intraperitoneal junto a vancomicina de forma oral, no reducen las esporas eliminadas en deposiciones, ni el daño histológico, pero reduce los casos de diarrea en el 67% de los ratones tratados.

A continuación, nos preguntamos si la administración oral de la sustancia X era más efectiva al administrarla de forma intraperitoneal, (utilizando excipientes acordes a este tipo de administración). Para lo cual 5 ratones fueron tratados sólo con vancomicina, 5 con vancomicina y sustancia X. En este caso, extendimos el tiempo de uso de vancomicina de 5 a 7 días según se muestra en la Figura 13A. En este ensayo, evaluamos variables de pérdida de peso, UFC en deposiciones, diarrea, daño histológico en el día de la recurrencia (día 12), la cantidad de esporas adheridas al tejido colónico y como indicador de cultivo toxigénico de *C. difficile* se evaluó los niveles de toxinas en el contenido cecal. No observamos diferencias significativas en peso entre los grupos tratados con vancomicina y los tratados con vancomicina más sustancia X. El tratamiento con vancomicina + sustancia X mostró tener los menores niveles de esporas en deposiciones el día 2 (3,0 unidades logarítmicas) en comparación a los ratones tratados sólo con vancomicina (3,8 unidades logarítmicas). Sin embargo, el día 3 éstos se invierten. Mientras que el día 11 (día anterior a la recurrencia) se observan niveles similares en las UFC de esporas de *C. difficile* en deposiciones para todos los ratones, excepto para los ratones tratados solo con la sustancia X que presentan mayores cantidades de UFC en deposiciones (Figura 13C). Interesantemente de modo similar a

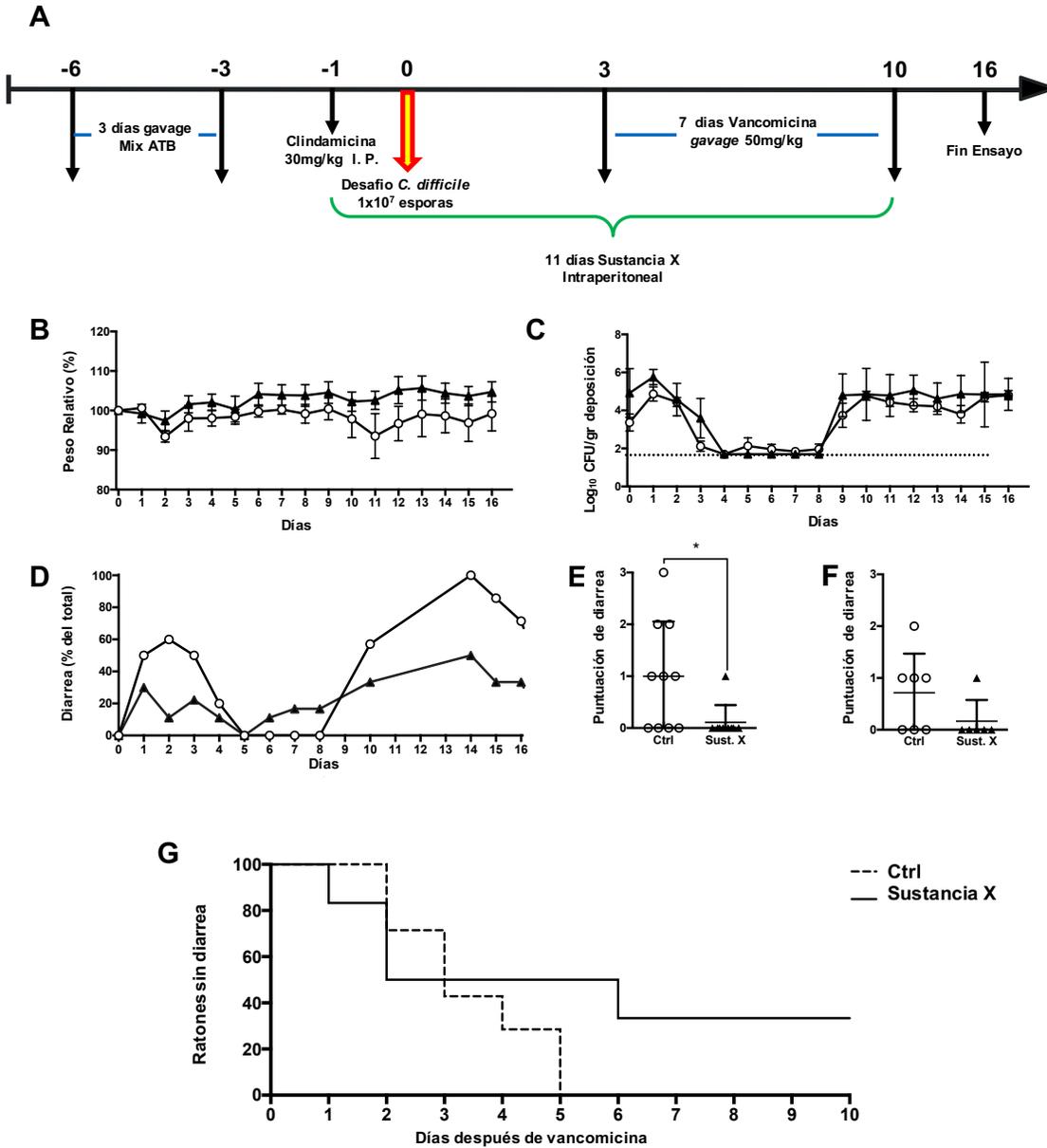


Figura 12: La administración por vía intraperitoneal de la sustancia X reduce la diarrea de la infección por *C. difficile* recurrente.

Para evaluar el efecto de la sustancia X administrada de forma intraperitoneal en la ICD-R se utilizó un modelo murino de recurrencia de ICD-R descrito por Sun *et al.*, 2011, con las modificaciones descritas en metodología. **A)** Esquema del diseño experimental de infección. Todos los ratones fueron tratados con una mezcla de 5 antibióticos durante 3 días, luego se evaluaron durante 2 días y al día siguiente fueron tratados con clindamicina y 9 ratones fueron tratados con la sustancia X y 10 ratones no fueron tratados con la sustancia X (control), al día siguiente fueron infectados con 10^7 esporas de *C. difficile* y se evaluaron durante 2 días donde se manifiesta la infección inicial y entonces fueron tratados con vancomicina durante 7 días. Finalizado el tratamiento con vancomicina, 3 ratones fueron extraídos para análisis

Continúa en siguiente página

histológico de ciego y colon. Los ratones fueron evaluados diariamente hasta el día 16 en que fueron sacrificados. **B)** Promedio del peso diario de los ratones tratados con vancomicina control (círculos blancos) y tratados con vancomicina más sustancia X (triángulos negros). **C)** Carga de UFC de esporas de *C. difficile* en las deposiciones recolectadas diariamente fueron hidratadas, tratadas con etanol, maceradas y sembradas en placas TCCFA como se indica en Materiales y Métodos. La línea punteada indica el límite de detección. **D)** puntaje de diarrea de las deposiciones recolectadas diariamente según se indica en metodología. **E)** y **F).** Puntuación de diarrea observado en los días 2 y 12 respectivamente. **G)** Indica el tiempo en que los ratones tardaron en presentar la recurrencia. Asteriscos indican $P < 0.05$.

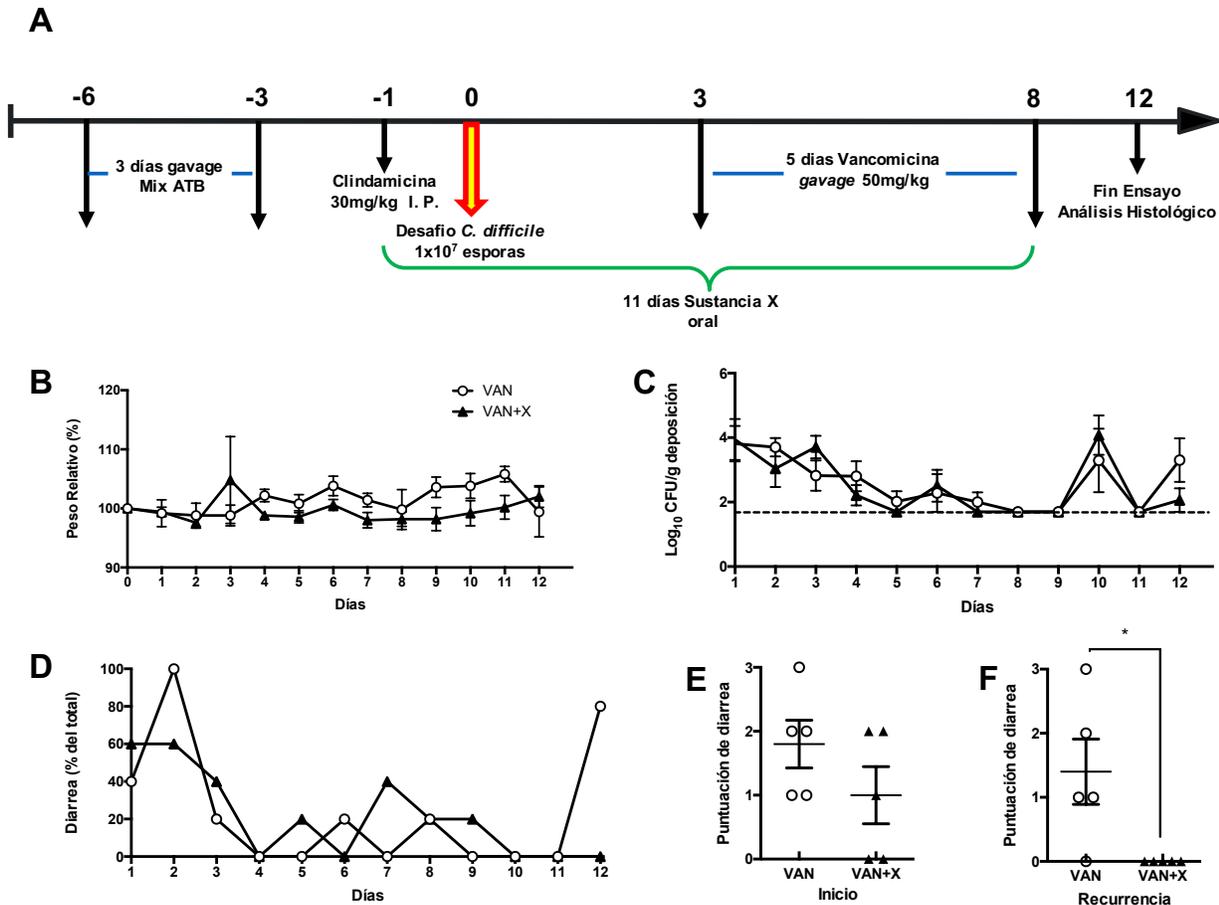


Figura 13: La administración por vía oral de la sustancia X reduce la diarrea de la infección por *C. difficile* recurrente.

