

UNIVERSIDAD NACIONAL
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO
POSGRADO REGIONAL EN CIENCIAS VETERINARIAS TROPICALES



**Evaluación del papel de los neutrófilos (PMNs) en la patología
producida por *Clostridioides (Clostridioides) difficile* utilizando un bio-modelo murino**

BRAYAN DIDDEY MONTOYA TORRES B.Sc.

Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica, Noviembre 2022

**Tesis sometida a consideración del Tribunal Examinador del Posgrado Regional en
Ciencias Veterinarias Tropicales para optar por el grado académico de *Magister
Scientiae* en Enfermedades Tropicales**

**Evaluación del papel de los neutrófilos (PMNs) en la patología
producida por *Clostridioides (Clostridium) difficile* utilizando un bio-modelo murino**

BRAYAN DIDDEY MONTOYA TORRES B.Sc.

**Tesis presentada para optar al grado de *Magister Scientiae* en Enfermedades
Tropicales del Posgrado Regional en Ciencias Veterinarias Tropicales cumple con los
requisitos establecidos por el Sistema de Estudios de Posgrado de la Universidad
Nacional, Heredia, Costa Rica.**

MIEMBROS DEL TRIBUNAL EXAMINADOR

Ph.D. José Vega Baudrit
Representante del Consejo Central del Posgrado

M.Sc. Sandra Estrada-Konig
Coordinadora del Programa de Posgrado o su representante

Elías Barquero-Calvo
Tutor de Tesis

Ph.D. Carlos Quesada-Gómez
Miembro del Comité Asesor

Ph.D. Esteban Chaves-Olarte
Miembro del Comité Asesor

B.Sc. Brayan Diddey Montoya Torres
Sustentante

RESUMEN

Clostridioides difficile es una bacteria enteropatógena responsable de brotes graves de infecciones intrahospitalarias y casos de diarreas esporádicas a nivel mundial. Causa un cuadro conocido como diarrea asociada a *C. difficile* (DACD), la cual puede evolucionar a colitis pseudomembranosa, megacolon tóxico e inclusive hasta la muerte. La patogénesis de la infección por *C. difficile* primordialmente depende de sus principales factores de virulencia, la toxina A (TcdA) y la toxina B (TcdB) capaces de ocasionar una potente alteración del tejido intestinal, disrupción epitelial, retención de líquidos, inducción de una intensa respuesta inflamatoria y exacerbada infiltración de PMNs. Esta última característica clínica es determinante en la severidad de la enfermedad, sobre todo, cuando hay estímulos inflamatorios continuos provocando una inflamación de tipo crónico desencadenando una desregulación neutrofilica.

A pesar de que se sabe que los neutrófilos (PMNs) juegan un papel importante en la patología de esta infección, no existen estudios *in vivo* que utilicen estrategias de agotamiento de PMNs expuestos a las toxinas de *C. difficile* en el lumen intestinal evaluando directamente el papel de estas células inmunes en la patología desencadenada por las toxinas de *C. difficile*. Por esa razón, esta investigación evaluó el efecto en la respuesta inflamatoria, actividad mieloperoxidasa (MPO) y efectos histopatológicos inducidos por las toxinas de *C. difficile* en presencia o ausencia de PMNs. Para esto se utilizó un biomodelo reduccionista de asa intestinal ligada combinado con un modelo de ratones neutropénicos y no neutropénicos a los cuales se les inocularon las toxinas purificadas combinadas TcdA_{VPI10463/003}+TcdB_{NAP1/027}, y por separado TcdA_{VPI10463/003}, TcdB_{NAP1/027} y TcdB_{NAP1/019} de *C. difficile*. Adicionalmente, se evaluó la capacidad de los PMNs humanos y murinos de fagocitar y asociarse a los clostridios diseñando un modelo *in vitro*.

La capacidad fagocítica de los PMNs de ratón fue más eficiente que la de los PMNs humanos. En los ratones, la disminución de la cantidad de plaquetas en sangre favoreció aún más el proceso de asociación (fagocitosis) de los PMNs frente a los clostridios. En el modelo *in vivo*, se observó que la depleción parcial de los PMNs, tanto periférica como tisularmente, generó una disminución en el nivel de patogénesis producida por las toxinas de *C. difficile*, ocasionando una reducción significativa de la respuesta proinflamatoria, inflamatoria, indicadores de daño histopatológico y actividad MPO. La reducción de estos efectos fue observada mayormente con la enterotoxina TcdA. En contraste, también se logró identificar que la exotoxina TcdB_{VNAP1} posee una actividad histopatológica casi similar a la TcdB_{NAP1}.

Estos resultados sugieren que, durante el proceso de inflamación los PMNs promueven parte del proceso patológico, debido a la desregulación que se observa durante la patogénesis producida por las toxinas TcdA y TcdB en la infección causada por *C. difficile*. Este estudio permitió mejorar el conocimiento sobre el papel de los PMNs frente a las toxinas TcdA y

TcdB en un ambiente fisio-patológico real con la interacción de las múltiples señales tisulares generadas por estas toxinas.

ABSTRACT

Clostridioides difficile is an enteropathogenic bacterium responsible for severe outbreaks of in-hospital infections and cases of sporadic diarrhea worldwide. It causes a clinical manifestation known as diarrhea associated with *C. difficile* (DACD), which can lead to pseudomembranous colitis, toxic megacolon, and even death. The pathogenesis of *C. difficile* infection primarily depends on its main virulence factors, toxin A (TcdA) and toxin B (TcdB) capable of causing a potent alteration of the intestinal tissue, epithelial disruption, fluid retention, induction of an intense inflammatory response, and exacerbated infiltration of PMNs. This last clinical feature is decisive for the severity of the illness, especially when continuous inflammatory stimuli are causing chronic inflammation, triggering neutrophilic dysregulation.