Efecto de la sustancia X administrada de forma oral, en la ICD-R. Para lo cual se utilizó el modelo murino de recurrencia de ICD como se describe en la leyenda de la Figura 12. **A)** Esquema del diseño experimental de infección. **B)** Promedio del peso de los ratones. **C)** Carga de UFC de esporas en deposiciones, para lo cual las deposiciones fueron hidratadas, tratadas con etanol, maceradas y sembradas en placas TCCFA como se indica en metodología. Línea punteada indica el límite de detección. **D)** Porcentaje promedio de ratones con diarrea, en ratones tratados, la diarrea se reduce en un 40% el día 2 y en un 80% el día 12. **E)** y **F)** Puntuación de diarrea observado en los días 2 y 12 respectivamente. Asteriscos indican $P < 0.05$.

cuando administramos la sustancia X de forma intraperitoneal, observamos el día 2 que el 100% (5/5) de ratones que fueron tratados con vancomicina presentaron diarrea mientras que el 60% (3/5) de los ratones tratados con vancomicina más sustancia X presentó diarrea (Figura 13D y E). Mientras que en el día 12, de los grupos de ratones, el 25% (1/4) de los no tratados, el 50% (2/4) de los tratados con la sustancia X, el 80% de los tratados con vancomicina y el 0% de tratados con vancomicina más sustancia X presentó diarrea (Figura 13D, F). Lo cual sugiere que la administración de formulación de vancomicina más sustancia X protege a los ratones de tener recurrencia de la infección por *C. difficile*.

La sustancia X no reduce el daño del epitelio intestinal durante la ICD-R.

Ante el hecho de que el tratamiento de vancomicina más sustancia X reduciría los cuadros de diarrea en la ICD y la ICD-R, pero no así la carga de esporas, ya que las UFC de spora no sigue una tendencia durante el curso de los tratamientos, nos preguntamos si la sustancia X es capaz de reducir el daño causado por la infección a nivel histológico tanto en el ciego como en el colon (Figura 14). En base a los puntajes de daño histológicos definidos como infiltración celular, edema y daño epitelial no se observaron diferencias entre ambos grupos, lo cual indica que la sustancia X no es capaz de reducir el daño en el tejido, o bien, dada la carencia de diarrea el día 12, puede que el daño observado haya sido causando durante la infección inicial y no se haya recuperado tras finalizar el experimento.

La sustancia X disminuye la carga de esporas en el tejido colónico, pero no la citotoxicidad del contenido cecal.

Ya que la reducción en la diarrea el día 12 por la sustancia X no implica un menor daño del epitelio intestinal, nos preguntamos entonces si el tratamiento con la sustancia X afecta la adherencia de esporas al tejido colónico, para lo cual parte del íleon fue macerado y sembrado en placas TCCFA como se describe en materiales y métodos, y observamos que las UFC de esporas adheridas al colon se reducen significativamente en ratones tratados con la sustancia X (Figura 15B), incluso se encontró que en el colon de 2 ratones tratados con sustancia X la adherencia de esporas fue equivalente al límite de detección. En consecuencia, nos preguntamos si el contenido del ciego de ratones

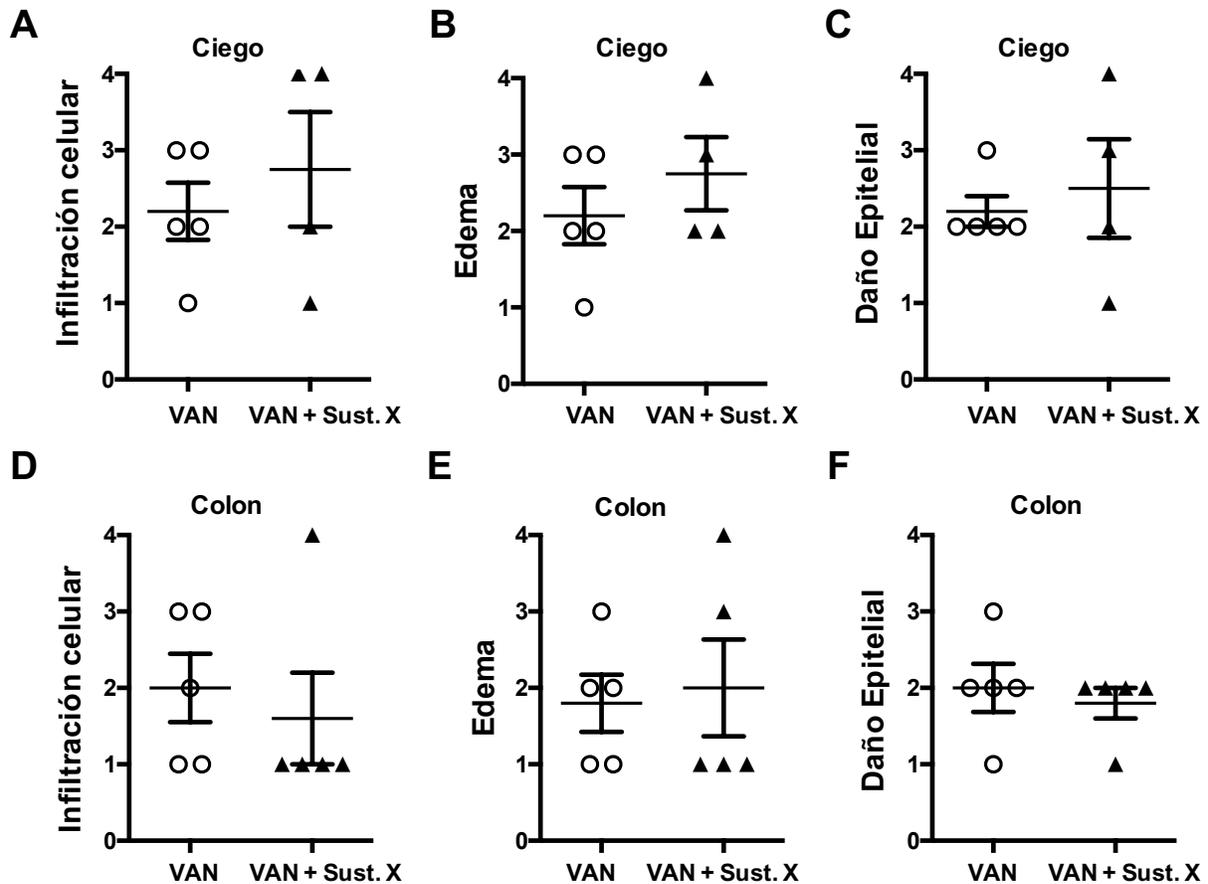


Figura 14: La sustancia X no reduce el daño histológico durante la ICD-R en ratones tratados.

Tejido ciego y colon de ratones tratados con la sustancia X de forma oral junto a vancomicina y el grupo tratado con vancomicina, fue extraído el día 12, según se indica en Figura 13A y en Materiales y Métodos para ser analizado para variables de daño histológico según los criterios indicados en el Anexo 5. **A)-F)** distribución y valor promedio de las puntuaciones histológicas de muestras de ciego **A)-C)** y de muestras de colon **D)-F)**.

tratados, tiene un menor efecto citotóxico que el control. Para responder esta pregunta, células Vero fueron desafiadas con sobrenadante del contenido cecal obtenido el día 12 y al estar con elementos tóxicos como toxinas de *C. difficile* observamos al día siguiente la pérdida de su morfología alargada normal. De esto, observamos que no existen diferencias significativas en la citotoxicidad del contenido cecal entre ambos grupos (Figura 15B). En consecuencia, estos datos sugieren que la sustancia X no reduce la citotoxicidad del contenido cecal, pero si la cantidad de esporas adheridas al tejido colónico.

Para nuestra sorpresa encontramos que 2 ratones que no presentaron carga de UFC de esporas de *C. difficile* en el colon, presentaron una puntuación de diarrea igual a 0. En base a ello nos preguntamos si existe una correlación lineal entre la puntuación de diarrea y la carga de UFC/g de tejido, y obtuvimos un coeficiente de correlación (R^2) igual a 0,7 (Anexo 7), es decir, existe una correlación positiva entre ambas variables. Por lo cual es de interés aumentar la cantidad de réplicas biológicas para establecer una línea de tendencia, la cual eventualmente nos permitiría predecir la cantidad de esporas adheridas en el tejido intestinal según el tipo de diarrea que tenga el ratón, lo cual posiblemente podría extrapolarse a humanos. En resumen, en ratones tratados con la sustancia X, la infección por *C. difficile* mantiene su curso a nivel del lumen, es decir, crecimiento de células vegetativas, producción de toxinas y generación de esporas. Sin

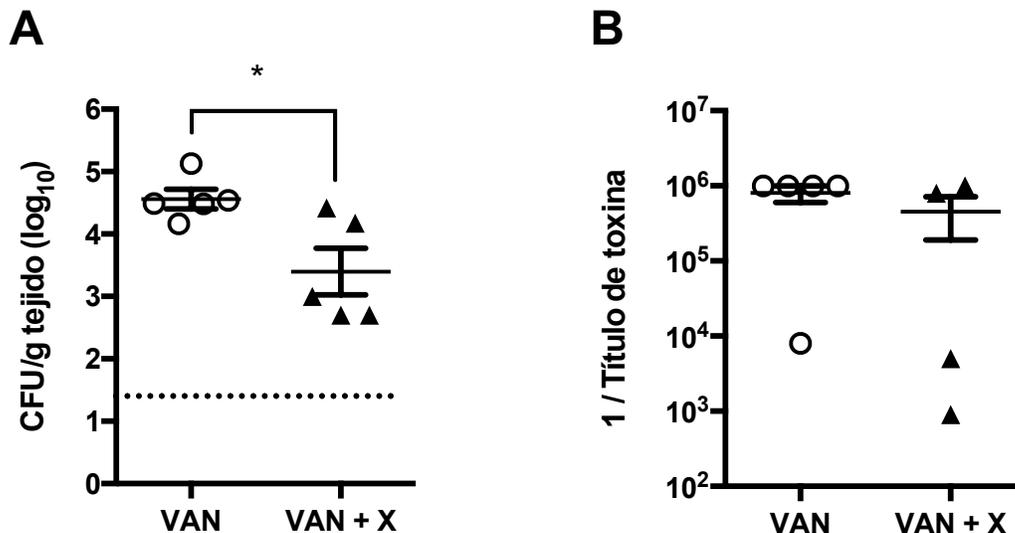


Figura 15: La sustancia X reduce la carga de esporas del tejido colónico, pero no la citotoxicidad del contenido cecal.

A) Carga de UFC de esporas de *C. difficile* en el tejido colónico de ratones tratados y control. Un fragmento del colon fue pesado, macerado y sembrado en placas TCCFA como se describe en Materiales y Métodos. Línea punteada indica el límite de detección. **B)** Citotoxicidad del contenido cecal de ratones tratados con la sustancia X y control, fue determinado al infectar monocapas de células Vero con sobrenadante esterilizado por filtración de una dilución de contenido cecal e incubado por 24 h. El punto final del título fue determinado como se describe en metodología. Barras de error representan el error estándar de la media. Los valores fueron analizados mediante ANOVA. Asteriscos indican $P < 0.05$.

embargo, la adherencia de las esporas con las células del hospedero es reducida, lo cual nos hace creer que asimismo se reduce la entrada de esporas a las células del epitelio colónico y en consecuencia se reduciría la cantidad de esporas intracelulares las que serían las principales responsables de la recurrencia de la infección por *C. difficile*. Por lo cual para comprobar esta hipótesis sería clave evaluar mediante inmunofluorescencia de tejido colónico si la sustancia X reduce la cantidad de esporas adheridas y endocitadas por el tejido intestinal, una arista que no será abordada en este trabajo de tesis.

DISCUSIÓN

Se ha demostrado que las esporas de *C. difficile* son esenciales para la iniciación, persistencia y diseminación de la ICD (Deakin *et al.*, 2012), en este contexto la interacción de las esporas de *C. difficile* con el hospedero, en particular la endocitosis de las esporas podría ser esencial para la persistencia. Los datos presentados en este trabajo muestran varias aristas inexploradas del mecanismo de persistencia de las esporas, en particular, nuestros datos demuestran que: (i) vesículas de clatrina y caveolina se asocian a las esporas de *C. difficile* adheridas y endocitadas, y que el uso de fármacos inhibidores de las vías de endocitosis de clatrina y caveolina, reducen la entrada de esporas, que (ii) macropinosomas se asocian a esporas de *C. difficile* endocitadas y que fármacos que inhiben proteínas involucradas en de señalización requeridas para la macropinocitosis reducen la entrada de esporas de *C. difficile*, y (iii) que el uso de un inhibidor de endocitosis *in vivo*, reduce los cuadros clínicos de la recurrencia de la ICD.

El fenómeno de entrada de esporas a células epiteliales intestinales fue descrito en esporas de *B. anthracis* las cuales son capaces de entrar a células epiteliales pulmonares en un proceso dependiente de integrinas $\alpha_2\beta_1$, la proteína del complemento C1q y proteínas de la maquinaria celular, tales como actina, PI3K, la familia Src-quinasa, siendo esta última importante para la diseminación de la bacteriana (Xue *et al.*, 2011, 2010). En el año 2006, se reportó por primera vez que clatrina está involucrada en la entrada de algunas bacterias tales como, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*, y que el reclutamiento de clatrina depende de proteínas bacterianas (Veiga *et al.*, 2007). Sin embargo, el rol de clatrina en la entrada de grandes partículas aún se desconoce. Similarmente se ha descrito que caveolina-1 se recluta junto a bacterias tales como *Salmonella* para permitir su ingreso en la célula, lo cual es mediado por la proteína SopE (Lim *et al.*, 2014). Sin embargo, se ha descrito que *Yersinia pseudotuberculosis*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* inyectan moléculas efectoras a la célula epitelial mediante el SSTT para promover un reordenamiento del citoesqueleto de actina y promover así su ingreso, mientras que el ingreso de *Listeria monocytogenes* está mediado por las proteínas de superficie InIA e InIB las cuales interactúan con E-cadherina y promueve así su ingreso (Cossart y Veiga, 2008; Lim *et al.*, 2014). Interesantemente esta es la primera vez que se demuestra que clatrina y caveolina están

involucradas en la entrada de esporas bacterianas las cuales son metabólicamente inertes.

Mediante microscopía confocal observamos que esporas endocitadas están directamente asociadas a vesículas tipo macropinosomas, las que son capaces de ingresar grandes volúmenes de medio extracelular, compartimiento en el que fácilmente puede entrar una o más esporas. Ante lo cual nosotros creemos que la asociación de vesículas de clatrina y de caveolina podrían producir señales celulares que desencadenarían en macropinocitosis.

De las micrografías electrónicas de transmisión y mediante microscopía de epifluorescencia (no mostrado) observamos que sólo algunas células ingresan una gran cantidad de esporas, lo cual a nuestro conocimiento no ha sido reportado hasta el momento, ante lo que creemos que estas células están en un grado distinto de diferenciación respecto a la población, lo que podría generar diferencias en la abundancia de proteínas que podrían actuar como receptores de las esporas, tales como proteínas de matriz extracelular celular como por ejemplo, fibronectina, vitronectina y fibrinógeno o proteínas involucradas en la diferenciación celular como E-cadherina, ocludina y zonulina-1 (Lin y Bissell, 1993; Maeda *et al.*, 2005).

Asimismo, en las micrografías electrónicas de transmisión, observamos esporas de *C. difficile* dentro de estructuras que según lo reportado, corresponden a lisosomas (Poirier *et al.*, 2002), el cual podría ser uno de los destinos subcelulares de la espora luego de ser endocitada. Es por esto que evaluamos si las esporas se asocian a endosomas tempranos, para lo cual utilizamos como marcador EEA-1 (*early endosome antigen-1*), y observamos que el 13,7% de las esporas son rodeadas por este marcador. El lisosoma es el organelo de destino de las vesículas cubiertas de clatrina luego de fusionarse a endosomas tempranos (Poirier *et al.*, 2002) y las esporas por su biología propia son capaces de resistir sin problemas al bajo pH como el que se encuentra en el lisosoma, sin embargo, desconocemos si la gran variedad de enzimas del lisosoma presentes podría generar algún daño en las capas que conforman la espora, afectando así alguna de las propiedades esenciales de la espora que le permiten diseminarse y generar una célula vegetativa, tales como la resistencia a condiciones ambientales o las

propiedades de germinación. Respecto a esto, en la literatura existente se ha observado que el tratamiento de esporas con proteinasa K junto a sarcosil, y el tratamiento con tripsina, son capaces de remover la capa externa de la espora, el exosporium (involucrado en la primera interacción con el hospedero), sin dañar la cubierta (protege a la espora de agentes enzimáticos) y las esporas sin exosporium presentan mayores tasas de germinación que las esporas no tratadas (Escobar-Cortés *et al.*, 2013), además se ha visto que las esporas pueden sobrevivir a ataques de los macrófagos, lo cual finalmente termina con la muerte de los macrófagos (Paredes-Sabja *et al.*, 2012). Estos antecedentes en su conjunto nos hacen creer que las esporas mantienen íntegras sus capacidades de resistencia y capacidad de germinación luego de pasar por el lisosoma.

Se ha observado que algunas bacterias invasivas como *Shigella* son capaces de escapar del lisosoma, lisándolo mediante el SSTT y se ha demostrado que galectina-3 es un marcador de la lisis del fagosoma (Paz *et al.*, 2010). Paradójicamente observamos en células Caco-2 infectadas con esporas, el 5,3% de estas se asocian con galactina-3, ya que las esporas por su estructura inerte no son capaces de expresar proteínas como las del SSTT, sugiriendo que la espora de *C. difficile*, en su capa externa posee proteínas expuestas con funciones aún desconocidas que podrían permitirle escapar del lisosoma.