Although it is known that neutrophils (PMNs) play an important role in the pathology of this infection, there are no *in vivo* studies that use depletion strategies for PMNs exposed to *C. difficile* toxins in the intestinal lumen, directly evaluating the role of these immune cells in the pathology triggered by *C. difficile* toxins. For that reason, this investigation evaluated the effect on the inflammatory response, myeloperoxidase (MPO) activity, and histopathological effects induced by *C. difficile* toxins in the presence or absence of PMNs. For this purpose, a reductionist intestinal ligated loop bio-model was used, combined with a neutropenic and non-neutropenic mice model to which they were inoculated with the combined purified toxins TcdA_{VPI10463/003}+TcdB_{NAP1/027}, and separately TcdA_{VPI10463/003}, TcdB_{NAP1/027} and TcdB_{NAP1/019} from *C. difficile*. Additionally, the ability of human and murine PMNs to phagocytize and associate with clostridia was evaluated by designing an *in vitro* model.

The phagocytic capacity of mice PMNs was more efficient than human PMNs. In mice, the decrease in the number of platelets in the blood improved the process of association (phagocytosis) of PMNs against clostridia. In the *in vivo* model, it was observed that the partial depletion of PMNs, both peripherally and titularly, generated a decrease in the level of pathogenesis produced by *C. difficile* toxins, causing a significant reduction in the pro-inflammatory, inflammatory, indicators of histopathological damage and MPO activity. The reduction of these effects was observed mainly with the TcdA enterotoxin. In contrast, it was also possible to identify that TcdB_{VNAP1} exotoxin has a histopathological activity as TcdB_{NAP1}.

These results suggest that, during the inflammation process, PMNs promote part of the pathological process, due to the dysregulation that is observed during the pathogenesis produced by the TcdA and TcdB toxins in the infection caused by *C. difficile*. This study improved our knowledge about the role of PMNs against TcdA and TcdB toxins in a real pathophysiological environment with the interaction of the multiple cellular signals generated by these toxins.

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a la vida, por brindarme protección, salud, sabiduría y guía para permitirme la dicha de alcanzar mis metas,

Al DAAD (Servicio Alemán de Intercambio Académico), con especial agradecimiento a su coordinadora regional en San José, Costa Rica Grettel González-Altamirano, por la valiosa oportunidad y apoyo en el desarrollo de esta experiencia académica,

A mi amada madre, por su amor incondicional, oraciones y por siempre estar, le amo.

A mi amada hermana, Sara Karina por ser una guerrera, amor incondicional, ánimos y por siempre estar,

A mis queridas hermanas y sobrinos/as, por siempre estar al pendiente de mí, de mi progreso y cariño,

A mi tutor académico Dr. Elías, por todo su valioso tiempo, por las facilidades técnicas y científicas brindadas para culminar mi investigación, ayuda incondicional, paciencia, sus extensos conocimientos, pero sobre todo, por permitirme aprender de usted como mentor y ejemplo a seguir .

A mis asesores académicos: Carlos y Esteban, por su tiempo, por todas las facilidades técnicas y científicas facilitadas para culminar mi investigación, sus valiosos y extensos conocimientos y sobre todo por permitirme aprender de cada uno de ustedes,

A mi querido amigo Michael Ross y familia, por su cariño y apoyo durante todo este proceso formativo, les quiero,

A mi querido amigo Chad Davis, por su cariño y apoyo durante todo este proceso formativo, gracias por siempre estar,

A mi querida amiga Xindy Alicia, por abrirme las puertas de su casa y de su familia, por su amistad, por su enorme cariño, ánimos y por siempre estar,

A Alicia, Lauren, Dylcia, Dione y Alejandra de los laboratorios de bacteriología, patología aviar y micología de la UNA, sin su dinamismo, compañerismo y cariño no habría sido nada igual,

A los encargados del bioterio Randall y Gea, por siempre colaborar en todo momento proveyendo animales, acceso a sus instalaciones, y por todo su apoyo durante todo el proceso experimental quirúrgico dentro del bioterio,

A mi amiga del alma, Ana Canales, por su cariño incondicional, por todos estos años de amistad, por las amenas conversaciones y por siempre darme ánimos en todo momento,

A mis amigos de la UNAH: Juan José, Claudio Mejía, Xenia Romero, Keylin Mendoza, Varinia Acosta, Mahli Galeano, Fanny Hidalgo y Glenda DelCid, por siempre estar atentos en mi progreso, por su cariño, años de amistad y por acompañarme en todo mi proceso formativo académico,

A Mauricio Molina-Andino, por incentivar, apoyarme y darme sus consejos para aplicar al posgrado y por siempre estar disponible para cualquier consulta durante mi proceso de formación, un abrazo fuerte hasta Alemania,

A mis amigas del DAAD: Evelyn, Elisa y Sonia, las quiero como si fueran parte de mi familia,

A mi amigo José, por su amistad, valiosos consejos, por nuestras largas conversaciones sobre ciencia e investigación, por impulsarme a seguir estudiando y por siempre estar,

A Doña Lourdes, Don José y la familia Víquez, por su cariño y apoyo, por haberme abierto las puertas de su casa y compartir conmigo tantas cosas,

A los médicos veterinarios y personal administrativo del Bioterio en SENASA, Heredia, que hicieron posible el desarrollo de la investigación abasteciéndonos de animales, su ayuda fue demasiado valiosa,

Al personal administrativo del PCVET y de la Escuela de Medicina Veterinaria de la UNA... Gracias Dra. Gaby Dolz, por su apoyo y constante cooperación; a la Dra. Sandra Estrada-Konig y María Arias, su colaboración han sido una bendición,

A todos y cada uno de los catedráticos de la maestría en Enfermedades Tropicales del PCVET, gracias por compartir todos sus valiosos conocimientos y por ser parte de mi proceso formativo,

DEDICATORIA

En memoria de mi amada tía: Elsy Argentina Torres...
“Sus valores y enseñanzas viven en mí, y eso la hace inmortal”.-Anónimo.

TABLA DE CONTENIDO

MIEMBROS DEL TRIBUNAL EXAMINADOR.....	4
RESUMEN	5
ABSTRACT	7
AGRADECIMIENTOS.....	viii
DEDICATORIA	x
TABLA DE CONTENIDO	xi
LISTA DE CUADROS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SIGLAS.....	xv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1.1 Generalidades de <i>Clostridioides</i> y <i>Clostridioides difficile</i>	1
1.1.2 Importancia de <i>Clostridioides difficile</i> en la Salud Pública	2
1.1.3 Factores de riesgo, fisiopatología y factores de virulencia de <i>Clostridioides difficile</i>	3
1.1.4 PMNs y su rol en las infecciones bacterianas.....	5
1.1.6 Diferencias celulares e inmunológicas entre humanos y ratones	10
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	13
1.2.1 Importancia.....	13
1.3 HIPÓTESIS.....	14
1.3.1 Hipótesis nula	14
1.3.2 Hipótesis alterna	14
1.4 OBJETIVOS	14
1.4.1 Objetivo general	14
1.4.2 Objetivos específicos.....	14
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
2.1 Consideraciones bioéticas.....	15
2.2 Animales.....	15
2.3 Cepas toxigénicas	15
2.4 Toxinas	17
2.5 Muestras de sangre	17
2.6 Modelo de depleción de neutrófilos polimorfonucleados (PMNs)	17
2.7 Análisis hematológicos.....	18
2.8 Citometría de flujo.....	18
2.9 Cuantificación de leucocitos totales en sangre	18
2.10 Ensayo <i>in vitro</i> de fagocitosis con PMNs.....	19
2.11 Ensayo <i>in vitro</i> con depleción de plaquetas.....	19
2.12 Biomodelo de Inflamación	20

2.13	Análisis estadísticos.....	22
3.	RESULTADOS	23
3.1	El tratamiento sistémico de depleción con GR-1 induce la disminución significativa de los PMNs en sangre periférica, en lámina propia y submucosa intestinal. 23	
3.2	Estandarización de una curva de crecimiento de <i>Clostridioides difficile</i> para determinar la concentración de bacterias/mL.....	26
3.3	La capacidad fagocítica de los PMNs de ratón contra <i>C. difficile</i> es mayor que la de los PMNs humanos.....	27
3.4	La depleción de PMNs generó una disminución en los parámetros de daño histopatológico inducidos por las toxinas de <i>Clostridioides difficile</i>	29
3.5	TcdA _{VPI10463} indujo la mayor respuesta proinflamatoria, inflamatoria y antiinflamatoria en ambos grupos experimentales.....	32
3.6	La depleción de los PMNs disminuye la actividad mieloperoxidasa (MPO) inducida por la toxina TcdB _{NAP1}	34
4.	DISCUSIÓN	35
5.	CONCLUSIONES	43
6.	RECOMENDACIONES	44
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
8.	ANEXOS.....	59
8.1	Anexo 1.....	59
8.2	Anexo 2.....	60
8.3	Anexo 3.....	62

LISTA DE CUADROS

Cuadro I. Cepas de <i>Clostridium difficile</i> utilizadas para la purificación de sus toxinas y ser utilizadas en biomodelo de asa intestinal ligada murina para esta investigación.	15
Cuadro II. Esquema de los biomodelos experimentales de acuerdo a la cepa de <i>Clostridioides difficile</i> , tipo de toxina, concentración de toxina, tratamiento aplicado al murino y la cantidad de animales utilizado por tratamiento.....	20
Cuadro III. Comparación de parámetros hematológicos entre grupos experimentales de ratones control (PBS) y ratones depletados (anticuerpo monoclonal anti-ratón Ly6G/Ly6C [GR-1+ PBS]).....	23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Evaluación de la depleción de PMNs en sangre periférica y lámina propia y submucosa intestinal).....	25
Figura 2. Curva de crecimiento modificada y cuantificación de la dinámica de multiplicación a las 0, 3, 4, 5 y 6 h de la cepa VPI10463/003 de <i>Clostridioides difficile</i>	26
Figura 3. Evaluación de la capacidad fagocítica de los PMNs.....	29
Figura 4. Imágenes histopatológicas de tejidos con las asas ileales ligadas de ratones tratados con las toxinas TcdA _{VPI10463} , TcdB _{NAP1/027} , TcdB _{VNAP1/019} o combinaciones de TcdA+TcdB en ratones no-depletados y depletados.	30
Figura 5. Cuantificación de las alteraciones histopatológicas observadas en tejidos de las asas ileales ligadas tratadas con toxinas de <i>Clostridioides difficile</i> en ratones no-depletados y depletados.	31
Figura 6. Cuantificación de CXCL-1, TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-10 en los tejidos de las asas ileales ligadas tratadas con toxinas de <i>Clostridioides difficile</i> en ratones no-depletados y depletados.....	33
Figura 7. Cuantificación de la actividad de MPO en tejidos de las asas ileales ligadas tratadas con toxinas de <i>Clostridioides difficile</i> en ratones no-depletados y depletados.	34