Dado que en este trabajo logramos demostrar que las esporas de *C. difficile* ingresan en células intestinales *in vivo* es concebible suponer que estas esporas intracelulares persisten en el hospedero durante períodos prolongados, las que podrían ser el reservorio de *C. difficile* para producir ICD-R. En este sentido, se utilizó la sustancia X, la cual corresponde a un fármaco comercial, utilizado comúnmente para otro fin, el cual reduce la entrada de esporas *in vitro*, por lo cual recurrimos a probar en un modelo murino de ICD-R si este tiene efecto reductor en los casos de ICD-R en ratones.

Interesantemente en los días 2 y 3 después de la infección, no observamos pérdida de peso en todos los grupos de ratones, mientras que en estudios realizados en Estados Unidos y en China, utilizando el mismo modelo de infección que utilizamos para este estudio, han reportado disminuciones significativas en el peso de ratones infectados por *C. difficile* los días 2 y 3 (Chen *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2011). Sin embargo, es bien sabido que la flora intestinal comensal varía ante múltiples condiciones, tales como la zona

geográfica, alimentación, ciclo circadiano, condiciones genéticas, etcétera, y además Reeves *et al.*, 2011 observó que al tratar ratones con la mezcla 5 de antibióticos propuesta por Chen *et al.*, 2008, darles una dosis de clindamicina y luego infectarlos con *C. difficile* encontró dos grupos con diferencias en sintomatología, uno que presenta una infección clínica severa, los que tienen un predominio de Proteobacterias, y otros que clínicamente se observan saludables, los cuales tienden a tener una microbiota similar a los ratones no tratados por antibióticos, es decir una alta proporción de Firmicutes y una baja de Bacteroidetes. En consecuencia, nos hace creer que los ratones a los cuales tenemos acceso, provenientes del Bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas de Universidad Andrés Bello, del Instituto de Salud Pública y de la Facultad de Medicina de la Universidad Católica poseen una microbiota diferente a la reportada, la cual tiene un comportamiento distinto ante el tratamiento con antibióticos, lo que podría otorgarles resistencia a la infección inicial. Por consiguiente, sería interesante evaluar la microbiota intestinal de nuestros ratones y compararla a la de trabajos previos. Sin embargo, en nuestro caso al tratar los ratones infectados por *C. difficile* con vancomicina por 7 a 9 días, estos presentaron síntomas de recurrencia 2 a 3 días después de finalizar la administración de vancomicina, lo cual sugiere que la administración de vancomicina por periodos de 7 a 9 días destruye la flora comensal que protege ante la colonización de *C. difficile*, el cual podría ser un método eficiente para generar susceptibilidad a infección por *C. difficile* en nuestras condiciones experimentales. Sorprendentemente en los ratones que fueron tratados con la sustancia X, se redujo considerablemente los casos de diarrea en la ICD-R. Los ratones tratados con la sustancia X tienen una menor cantidad de esporas adheridas en el colon, sin alterar la cantidad de esporas en las deposiciones ni los niveles de toxina en el contenido cecal. Lo que es un indicio de que la sustancia X reduce la cantidad de esporas adheridas y endocitadas, en consecuencia, no quedan suficientes esporas persistentes en el tracto gastrointestinal como para generar un cuadro de ICD-R, mientras que la forma vegetativa de la bacteria es eliminada mediante el tratamiento de vancomicina, lo cual finalizaría completamente con la infección.

Hasta el momento los tratamientos recomendados por el SHEA (*Society for Healthcare epidemiology of America*) contra *C. difficile* son: i) para casos leves suspender el antibiótico causante; ii) si no hay una recuperación administrar metronidazol oral por

10 a 14 días; iii) para casos graves no complicados se recomienda administrar vancomicina oral por 10 a 14 días; iv) para casos graves complicados se suministra vancomicina oral o por sonda nasogástrica combinado con metronidazol intravenoso con reducción progresiva por 2 a 8 semanas (Xu *et al.*, 2011). Sin embargo, el principal problema de estos tratamientos es el estado de disbiosis permanente de la microbiota ya que miembros de esta inhiben el crecimiento de *C. difficile* y dificultan la germinación de esporas. Sin embargo, las soluciones descritas para tratar el ICD inicial no son suficientes para tratar las ICD-R. Posiblemente, la única alternativa de tratamiento antibiótico que podría disminuir la tasa de casos de ICD-R, es la fidaxomicina, aprobada por la FDA el 2011 para el tratamiento de ICD y se ha demostrado que fidaxomicina inhibe la síntesis de ARN (Venugopal y Johnson, 2012), reduce la producción de esporas de *C. difficile* y el crecimiento de éstas (Allen *et al.*, 2013; Babakhani *et al.*, 2012). Sin embargo, los resultados de un ensayo clínico de fase III no fueron tan sorprendentes. Los resultados demuestran que, para las ICD-R (las ocurridas dentro de 4 semanas después de la cura inicial) el 24% de los pacientes tratados con vancomicina y el 13,3% de los pacientes tratados con fidaxomicina presentó ICD-R (Venugopal y Johnson, 2012). Si bien fidaxomicina logra una reducción de los episodios de ICD-R, éstos siguen presentes en un porcentaje significativo de los pacientes. Lo anterior, conjugado con el elevado costo de fidaxomicina (USD \$ 3,000 por tratamiento) hace poco atractivo su uso.

Ante esto, este trabajo abre una nueva arista en la forma de tratar las infecciones recurrentes de *C. difficile*, donde proponemos una formulación en base a vancomicina y sustancia X, ambas drogas aprobadas por la FDA y que poseen un costo relativamente bajo, hace que su uso sea altamente atractivo. Es importante resaltar que para ambos tipos de administración de la sustancia X (intraperitoneal y oral) no se reduce a la totalidad los casos de ICD-R. Ante lo cual, con la tecnología presente, se puede mejorar su forma de administración de la formulación al ser encapsulada en nanopartículas, las cuales tengan características específicas que permita la liberación prolongada y de forma específica en el intestino.

CONCLUSIONES

Los datos presentados en este trabajo muestran varias aristas inexploradas del mecanismo de persistencia de las esporas, en particular, nuestros datos demuestran que:

1. Vesículas de clatrina, caveolina y macropinosomas se asocian a las esporas de *C. difficile* adheridas y endocitadas, y que el uso de fármacos inhibidores de las vías de endocitosis de clatrina, caveolina y macropinocitosis reducen la entrada de esporas.
2. Las esporas de *C. difficile* son capaces de ingresar a células intestinales *in vivo*.
3. El uso de un inhibidor de endocitosis *in vivo*, reduce los cuadros clínicos de la recurrencia de la ICD.

En consecuencia, estos hallazgos permiten establecer las bases para la comprensión de un mecanismo de persistencia de las esporas durante los cuadros de ICD y el estudio de las vías endocítica involucradas, se traduce en una terapia efectiva para la prevención de los cuadros clínicos de la ICD-R

PROYECCIONES

Considerando que la formulación propuesta logra reducir, pero no erradicar los cuadros de ICD-R, nosotros proyectamos realizar una optimización de esta formulación, lo que se podría realizar de la siguiente manera:

- 1) Evaluar la efectividad de una combinación de la sustancia X con otros antibióticos utilizados en el tratamiento de *C. difficile* que no han sido probados en este trabajo, tales como metronidazol, ramoplanina, y tigeciclina.
- 2) Optimizar la administración de esta formulación, al encapsular los compuestos por separado (antibiótico y sustancia X) en nanopartículas de quitosano para así permitir una liberación prolongada de los fármacos. Recientemente Cerchiara *et al.*, (2015) demostró que el encapsulamiento de vancomicina en nanopartículas de quitosano contribuye a proteger a vancomicina de la degradación de enzimas digestivas, y otorga liberación prolongada de vancomicina. En consecuencia, el encapsulamiento en nanopartículas de quitosano permitiría mejorar el efecto localizado de los componentes en el colon y permitirá una liberación prolongada.

REFERENCIAS

- Abrams, G. D., Allo, M., Rifkin, G. D., Fekety, R., y Silva, J. (1980). Mucosal damage mediated by clostridial toxin in experimental clindamycin-associated colitis. *Gut*, 21: 493–499.
- Allen, C. A., Babakhani, F., Sears, P., Nguyen, L., y Sorg, J. A. (2013). Both fidaxomicin and vancomycin inhibit outgrowth of *Clostridium difficile* spores. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 57: 664–667.
- Babakhani, F., Bouillaut, L., Gomez, A., Sears, P., Nguyen, L., y Sonenshein, A. L. (2012). Fidaxomicin inhibits spore production in *Clostridium difficile*. *Clin. Infect. Dis.*, 55: S162–S169.
- Baines, S. D., O'Connor, R., Saxton, K., Freeman, J., y Wilcox, M. H. (2009). Activity of vancomycin against epidemic *Clostridium difficile* strains in a human gut model. *J. Antimicrob. Chemother.*, 63: 520–525.
- Barra-Carrasco, J., Olguín-Araneda, V., Plaza-Garrido, Á., Miranda-Cárdenas, C., Cofré-Araneda, G., Pizarro-Guajardo, M., Sarker, M. R., y Paredes-Sabja, D. (2013). The *Clostridium difficile* exosporium cysteine (CdeC)-rich protein is required for exosporium morphogenesis and coat assembly. *J. Bacteriol.*, 195: 3863–3875.
- Bartlett, J. G., Moon, N., Chang, T. W., Taylor, N., y Onderdonk, A. B. (1978). Role of *Clostridium difficile* in antibiotic-associated pseudomembranous colitis. *Gastroenterology*, 75: 778–782.
- Bartlett, J. G., Onderdonk, a B., Cisneros, R. L., y Kasper, D. L. (1977). Clindamycin-associated colitis due to a toxin-producing species of *Clostridium* in hamsters. *J. Infect. Dis.*, 136: 701–705.
- Bashkirov, P. V., Akimov, S. A., Evseev, A. I., Schmid, S. L., Zimmerberg, J., y Frolov, V. A. (2008). GTPase Cycle of Dynamin Is Coupled to Membrane Squeeze and Release, Leading to Spontaneous Fission. *Cell*, 135: 1276–1286.
- Blake, R. A., Broome, M. A., Liu, X., Wu, J., Gishizky, M., Sun, L., y Courtneidge, S. A. (2000). SU6656, a selective src family kinase inhibitor, used to probe growth factor signaling. *Mol. Cell. Biol.*, 20: 9018–9027.