LISTA DE ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SIGLAS

AILM	Asa ileal ligada murina (<i>Murine-Ileal-Ligated-Loop</i>)
CXCL-1	Ligando 1 de quimiocina (motivo C-X-C) (<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 1</i>)
ICD	Infección causada por <i>Clostridioides difficile</i> (<i>Clostridioides difficile infection</i>)
IL	Interleucina (<i>Interleukin</i>)
MLST	Tipificación multilocus de secuencia (<i>Multilocus sequence typing</i>)
MLVA	Análisis repetido del número variable en el multilocus (<i>Multilocus variable-number tandem-repeat analysis</i>)
MOI	Multiplicidad de infección (<i>Multiplicity of infection</i>)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>)
NAP	Pulsotipo norteamericano (<i>North American pulsotype</i>)
NOD:	Dominio de oligomerización de unión de nucleótidos (<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>)
PaLoc	Locus de patogenicidad (<i>Pathogenicity locus</i>)
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos (<i>Pathogen associated molecular patterns</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PFG	Electroforesis de campo pulsátil (<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>)
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones (<i>Pattern recognition receptors</i>)
REA	Análisis de restricción de endonucleasa (<i>Restriction endonuclease analysis</i>)
ROS	Radicales libres de oxígeno (<i>Radical oxygen species</i>)
RT	Ribotipo (<i>Ribotype</i>)
ST	Tipos de secuencia (<i>Sequence types</i>)
UDP	Uridina difosfato (<i>Uridine-diphosphate</i>)
TCD	Toxina binaria (<i>Binary toxin</i>)
TcdA	Toxina A (<i>Toxin A</i>)
TcdB	Toxina B (<i>Toxin B</i>)
TLRs	Receptores tipo Toll (<i>Toll-like receptors</i>)
WGS	Secuencia de genoma completo (<i>Whole-genome sequencing</i>)

1. INTRODUCCIÓN

1.1.1 Generalidades de *Clostridioides* y *Clostridioides difficile*

Clostridioides es un género de bacterias Gram-positivas, anaerobios obligados y capaces de producir endoesporas. Las especies de *Clostridioides* habitan en los suelos y el tracto intestinal de los animales, incluidos los humanos. Dentro de este grupo de bacterias, se incluye varios patógenos humanos y veterinarios significativos, incluidos los agentes causantes del botulismo, tétano y gangrena gaseosa (Sun & Hirota, 2015; Rodríguez et al., 2019).

Las enfermedades de los clostridios se clasifican en tres categorías de acuerdo a la acción de las toxinas: (i) enfermedades neurotóxicas ocasionadas por *Clostridium botulinum* que causa el botulismo y *Clostridium tetani* que causa el tétano; (ii) enfermedades histotóxicas por *Clostridium chauvoei* que provoca la pierna negra en rumiantes, *Clostridium novyii* y *Clostridium sordellii* que producen gangrena gaseosa; y, (iii) enfermedades enterotóxicas por *Clostridium perfringens* que provoca la enteritis necrótica en pollos y disentería del ternero, *Clostridium piliforme* que provoca la enfermedad de Tyzzer, y *Clostridioides difficile* que produce colitis asociada al uso de antibióticos en caballos, cerdos, hámsteres, cuilos y humanos (Båverud, 2002; Navarro & Uzal, 2020).

Anteriormente, *Clostridioides difficile* se incluía en el género *Clostridium*, reclasificándose en el 2016 en el género *Clostridioides* (Lawson et al., 2016). La reclasificación de *Clostridium difficile* a *Clostridioides difficile* ocurrió en el año 2016, esta misma fue basada en análisis fenotípicos, quimiotaxonómicos y filogenéticos (Kachrimanidou et al., 2019), aunque tanto científica como clínicamente ambos nombres siguen considerándose válidos por la comunidad científica (The Lancet Infectious Diseases, 2019).

Las esporas de *C. difficile* se transmiten por vía oral- fecal (Furuya-Kanamori et al., 2015), y debido a la capacidad de estas de resistir al oxígeno es que este importante patógeno nosocomial es considerado ubicuo habitando el medio ambiente (agua, alimentos, suelos, entre otros). Además, el principal reservorio natural clásicamente asociado con esta bacteria es el tracto intestinal de humanos o animales (Janezic et al., 2016; Rodríguez et al., 2019). Existe una variedad de mamíferos que pueden ser colonizados por *C. difficile*, los cuales pueden permanecer como un reservorio asintomático o provocar enfermedad. La patogénesis es similar entre especies, pero la severidad y distribución en el tracto gastrointestinal varía ampliamente según la edad y especie (Czepiel et al., 2019).

Actualmente, la infección causada por *C. difficile* o ICD causa una variedad de manifestaciones clínicas como diarrea asociada a *C. difficile* (DACD) siendo una de las más importantes infecciones asociadas a la atención de salud (IAAS), responsable de brotes graves de infecciones intrahospitalarias, casos de diarreas esporádicas a nivel mundial (Shen et al., 2020); y además, es la principal causa identificable de diarrea asociada a antibióticos

(DAA) (Hernández-Rocha et al., 2016), la cual puede ser una diarrea leve evolucionando a colitis pseudomembranosa, megacolon tóxico y hasta la muerte; lo anterior, tiene una carga clínica y económica sustancial en los hospitales (Hung et al., 2021).

Las presentaciones clínicas compatibles con la ICD incluyen diarrea (definida como los tipos 5 a 7 de la tabla de heces de Bristol (Chumpitazi et al., 2016) más una frecuencia de tres deposiciones en 24 o menos horas consecutivas, o con mayor frecuencia de lo normal para el individuo, íleo (definido como signos de función intestinal, como vómitos y ausencia de heces con signos radiológicos de distensión intestinal), y megacolon tóxico (definido como signos radiológicos de distensión del colon, generalmente hasta ≥ 10 cm de diámetro (Crobach et al., 2018), y signos de una respuesta inflamatoria sistémica grave como evidencia histopatológica de colitis pseudomembranosa (32.4%) (Predrag, 2016). Entre otras manifestaciones clínicas, se han descrito con frecuencia fiebre, náuseas, vómito, debilidad y dolor abdominal. La leucocitosis es un hallazgo común reportado en la literatura científica y se relaciona con la severidad de la infección, así como la hipoalbuminemia (Cho et al., 2012).

1.1.2 Importancia de *Clostridioides difficile* en la Salud Pública

La bacteria es responsable del 15-25% de casos de DAA y de prácticamente casi todos los casos de colitis pseudomembranosa asociados a antibióticos. Actualmente, la ICD ha superado a *Staphylococcus aureus resistente* a la meticilina (SARM) como infecciones adquiridas en hospitales; y se estima que la mortalidad asociada con ICD es del 17 % y hasta del 25 % en personas de edad avanzada (Dilnessa et al., 2022). Asimismo, la aparición de las cepas hipervirulentas, como por ejemplo la cepa hipervirulenta ribotipo NAP1/027, el aumento significativo en la incidencia de hospitalizaciones asociadas con *C. difficile* a mediados de la década del 2000 y los brotes de ICD en hospitales a nivel mundial son ejemplos del gran impacto que *C. difficile* puede tener en los sistemas de atención médica (Balsells et al., 2019). Esta bacteria se encuentra y es capaz de adaptarse en diferentes ecosistemas ambientales (Jenior et al., 2017), y coloniza el intestino grueso de humanos, animales domésticos y salvajes, por lo que es considerada como un posible agente con potencial zoonótico (Keel & Songer, 2006; Quesada-Gómez et al., 2013; Brown & Wilson, 2018), así como en los animales destinados a la producción de alimentos (Andino-Molina et al., 2019; Knight & Riley, 2019). La infección en humanos puede ser asintomática o sintomática, variando desde una diarrea leve hasta una colitis pseudomembranosa fulminante. Ésta última, es caracterizada por presentar pseudomembranas con infiltración masiva de PMNs, y es la forma más severa de la enfermedad que puede ser fatal (McDonald et al., 2005; Keel & Songer, 2006). En el marco clínico, la intensidad de la respuesta inflamatoria causada en esta patología, es una de las características que permiten predecir un diagnóstico negativo para el paciente (El Feghaly et al., 2013).

Acerca de los reportes de hallazgos histológicos en caballos (DePestel & Aronoff, 2013), hámsteres y cuilos se han descrito enterocolitis hemorrágica necrotizante, tiflocolitis y colitis pseudomembranosa, y en lechones se ha descrito que provoca tiflocolitis neonatal

porcina (tiflocolitis necrotizante y edema mesocolónico (Båverud, 2002); además, es una de las causas más importantes de diarrea neonatal no controlada en cerdos (Songer & Anderson, 2006; Waters et al., 1998). De manera análoga a las infecciones humanas, la exposición excesiva a antibióticos se relaciona con el aumento en la distribución y transmisión de *C. difficile* en hatos a nivel mundial (Knight & Riley, 2019). En Costa Rica, fueron identificadas cepas multidrogoresistentes en lechones, las cuales estaban relacionadas genéticamente con cepas identificadas en casos clínicos en humanos .

En el Hospital San Juan de Dios (HSJD) en Costa Rica, el primer caso reportado de *C. difficile* fue realizado en el año 2008, con un rango de detección del 30% (n= 104) en pacientes adultos (Andino-Molina et al., 2019; Zumbado-Salas et al., 2008). En ese contexto, este rango de detección es similar con el de otros países donde se estima que del 20 al 28% de las ICD se adquieren en la comunidad, teniendo una incidencia de 20-50 casos por cada 100,000 habitantes en Estados Unidos, Suecia e Inglaterra (Álvarez-Hernández et al., 2018). Por eso *C. difficile*, es considerado un enteropatógeno con potencial epidémico a nivel intrahospitalario, sobre todo, en pacientes de edad avanzada, se asocia con el uso de antibióticos y a la dificultad de controlar sus esporas en el ambiente (Voth & Ballard, 2005; Rupnik et al., 2009; Karen C. & John G., 2011).

Posteriormente, se describe un brote de DAA en el HSJD a finales del 2008, asociado principalmente al uso de los antibióticos como cefotaxima, fluoroquinolonas, meropenem y claritromicina. Durante los siete meses que duró el brote la tasa de incidencia usual en IAAS asociadas a *C. difficile* se identificó que aumentó diez veces, llegando hasta 40,9 casos por cada 10 000 pacientes, con una tasa de mortalidad del 16,0% (Villalobos-Zúñiga & Boza-Cordero, 2012).

1.1.3 Factores de riesgo, fisiopatología y factores de virulencia de *Clostridioides difficile*

Tal como describe Hung y colaboradores (2021), se han identificado como factores de riesgo y recurrencia de la infección por *C. difficile*: a) la edad avanzada, b) quimioterapia, c) inhibidores de la bomba de protones o bloqueadores H₂, d) la presencia de comorbilidades con deterioro funcional, e) polimorfismo de genes inmunes (como IL-8), e) niveles bajos de anticuerpos contra la toxina B, f) hospitalización, y, g) el uso de antibióticos. Aunque cualquier antibiótico es un factor de riesgo potencial para desarrollar ICD, el uso y administración de clindamicina, penicilinas de amplio espectro y, más recientemente, cefalosporinas y fluoroquinolonas presentan el mayor riesgo a desarrollar ICD (Abad & Safdar, 2021).

C. difficile es capaz de colonizar de manera oportunista el colon de mamíferos e inducir enfermedad, especialmente con la administración de antibióticos. Ocasionando la disbiosis intestinal de la microbiota del hospedero. La patogenia de la infección implica la ingestión de esporas de *C. difficile* y la germinación de las mismas en presencia de ácidos biliares primarios no conjugados, que abundan en el intestino delgado, seguida de la colonización de

células vegetativas de la capa de moco intestinal, que son más comúnmente ingeridas por vía oral por hospederos susceptibles (Kim et al., 2017; Engevik et al., 2020). Las toxinas de *C. difficile* son responsables de manifestaciones clínicamente significativas de la ICD. Esta habilidad es crítica en la persistencia en el intestino de animales y humanos. Después de la colonización, la bacteria produce una enterotoxina (TcdA) y una exotoxina que glicosilan GTPasas monoméricas, las cuales se consideran los principales factores de virulencia. La acción de estas toxinas da como resultado la patología característica de la ICD (Awad et al., 2014; Quesada-Gómez et al., 2015).