- Boggon, T. J., y Eck, M. J. (2004). Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene*, 23: 7918–7927.
- Boletín Instituto de Salud Pública (ISP) de Chile. (2014). Vigilancia de Laboratorio de *Clostridium difficile*. 4: 4
- Buffie, C. G., Jarchum, I., Equinda, M., Lipuma, L., Gobourne, A., Viale, A., Ubeda, C., Xavier, J., y Pamer, E. G. (2012). Profound alterations of intestinal microbiota following a single dose of clindamycin results in sustained susceptibility to *Clostridium difficile*-induced colitis. *Infect. Immun.*, 80: 62–73.
- Castagliuolo, I., Wang, C. C., Valenick, L., Pasha, A., Nikulasson, S., Carraway, R. E., y Pothoulakis, C. (1999). Neurotensin is a proinflammatory neuropeptide in colonic inflammation. *J. Clin. Invest.*, 103: 843–849.
- CDC Antibiotic Resistance Threats in the United State (2013). U.S. Department of Health and Human Services Center for Disease Control and Prevention.
- Cerchiara, T., Abruzzo, A., Di Cagno, M., Bigucci, F., Bauer-Brandl, A., Parolin, C., Vitali, B., Gallucci, M. C., y Luppi, B. (2015). Chitosan based micro- and nanoparticles for colon-targeted delivery of vancomycin prepared by alternative processing methods. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 92: 112–119.
- Conner, S. D., y Schmid, S. L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, 422: 37–44.
- Cossart, P., y Veiga, E. (2008). Non-classical use of clathrin during bacterial infections. *J. Microsc.*, 231: 524–528.
- Czuprynski, C. J., Johnson, W. J., Balish, E., y Wilkins, T. (1983). Pseudomembranous colitis in *Clostridium difficile*-monoassociated rats. *Infect. Immun.*, 39: 1368–1376.
- Chen, X., Katchar, K., Goldsmith, J. D., Nanthakumar, N., Cheknis, A., Gerding, D. N., y Kelly, C. P. (2008). A mouse model of *Clostridium difficile*-associated disease. *Gastroenterology*, 135: 1984–1992.
- Cheng, Y., Boll, W., Kirchhausen, T., Harrison, S. C., y Walz, T. (2007). Cryo-electron tomography of clathrin-coated vesicles: structural implications for coat assembly. *J. Mol. Biol.*, 365: 892–899.

- Deakin, L. J., Clare, S., Fagan, R. P., Dawson, L. F., Pickard, D. J., West, M. R., Wren, B. W., Fairweather, N. F., Dougan, G., y Lawley, T. D. (2012). The *Clostridium difficile* spo0A gene is a persistence and transmission factor. *Infect. Immun.*, 80: 2704–2711.
- Denève, C., Janoir, C., Poilane, I., Fantinato, C., y Collignon, A. (2009). New trends in *Clostridium difficile* virulence and pathogenesis. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 33: S24–S28.
- Di Fiore, P. P., y De Camilli, P. (2001). Endocytosis and signaling: An inseparable partnership. *Cell*, 106: 1–4.
- Di Russo Case, E., y Samuel, J. E. (2016). Contrasting Lifestyles Within the Host Cell. *Microbiol. Spectr.*, 4: 667–692.
- El-Sayed, A., y Harashima, H. (2013). Endocytosis of gene delivery vectors: from clathrin-dependent to lipid raft-mediated endocytosis. *Mol. Ther.*, 21: 1118–1130.
- Escobar-Cortés, K., Barra-Carrasco, J., y Paredes-Sabja, D. (2013). Proteases and sonication specifically remove the exosporium layer of spores of *Clostridium difficile* strain 630. *J. Microbiol. Methods*, 93: 25–31.
- Fekety, R., Silva, J., Toshniwal, R., Allo, M., Armstrong, J., Browne, R., Ebright, J., y Rifkin, G. (1979). Antibiotic-Associated Colitis: Effects of Antibiotics on *Clostridium difficile* and the Disease in Hamsters. *Clin. Infect. Dis.*, 1: 386–397.
- Finney, J. M. T. (1893). Gastroenterostomy for cicatizing ulzer of the pylorus. *Bull. Johns Hopkins Hosp*, 11: 53–55.
- Fotin, A., Kirchhausen, T., Grigorieff, N., Harrison, S. C., Walz, T., y Cheng, Y. (2006). Structure determination of clathrin coats to subnanometer resolution by single particle cryo-electron microscopy. *J. Struct. Biol.*, 156: 453–460.
- George, M., y Abraham, T. E. (2006). Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan-a review. *J. Control. Release*, 114: 1–14.
- George WL, Sutter VL, Goldtein EJ, Ludwig SL, F. S. (1978). Aetiology of antimicrobial-agent-associated colitis. *Lancet*, 802–803.
- Gerhard, R., John, H., Aktories, K., y Just, I. (2003). Thiol-modifying phenylarsine oxide inhibits guanine nucleotide binding of Rho but not of Rac GTPases. *Mol. Pharmacol.*,

63: 1349–1355.

Goulding, D., Thompson, H., Emerson, J., Fairweather, N. F., Dougan, G., y Douce, G. R. (2009). Distinctive profiles of infection and pathology in hamsters infected with *Clostridium difficile* strains 630 and B1. *Infect. Immun.*, 77: 5478–5485.

Guerrero, D. M., Nerandzic, M. M., Jury, L. A., Jinno, S., Chang, S., y Donskey, C. J. (2012). Acquisition of spores on gloved hands after contact with the skin of patients with *Clostridium difficile* infection and with environmental surfaces in their rooms. *Am. J. Infect. Control*, 40: 556–558.

Hall, y O'Toole. (1935). Intestinal Flora in New-Born infants with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis*. *Am J Dis Child*, 49: 390–402.

Haque, S., Md, S., Fazil, M., K. Sahni, J., Baboota, S., Dang, S., y Ali, J. (2011). Role of Chitosan Biomaterials in Drug Delivery Systems: A Patent Perspective. *Recent Patents Mater. Sci.*, 4: 209–223.

Hernández-Rocha, C., Naour, S., y Paredes-Sabja, M. Á.-L. D. (2012). Infecciones causadas por *Clostridium difficile*: una visión actualizada. *Rev Chil. Infectol*, 29: 434–445.

Hookman, P., y Barkin, J. S. (2009). *Clostridium difficile* associated infection, diarrhea and colitis. *World J. Gastroenterol.*, 15: 1554–1580.

Kaksonen, M., Toret, C. P., y Drubin, D. G. (2006). Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 7: 404–414.

Karas, J. A., Enoch, D. A., y Aliyu, S. H. (2010). A review of mortality due to *Clostridium difficile* infection. *J. Infect.* 61: 1-8

Keates, A. C., Castagliuolo, I., Qiu, B., Nikulasson, S., Sengupta, A., y Pothoulakis, C. (1998). CGRP upregulation in dorsal root ganglia and ileal mucosa during *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis. *Am. J. Physiol.*, 274: G196–G202.

Kelly, C. P., y LaMont, J. T. (2008). *Clostridium difficile* — More difficult than ever. *N. Engl. J. Med.*, 359: 1932–1940.

Kerr, M. C., y Teasdale, R. D. (2009). Defining macropinocytosis. *Traffic*, 10: 364–371.

- Khanna, S., Pardi, D. S., Aronson, S. L., Kammer, P. P., Orenstein, R., St Sauver, J. L., Harmsen, W. S., y Zinsmeister, A. R. (2012). The epidemiology of community-acquired *Clostridium difficile* infection: a population-based study. *Am. J. Gastroenterol.*, 107: 89–95.
- Kirchhausen, T., Macia, E., y Pelish, H. E. (2009). Use of dynasore, the small molecule inhibitor of dynamin, in the regulation of endocytosis. *Methods Enzymol.*, 6879: 1–15.
- Knoop, F. C. (1979). Clindamycin-associated enterocolitis in guinea pigs: Evidence for a bacterial toxin. *Infect. Immun.*, 23: 31–33.
- Lawley, T. D., Clare, S., Walker, A. W., Goulding, D., Stabler, R. A., Croucher, N., Mastroeni, P., Scott, P., Raisen, C., Mottram, L., Fairweather, N. F., Wren, B. W., Parkhill, J., y Dougan, G. (2009). Antibiotic treatment of *Clostridium difficile* carrier mice triggers a supershedder state, spore-mediated transmission, and severe disease in immunocompromised hosts. *Infect. Immun.*, 77: 3661–3669.
- Lim, J. S., Na, H. S., Lee, H. C., Choy, H. E., Park, S. C., Han, J. M., y Cho, K. a. (2009). Caveolae-mediated entry of *Salmonella typhimurium* in a human M-cell model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 390: 1322–7.
- Lim, J. S., Shin, M., Kim, H. J., Kim, K. S., Choy, H. E., y Cho, K. A. (2014). Caveolin-1 mediates *Salmonella* invasion via the regulation of SopE-dependent Rac1 activation and actin reorganization. *J. Infect. Dis.*, 210: 793–802.
- Lin, A. E.-J., y Guttman, J. A. (2010). Hijacking the endocytic machinery by microbial pathogens. *Protoplasma*, 244: 75–90.
- Lin, C. Q., y Bissell, M. J. (1993). Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. *FASEB J.*, 7: 737–743.
- Liu, Y., Peterson, D. A., Kimura, H., y Schubert, D. (1997). Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J. Neurochem.*, 69: 581–593.
- LV, M., CM, S., RN, G., y AI, E. (1994). A randomized placebo-controlled trial of *Saccharomyces boulardii* in combination with standard antibiotics for *Clostridium difficile* disease. *JAMA*, 271: 1913–1918.