Las cepas toxigénicas de *C. difficile* producen dos toxinas responsables de la enfermedad, la toxina A (TcdA) y la toxina B (TcdB), aunque no todas las cepas las producen. Las cepas no toxigénicas de *C. difficile* (NTCD, por sus siglas en inglés) son capaces de colonizar la mucosa intestinal y, usualmente se aíslan de individuos asintomáticos (Camorlinga et al., 2019).

La microbiota intestinal en un hospedero sano actúa como barrera protectora contra la ICD; pero en individuos cuya microbiota intestinal se encuentra alterada (disrupción), las esporas germinan hacia su forma vegetativa en el intestino delgado, subsecuentemente realiza su establecimiento en el colon. Después de la colonización, *C. difficile* produce sus principales factores de virulencia: enterotoxina (TcdA) y citotoxina (TcdB), codificadas por los genes *tcdA* y *tcdB* en el locus de patogenicidad cromosómica (PaLoc, por sus siglas en inglés) de 19.6 kb; además, PaLoc es capaz de codificar dos genes regulatorios —*tcdC* (regula negativamente *tcdA* y *tcdB*) y *tcdD* (regula positivamente *tcdA* y *tcdB*)— y un gen porina —*tcdE* (codifica una proteína [holina] que se encarga de hacer poros en la membrana celular para facilitar la liberación de las toxinas) (Bartlett, 2006; Lital Meyer et al., 2014).

Ambas toxinas comparten estructuras multidominio similares que incluyen un dominio de glucosiltransferasa catalítica N-terminal (GTD), un dominio de cisteína proteinasa autolítica (CPD), un dominio de translocación central (TM) y un dominio de unión al receptor C-terminal (RBD) (Pruitt & Lacy, 2012; Jank & Aktories, 2008). El mecanismo de intoxicación celular se puede resumir en los siguientes cuatro pasos: 1) unión al receptor e internalización de la toxina en las células hospedero; 2) formación de poros y translocación de la GTD a través de la membrana celular; 3) autoescisión de las toxinas y liberación de la GTD en el citosol; y, 4) la glucosilación de las GTPasas Rho y Ras del hospedero (Sun & Hirota, 2015).

Las toxinas TcdA y TcdB son parte de la familia de toxinas clostridiales grandes multidominio. Con su principal actividad glucosiltransferasa, modifican e inactivan específicamente las GTPasas de la superfamilia de las proteínas G pequeñas monoméricas conocidas como RAS. En este grupo también se incluyen las proteínas homólogas de Ras (Rho), la familia de proteínas pequeñas (Rac) de unión al guanosín trifosfato (GTP) y el homólogo de la proteína 42 (Cdc42), las cuales tienen un rol vital en la señalización celular.

La glucosilación de las GTPasas resulta en el desacople del citoesqueleto de actina, redondeo de las células y muerte celular (Jank et al., 2007; Jank & Aktories, 2008).

La otra toxina patogénica adicional es producida por algunas cepas de *C. difficile*, y es llamada toxina binaria (CDT, por sus siglas en inglés). Se ha detectado que la presencia de ésta exacerba la virulencia de algunas cepas por su acción irreversible adenosin-difosforiltransferasa (ADP) transferasa causando la disrupción del citoesqueleto de actina, induciendo la formación de protrusiones largas de microtúbulos en la célula del hospedero, facilitando la adhesión del esporulado (Schwan et al., 2009).

También es de destacar que, entre las infecciones humanas, los casos secundarios a las cepas toxigénicas A+/B- se consideran sin importancia clínica; mientras que una proporción variable de ICD (dependiendo de la ubicación geográfica) son causadas por cepas A-/B+. De hecho, los aislamientos clínicos de pacientes con ICD sintomática producen invariablemente tanto TcdA como TcdB o solo TcdB, lo que sugiere que TcdB es la "*conditio sine qua non*" para la patogénesis de la ICD. En 2002 en Israel, se reportó una alta prevalencia (56,5%) de las cepas A+/B- de pacientes sintomáticos, pero las implicaciones clínicas de este fenómeno epidemiológico no han sido confirmadas (Samra et al., 2002; Di Bella et al., 2016).

Las especies de *C. difficile* son genéticamente diversas, por esa razón se ha utilizado un serie de diferentes métodos moleculares para clasificar, investigar la epidemiología, diversidad genética y evolución de esta bacteria; Se han descrito métodos de análisis de fragmentos de restricción como: (i) la electroforesis en gel de campo pulsado [PFGE, por sus siglas en inglés], considerada el método estándar de referencia en USA para clasificar y tipificar cepas de *C. difficile*; y, (ii) el análisis de endonucleasas de restricción (REA, por sus siglas en inglés). También métodos de amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) como: (i) la ribotipificación por PCR para determinación de toxinotipos, considerada el método estándar de referencia en Europa; (ii) el análisis repetido del número variable multilocus (MLVA, por sus siglas en inglés). Otros métodos recomendados son basados en la comparación de las secuencias de nucleótidos como: (i) la tipificación multilocus de secuencia (MLST, por sus siglas en inglés); e, (ii) incluida la secuenciación del genoma completo (WGS, por sus siglas en inglés), entre otras (Janezic et al., 2016; Iancu et al., 2017).