- Maeda, M., Johnson, K. R., y Wheelock, M. J. (2005). Cadherin switching: essential for behavioral but not morphological changes during an epithelium-to-mesenchyme transition. *J. Cell Sci.*, 118: 873–887.
- McMahon, H. T., y Boucrot, E. (2011). Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 12: 517–533.
- Minshall, R. D., Tiruppathi, C., Vogel, S. M., Niles, W. D., Gilchrist, A., Hamm, H. E., y Malik, A. B. (2000). Endothelial cell-surface Gp60 activates vesicle formation and trafficking via G_i-coupled Src kinase signaling pathway. *J. Cell Biol.*, 150: 1057–1069.
- Muehlhoefer, a, Saubermann, L. J., Gu, X., Luedtke-Heckenkamp, K., Xavier, R., Blumberg, R. S., Podolsky, D. K., MacDermott, R. P., y Reinecker, H. C. (2000). Fractalkine is an epithelial and endothelial cell-derived chemoattractant for intraepithelial lymphocytes in the small intestinal mucosa. *J. Immunol.*, 164: 3368–76.
- O'Connor, J. R., Johnson, S., y Gerding, D. N. (2009). *Clostridium difficile* Infection caused by the epidemic BI/NAP1/027 strain. *Gastroenterology*, 136: 1913–1924.
- Oh, P., McIntosh, D. P., y Schnitzer, J. E. (1998). Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J. Cell Biol.*, 141: 101–114.
- Papatheodorou, P., Zamboglou, C., Genisyuerk, S., Guttenberg, G., y Aktories, K. (2010). Clostridial glucosylating toxins enter cells via clathrin-mediated endocytosis. *PLoS One*, 5: e10673.
- Paredes-Sabja, D., Cofre-Araneda, G., Brito-Silva, C., Pizarro-Guajardo, M., y Sarker, M. R. (2012). *Clostridium difficile* spore-macrophage interactions: spore survival. *PLoS One*, 7: e43635.
- Paredes-Sabja, D., y Sarker, M. R. (2012). Adherence of *Clostridium difficile* spores to Caco-2 cells in culture. *J. Med. Microbiol.*, 61: 1208–1218.
- Parton, R. G., y Simons, K. (2007). The multiple faces of caveolae. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8: 185–194.
- Pawlowski, S. W., Calabrese, G., Kolling, G. L., Freire, R., AlcantaraWarren, C., Liu, B.,

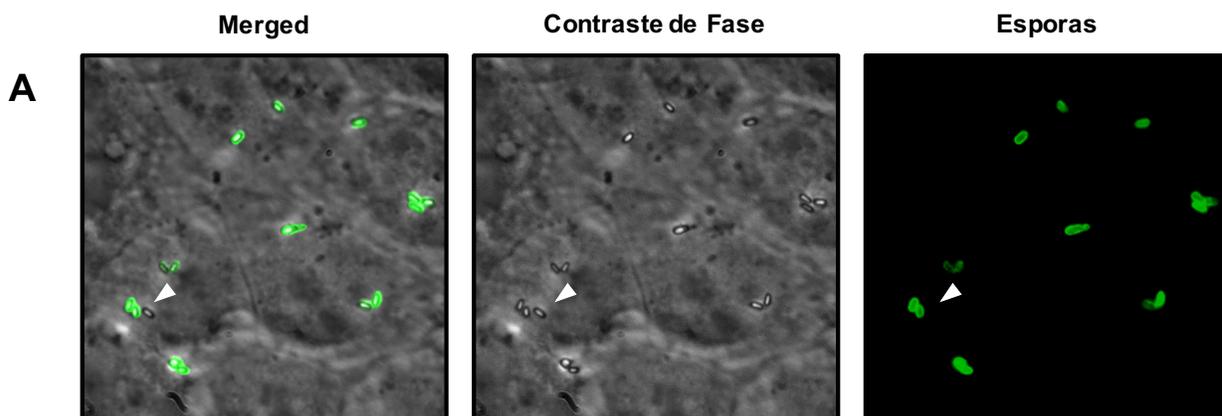
- Sartor, R. B., y Guerrant, R. L. (2010). Murine model of *Clostridium difficile* infection with aged gnotobiotic C57BL/6 mice and a BI/NAP1 strain. *J. Infect. Dis.*, 202: 1708–1712.
- Paz, I., Sachse, M., Dupont, N., Mounier, J., Cederfur, C., Enninga, J., Leffler, H., Poirier, F., Prevost, M. C., Lafont, F., y Sansonetti, P. (2010). Galectin-3, a marker for vacuole lysis by invasive pathogens. *Cell. Microbiol.*, 12: 530–544.
- Pépin, J., Valiquette, L., Alary, M.-E., Villemure, P., Pelletier, A., Forget, K., Pépin, K., y Chouinard, D. (2004). *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. *CMAJ*, 171: 466–472.
- Pépin, J., Valiquette, L., y Cossette, B. (2005). Mortality attributable to nosocomial *Clostridium difficile*-associated disease during an epidemic caused by a hypervirulent strain in Quebec. *CMAJ*, 173: 1037–1041.
- Pizarro-Cerdá, J., Bonazzi, M., y Cossart, P. (2010). Clathrin-mediated endocytosis: what works for small, also works for big. *Bioessays*, 32: 496–504.
- Poirier, M. G., Eroglu, S., y Marko, J. F. (2002). Bilayered clathrin coats on endosomal vacuoles are involved in protein sorting toward lysosomes. *Mol. Biol. Cell*, 13: 2170–2179.
- Pothoulakis, C., Castagliuolo, I., Leeman, S. E., Wang, C. C., Li, H., Hoffman, B. J., y Mezey, E. (1998). Substance P receptor expression in intestinal epithelium in *Clostridium difficile* toxin A enteritis in rats. *Am J Physiol*, 275: G68-75.
- Price, a B., Larson, H. E., y Crow, J. (1979). Morphology of experimental antibiotic-associated enterocolitis in the hamster: a model for human pseudomembranous colitis and antibiotic-associated diarrhoea. *Gut*, 20: 467–475.
- Pucadyil, T. J., y Schmid, S. L. (2008). Real-Time visualization of dynamin-catalyzed membrane fission and vesicle release. *Cell*, 135: 1263–1275.
- Reeves, A. E., Koenigsnecht, M. J., Bergin, I. L., y Young, V. B. (2012). Suppression of *Clostridium difficile* in the gastrointestinal tracts of germfree mice inoculated with a murine isolate from the family Lachnospiraceae. *Infect. Immun.*, 80: 3786–3794.
- Reeves, A. E., Theriot, C. M., Bergin, I. L., Huffnagle, G. B., Schloss, P. D., y Young, V.

- B. (2011). The interplay between microbiome dynamics and pathogen dynamics in a murine model of *Clostridium difficile* infection. *Gut Microbes*, 2: 145–158.
- Ridlon, J. M., Kang, D.-J., y Hylemon, P. B. (2006). Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J. Lipid Res.*, 47: 241–259.
- Roberts, K., Smith, C. F., Snelling, A. M., Kerr, K. G., Banfield, K. R., Sleight, P. A., y Beggs, C. B. (2008). Aerial dissemination of *Clostridium difficile* spores. *BMC Infect. Dis.*, 8: 7.
- Sanchez, T. H., Brooks, J. T., Sullivan, P. S., Juhasz, M., Mintz, E., Dworkin, M. S., y Jones, J. L. (2005). Bacterial diarrhea in persons with HIV infection, United States, 1992-2002. *Clin. Infect. Dis.*, 41: 1621–1627.
- Sarker, M. R., y Paredes-Sabja, D. (2012). Molecular basis of early stages of *Clostridium difficile* infection: germination and colonization, 933–943.
- Sato, K., Nagai, J., Mitsui, N., Ryoko Yumoto, y Takano, M. (2009). Effects of endocytosis inhibitors on internalization of human IgG by Caco-2 human intestinal epithelial cells. *Life Sci.*, 85: 800–807.
- Seveau, S., Bierne, H., Giroux, S., Préost, M. C., y Cossart, P. (2004). Role of lipid rafts in E-cadherin- and HGF-R/Met-mediated entry of *Listeria monocytogenes* into host cells. *J. Cell Biol.*, 166: 743–753.
- Sogias, I. A., Williams, A. C., y Khutoryanskiy, V. V. (2008). Why is chitosan mucoadhesive? *Biomacromolecules*, 9: 1837–42.
- Sorg, J. A., y Sonenshein, A. L. (2008). Bile salts and glycine as cogermnants for *Clostridium difficile* spores. *J. Bacteriol.*, 190: 2505–2512.
- Sorg, J. A., y Sonenshein, A. L. (2009). Chenodeoxycholate is an inhibitor of *Clostridium difficile* spore germination. *J. Bacteriol.*, 191: 1115–1117.
- Sorg, J. A., y Sonenshein, A. L. (2010). Inhibiting the initiation of *Clostridium difficile* spore germination using analogs of chenodeoxycholic acid, a bile acid. *J. Bacteriol.*, 192: 4983–4990.
- Stan, R. V. (2002). Structure and function of endothelial caveolae. *Microsc. Res. Tech.*, 57: 350–364.

- Strober, W. (2001). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr. Protoc. Immunol.*, Appendix 3: Appendix 3B.
- Sun, X., Wang, H., Zhang, Y., Chen, K., Davis, B., y Feng, H. (2011). Mouse relapse model of *Clostridium difficile* infection. *Infect. Immun.*, 79: 2856–2864.
- Taur, Y., y Pamer, E. G. (2014). Fixing the microbiota to treat *Clostridium difficile* infections. *Nat. Publ. Gr.*, 20: 246–247.
- Veiga, E., y Cossart, P. (2005). *Listeria* hijacks the clathrin-dependent endocytic machinery to invade mammalian cells. *Nat. Cell Biol.*, 7: 894–900.
- Veiga, E., Guttman, J. A., Bonazzi, M., Boucrot, E., Toledo-Arana, A., Lin, A. E., Enninga, J., Pizarro-Cerdá, J., Finlay, B. B., Kirchhausen, T., Cossart, P., Host, C., Veiga, E., Guttman, J. A., Bonazzi, M., Boucrot, E., Toledo-Arana, A., Lin, E., Enninga, J., Finlay, B. B., Kirchhausen, T., y Cossart, P. (2007). Invasive and adherent bacterial pathogens co-Opt host clathrin for infection. *Cell Host Microbe*, 2: 340–51.
- Venugopal, A. A., y Johnson, S. (2012). Fidaxomicin: A novel macrocyclic antibiotic approved for treatment of *Clostridium difficile* infection. *Clin. Infect. Dis.*, 54: 568–574.
- Voth, D. E., y Ballard, J. D. (2005). *Clostridium difficile* toxins: Mechanism of action and role in disease. *Clin. Microbiol. Rev.*
- Wang, J. T. H., Teasdale, R. D., y Liebl, D. (2014). Macropinosome quantitation assay. *MethodsX*, 1: 36–41.
- Warny, M., Pepin, J., Fang, A., Killgore, G., Thompson, A., Brazier, J., Frost, E., y McDonald, L. C. (2005). Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. *Lancet*, 366: 1079–1084.
- Warren, C. A., Opstal, E. J. Van, Riggins, M. S., Li, Y., Moore, J. H., Kolling, G. L., Guerrant, R. L., y Hoffman, P. S. (2013). Vancomycin Treatment ' s Association with Delayed Intestinal Tissue Injury , Clostridial Overgrowth , and Recurrence of *Clostridium difficile* Infection in Mice, 57: 689–696.
- Wilson, K. H. (1983). Efficiency of various bile salt preparations for stimulation of *Clostridium difficile* spore germination. *J. Clin. Microbiol.*, 18: 1017–1019.

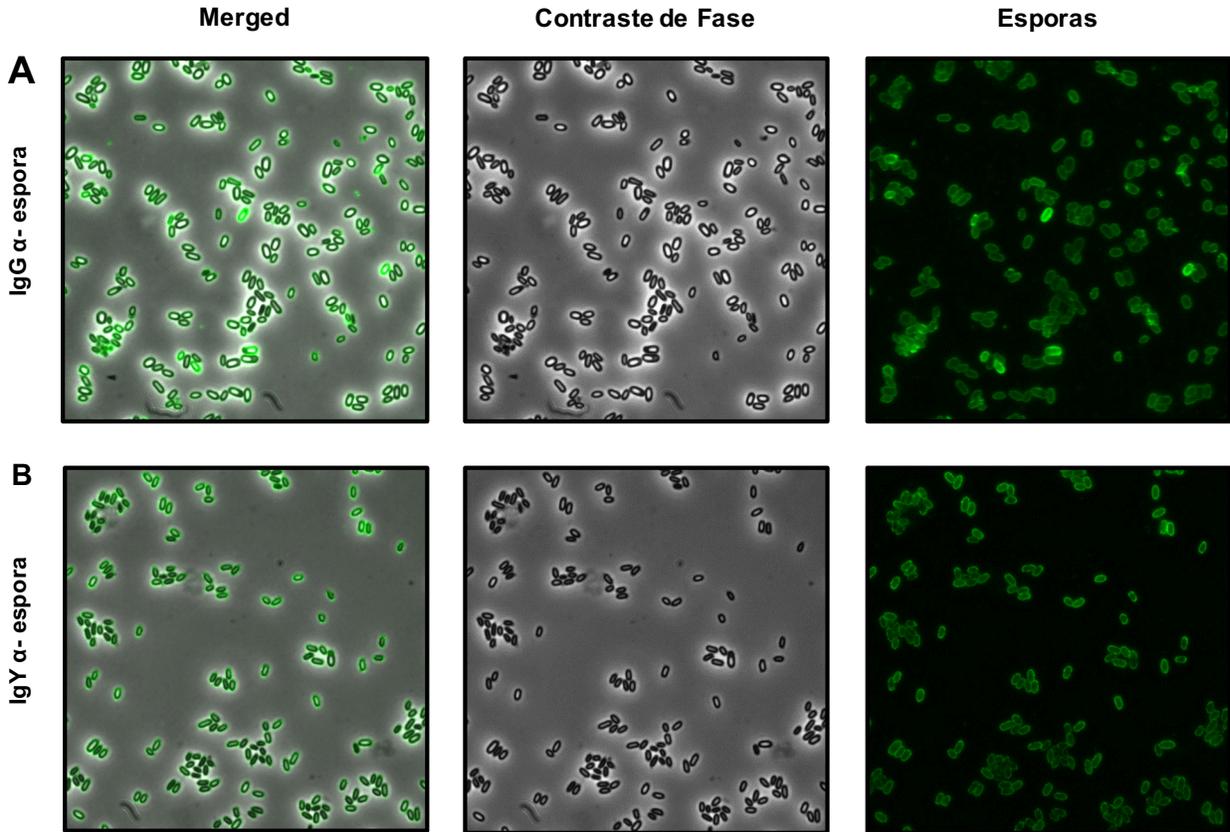
- Wilson, K. H., Kennedy, M. J., y Fekety, F. R. (1982). Use of sodium taurocholate to enhance spore recovery on a medium selective for *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.*, 15: 443–446.
- Xu, S., Huang, H., Li, G., Cohen, S. H., Gerding, D. N., Johnson, S., Kelly, C. P., Loo, V. G., McDonald, L. C., Pepin, J., y Wilcox, M. H. (2011). Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of america (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA). *Chinese J. Infect. Chemother.*, 11: 426–427.
- Xue, Q., Gu, C., Rivera, J., Höök, M., Chen, X., Pozzi, A., y Xu, Y. (2011). Entry of *Bacillus anthracis* spores into epithelial cells is mediated by the spore surface protein BclA, integrin $\alpha 2\beta 1$ and complement component C1q. *Cell. Microbiol.*, 13: 620–634.
- Xue, Q., Jenkins, S. a, Gu, C., Smeds, E., Liu, Q., Vasan, R., Russell, B. H., y Xu, Y. (2010). *Bacillus anthracis* spore entry into epithelial cells is an actin-dependent process requiring c-Src and PI3K. *PLoS One*, 5: e11665.
- Zilberberg, M. D., Shorr, A. F., y Kollef, M. H. (2008). Increase in adult *Clostridium difficile*-related hospitalizations and case-fatality rate, United States, 2000-2005. *Emerg. Infect. Dis.*, 14: 929–931.

ANEXO



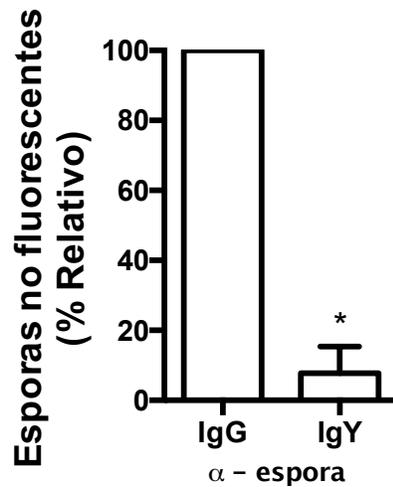
Anexo 1. Esporas de *C. difficile* endocitadas no son etiquetadas por anticuerpos IgG.

Células Caco-2 fueron infectadas durante 3h con esporas de la cepa R20291 las cuales habían sido anteriormente incubadas con SHN durante 1h. Las células fueron fijadas y bloqueadas, y sin permeabilizar, las esporas fueron etiquetadas como se describe en Materiales y Métodos. Las muestras fueron observadas en microscopio de epifluorescencia. La punta de flecha indica una espora brillante en contraste de fases que no fue reconocida por anticuerpo (no verdes), la que se considera endocitada.