El uso de diferentes métodos moleculares para clasificar y tipificar las cepas de *C. difficile* en América y Europa ha dado como resultado diferentes nomenclaturas para las diferentes cepas circulantes a nivel mundial, hecho que dificulta el intercambio de datos entre los laboratorios (Knight et al., 2015; Knight & Riley, 2019). Por ejemplo, la cepa hipervirulenta en pacientes hospitalizados en Canadá NAP7/078/V se refiere al pulstotipo norteamericano NAP7, ribotipo 078, REA BK y toxinotipo V (Tenover et al., 2011).

1.1.4 PMNs y su rol en las infecciones bacterianas

Los PMNs son células efectoras importantes del sistema inmunitario innato (Rosales, 2018). Estas células son las células sanguíneas de origen mieloide de vida corta, que

conforman la primera línea de defensa del hospedero contra patógenos, y funcionan como células efectoras que fagocitan el agente o estimulan la inflamación (Medzhitov, 2010; Silva & Correia-Neves, 2012).

Los PMNs responden a múltiples señales produciendo varias interleucinas y otros factores inflamatorios que influyen y regulan la inflamación y también el sistema inmunitario (Medzhitov, 2010; Silva & Correia-Neves, 2012). En ese mismo contexto, los PMNs pueden causar daño tisular, por lo que su regulación se limita al sitio de inflamación por la masiva infiltración de neutrófilos ocasionada por *C. difficile* durante la patología y es requerida para una adecuada resolución de la misma (Poutanen, 2004; Hallett et al., 2008; Headland & Norling, 2015). Sin embargo, cuando hay estímulos inflamatorios continuos se pueden generar respuestas agresivas y prolongadas, provocando una inflamación de tipo crónico en el hospedero (Nathan & Ding, 2010).

El reclutamiento de PMNs al sitio de la infección está mediado por moléculas inflamatorias, como factor de necrosis tumoral α (TNF- α) o interleucina 8 (IL-8) secretada por las células epiteliales pero también se cree que puede ser en respuesta a la interacción directa con sus toxinas (Kelly et al., 1994). El reclutamiento de PMNs también está impulsada por moléculas derivadas de patógenos, como los péptidos N-formilados (p. ej., formil-metionil-leucil-fenilalanina, fMLF) que son subproductos de la síntesis de proteínas bacterianas. Además, de otras de células inmunitarias residentes, la mayoría de los PMNs tienen que ser reclutados de la sangre y esto implica un proceso conocido como extravasación (Dorward et al., 2015).

El reclutamiento de PMNs es un proceso de varios pasos que incluye: (i) la extravasación de PMNs del torrente sanguíneo a sitios distales de infección y/o lesión, (ii) la movilización de PMNs de las reservas de la médula ósea, y (iii) el aumento de la hematopoyesis según sea necesario (Jose & Madan, 2016). Las bacterias y sus característicos patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, por sus siglas en inglés) son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patógenos (PRR, por sus siglas en inglés) del hospedero, que incluyen receptores tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés) y proteínas de dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD, por sus siglas en inglés) (Mogensen, 2009). La ligadura del receptor desencadena la producción de una variedad de citocinas y quimiocinas proinflamatorias del hospedero, como la interleucina IL-8, IL-1 α e IL- β , CXCL1 (GRO α), CXCL2 (MIP2 α), CXCL5 (ENA78), factor de necrosis tumoral (TNF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y macrófagos (GM-CSF). Estas moléculas sirven como quimioatrayentes y promueven el reclutamiento de PMNs en los tejidos infectados (McPhail et al., 1984; Kobayashi et al., 2018).

Los PMNs utilizan procesos dependientes e independientes del oxígeno para matar bacterias. Durante la fagocitosis, los PMNs de humanos ensamblan y activan una oxidasa dependiente de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH, por sus siglas en inglés) que produce la formación de potentes sustancias reactivas de oxígeno (ROS)

antimicrobianas, como radicales superóxido, peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso, radicales hidroxilo y cloraminas (Nauseef & Borregaard, 2014). Además, los gránulos citoplasmáticos de estas células se fusionan con fagosomas que contienen bacterias y enriquecen la luz de la vacuola con péptidos y proteasas antimicrobianas (defensinas). En los PMNs activados, una oxidasa dependiente de NADPH unida a la membrana genera altos niveles de ROS. Por lo tanto, la potente actividad antimicrobiana de los PMNs es un esfuerzo de colaboración entre enzimas altamente proteolíticas y degradantes, moléculas catiónicas y ROS (Ulfig & Leichert, 2021).

1.1.5 Inmunomodulación de los PMNs en la inmunopatogénesis de *Clostridioides difficile* en la ICD

Existen tres líneas de defensa en el sistema inmune que neutralizan a *C. difficile*: (i) la primera línea de defensa es la barrera epitelial debida a la ruptura del tejido intestinal que ocurre después de la colonización de la bacteria; (ii) La segunda línea de defensa es una respuesta inmune innata rápida, por las interacciones inespecíficas entre los PAMP y PRR; y la última línea de defensa, (iii) es la alta inducción de respuesta proinflamatoria que puede ser dañina o beneficiosa, pero que desencadena la respuesta inmune adaptativa con inducción de memoria inmunológica (Péchiné & Collignon, 2016).

TcdA y TcdB tienen actividades independientes de Rho-GTPasa en las CIE y en las células inmunitarias de la mucosa después de la ruptura del intestino lo que constituye la primera barrera de defensa mencionada anteriormente (Cowardin & Petri, 2014; Sun & Hirota, 2015). TcdA y TcdB activan cascadas de señalización inflamatoria e inducen la producción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias en CIE. TcdA es una toxina proinflamatoria cuyos efectos enterotóxicos dependen sustancialmente del reclutamiento intensivo de PMNs (Ishida et al., 2004a; Kelly et al., 1994). En ese sentido, TcdA induce la producción de IL-8, considerada un potente quimioatrayente de neutrófilos en líneas celulares de colon humano (Mahida et al., 1996). Se demostró que la producción de IL-8 era mediada por la activación de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) que activan el factor nuclear kappa B (NF- κ B) y las vías de señalización de la proteína activadora-1 (AP-1) (Bobo et al., 2013; Na et al., 2005).