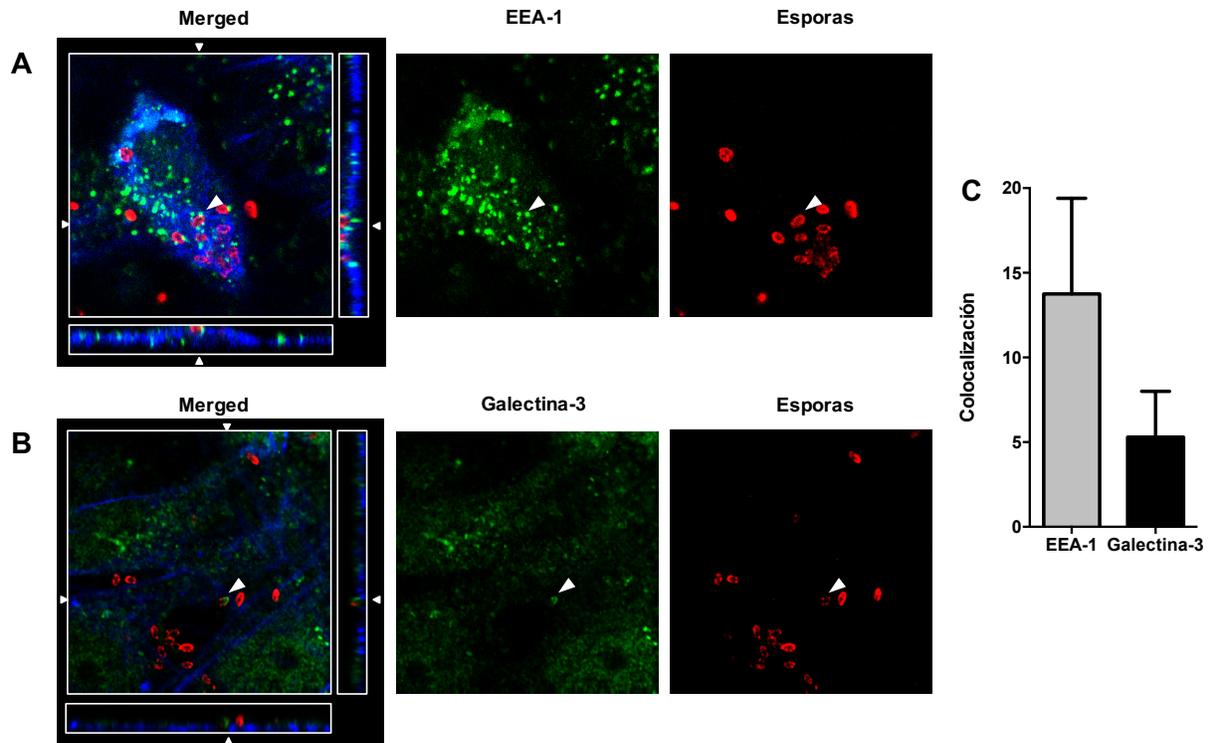
Anexo 2. Todas las esporas de *C. difficile* R20291 son reconocidas por IgG de cabra anti-espora e IgY de gallina anti-espora.

Esporas de la cepa R20291 fueron fijadas sobre cubreobjetos de vidrios los que previamente habían sido tratados con poli-lisina, bloqueadas y etiquetadas por 1 h con suero de cabra anti-espora (1:50) **A**) e IgY anti-espora (1:4000) **B**) e incubadas con anticuerpos secundarios anti cabra e anti-IgY conjugados a Alexa Fluor 488 y visualizadas en microscopia de epifluorescencia.



Anexo 3. Posiblemente anticuerpo IgY anti-espora, es capaz marcar esporas de *C. difficile* R20291 internalizadas.

Células Caco-2 fueron infectadas por 3 h con esporas de la cepa R20291 como se describe en la leyenda del Anexo 1. Esporas fueron etiquetadas con suero de cabra anti-espora 1:50, e IgY anti espora 1:4000 por 1 h y detectados por anticuerpos secundarios anti-IgG de cabra e anti-IgY conjugado a Alexa Fluor 488 (verde). Las muestras fueron analizadas en microscopía de epifluorescencia, y se observó la cantidad de esporas no marcadas verdes (intracelulares). Los valores fueron comparados con t-test. Los asteriscos indican $P < 0.05$.



Anexo 4. Esporas de *C. difficile* R20291 se asocian a marcador de endosoma temprano y a Galectina-3.

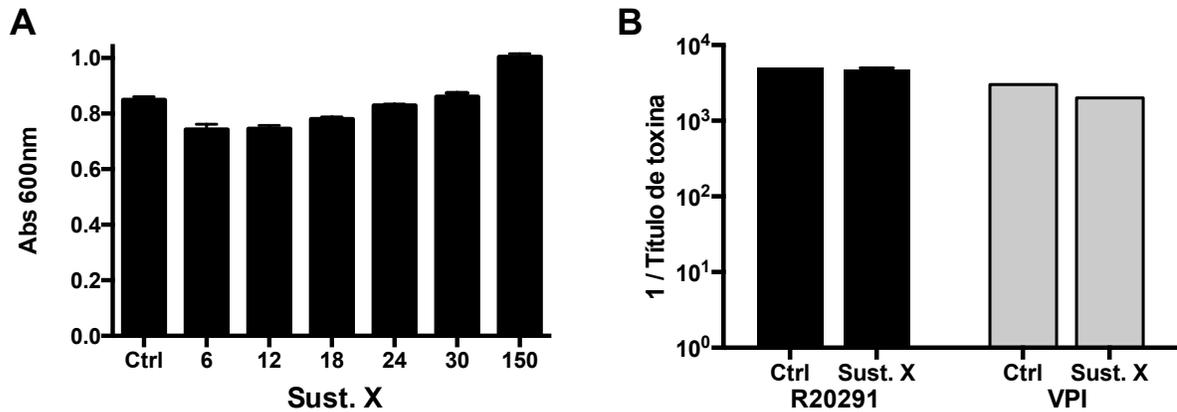
Células Vero fueron infectadas con esporas de la cepa R20291 las cuales fueron detectadas mediante inmuno-indirecta con anticuerpos IgY anti-espora, y anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 647 (mostrado en rojo). EEA-1 **A**) y galectina-3 **B**) endógena fueron detectadas con anticuerpos policlonales anti-EEA-1 y galectina levantados en conejo y detectados con un anticuerpo anti-conejo conjugado a Alexa Fluor 568 (mostrado en verde). Filamentos de actina mostrados en *merged* fueron detectados con faloidina conjugada a Alexa Fluor 488 (mostrado en azul). En las zonas indicadas por cabeza de flechas se muestra que las vesículas se asocian alrededor de la espora en las 3 dimensiones espaciales. Las imágenes mostradas son representativas de al menos 300 esporas analizadas. Barras 10 μ m. **C**) Muestra el porcentaje de los casos positivos de colocalización entre esporas de *C. difficile* y EEA-1 o Galectina-3.

Anexo 5. Criterios para determinación de puntaje histológico de tejido epitelial.

Puntaje	Descripción	Valor
Edema	Sin edema	0
	Edema leve con mínimo (<2X) expansión submucoso multifocal.	1
	Edema moderado, con moderada (2X a 3X) expansión submucoso multifocal.	2
	Edema severo con severa (>3X) expansión submucoso multifocal.	3
	Edema severo con severa (>3X) expansión submucoso difuso.	4

Puntaje	Descripción	Valor
Infiltración celular	Sin inflamación	0
	Inflamación neutrofílica multifocal mínima.	1
	Inflamación neutrofílica multifocal moderada (gran participación de la submucosa).	2
	Inflamación neutrofílica multifocal severa a coalescente (gran partición de la submucosa, con o sin implicación transmural).	3
	Inflamación neutrofílica multifocal severa a coalescente (gran partición de la submucosa con abscesos o extensa implicación transmural).	4

Puntaje	Descripción	Valor
Daño epitelial	Sin cambios epiteliales	0
	Mínimo daño epitelial superficial multifocal (vacuolación, figuras apoptóticas o puntas de vellosidades atenuadas/necrosadas)	1
	Daño epitelial superficial multifocal moderado (vacuolación, figuras apoptóticas o puntas de vellosidades atenuadas/necrosadas)	2
	Daño epitelial multifocal severo con o sin pseudomembranas (neutrófilos intraluminales o epitelio desprendido en una matriz fibrinoso)	3
	Daño epitelial multifocal severo con pseudomembranas significativas o ulceración epitelial (perdida focal completa del epitelio)	4



Anexo 6. La sustancia X no reduce el crecimiento de las células vegetativas de *C. difficile* ni reduce los efectos citotóxicos de sus toxinas.

A) *C. difficile* fue cultivado en medio BHIS en condiciones anaeróbicas con distintas cantidades de sustancia X, y luego de 24 h se midió la densidad óptica a 600nm. **B)** Células Vero fueron tratadas por 1h con la sustancia X y luego desafiadas con sobrenadante de un cultivo de 16 h de *C. difficile* R20291 o VPI. A las 20h fueron observadas bajo microscopio invertido. El punto final del título fue determinado como se describe en Materiales y Métodos.

Anexo 7. Vinculación entre la puntuación de diarrea y la carga de esporas de *C. difficile* en el colon de ratones infectados.

Ratones infectados por *C. difficile* según se indica en leyenda de la Figura 13, fueron tratados con la sustancia X y vancomicina o solo vancomicina. Al finalizar el ensayo, una sección del colon ascendente fue extraída, la cual fue mascerada y sembrada en placas TCCFA para recuento de UFC. Valores de puntuación de diarrea y carga de esporas en el día de la recurrencia (día 12) son vinculados a cada ratón.

Ratón	Score diarrea	Carga de UFC/g
Vancomicina (1)	2	31.000
Vancomicina (2)	3	135.000
Vancomicina (3)	1	14.500
Vancomicina (4)	0	30.500
Vancomicina (5)	1	34.500
Van+sust X (1)	0	26.000
Van+sust X (2)	0	500
Van+sust X (3)	0	1.000
Van+sust X (4)	0	15.000
Van+sust X (5)	0	500

Carga esporas UFC/g