En un estudio que se utilizaron sobrenadantes de cultivo que contienen una mezcla de TcdA/TcdB (cepa VPI₁₀₄₆₃), reportándose que solo el purificado de TcdB indujo estrés oxidativo en células Caco-2, la liberación de UDP, una señal de peligro putativo y un ligando del receptor P2Y6, que desencadenó la producción de IL-8 (Hansen et al., 2013). Se concluyó que la producción de IL-8 precedió a la detección de la glucosilación de Rho, lo que sugiere que esta producción era independiente de las actividades enzimáticas de las toxinas (Hansen et al., 2013). Tanto TcdA como TcdB, desencadenan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Frädrich et al., 2016a). La citotoxicidad de TcdB a altas concentraciones de toxina se cree son el resultado de la producción de ROS mediada por NADPH oxidasa (NOX) produciéndose independiente de la actividad glucosiltransferasa (Wershil et al., 1998; Vohra

& Poxton, 2012; Péchiné & Collignon, 2016). También se ha informado el papel de ROS en la inflamación intestinal inducida por TcdA. Por su parte He y colaboradores, demostraron que en los colonocitos humanos TcdA induce alteraciones en las funciones mitocondriales y generación de ROS capaz de activar la vía de NF- κ B y condujo a la producción de IL-8, también independiente de la glucosilación de Rho (He et al., 2002). Asimismo, Kim y colaboradores, mostraron que colonocitos expuestos a TcdA produjeron ROS, que activó la vía p38 MAPK, lo que condujo a la inducción de ciclo-oxigenasa-2 (COX-2) y secreción de prostaglandina E2 (PGE2), que a su vez aumentó la transcripción del gen de la IL-8 (Kim et al., 2017). En general, estos hallazgos reportados sugieren que TcdA y TcdB activan cascadas de señalización inflamatoria e inducen producción de citoquinas proinflamatoria y quimiocinas en CIE que promueven el reclutamiento de PMNs, otras células inmunitarias y producción de defensinas (Péchiné & Collignon, 2016).

Posterior a la ruptura de la barrera epitelial (primera línea de defensa), TcdA y TcdB pueden activar en la mucosa diferentes células inmunitarias que conducen a una segunda fase de liberación de mediadores inflamatorios y entrada de PMNs (Wershil et al., 1998). Según reportes por Wershil y colaboradores, en el estudio en que realizaron agotamiento de mastocitos, mostraron que las toxinas de *C. difficile* estimulaban los mastocitos que participan en la infiltración de neutrófilos induciendo secreción de fluido intestinal, todo esto inducido por TcdA; asimismo, mostraron que estos parámetros disminuyeron significativamente en el asa ileal de ratones, con esto se logró demostrar el efecto perjudicial que representa la exacerbada infiltración de PMNs.

Ambas toxinas activan el inflamasoma mediante una proteína adaptadora como la proteína asociada a apoptosis (ASC) induciendo la secreción de IL-1 β e IL-18. Importante destacar que, la IL-1 β participa en la generación de una respuesta a la infección tanto local como sistémica mediante la generación de fiebre, activando linfocitos y promoviendo la infiltración de leucocitos durante la infección o en el sitio de la lesión. Por su parte, IL-18 induce IFN- γ contribuyendo a la proliferación de los linfocitos T helper (T_{h1}) (van de Veerdonk et al., 2011). Mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*, se logró demostrar que tanto en las células dendríticas como en los macrófagos con deficiencia del gen que codifica para la proteína ASC, se inhibe la inducción de la IL-1 β con valores de disminución significativos en el sitio de la infección (Dingle et al., 2011).

Tanto cepas toxigénicas como no toxigénicas de *C. difficile* modulan la inmunidad innata del hospedero utilizando mecanismo completamente independientes de los mecanismos de acción de las toxinas (Hasegawa et al., 2011). Se han descrito dos familias de PRR que participan en las cascadas de señalización: los receptores tipo Toll (TLR) y la familia de proteínas de dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD) (Péchiné & Collignon, 2016). Consecuentemente, al estimular NOD en macrófagos de murinos se induce la secreción de IL-6 y CXCL1 (Vohra & Poxton, 2012a). Hasegawa y colaboradores, demostraron que las cepas de *C. difficile* en modelos *in vivo* con murinos carentes de expresar

la vía NOD conlleva a una baja secreción de citoquinas proinflamatorias y baja infiltración de PMNs. Estos resultados sugirieron que NOD regula la susceptibilidad del hospedero a *C. difficile* y sugieren que el reclutamiento de neutrófilos mediado por NOD es una respuesta inmunitaria importante contra el enteropatógeno (Hasegawa et al., 2011).

Por otro lado, se ha determinado que tanto las proteínas de la capa S y componentes flagelares provenientes de diferentes cepas de *C. difficile* tanto hipervirulentas/epidémicas como no hipervirulentas/epidémicas en modelos de AILM en monocitos madurados a células dendríticas de humanos son capaces de inducir la producción de TNF- α , IL-1 β e IL-8 independientemente de la cepa de *C. difficile* (; Vohra & Poxton, 2012; Péchiné & Collignon, 2016). Las proteínas de la capa S activan la inmunidad innata y adaptativa a través de un mecanismo dependiente de TLR4, vía p38 MAPK de células dendríticas murinas induciendo la secreción de IL-12, IL-23 e IL-10 (Ryan et al., 2011). Además, los componentes flagelares interactúan por medio de mecanismos tipo TLR5 de células Caco-2 y HT-29 por medio de MyD88, aumentando la producción de IL-8 y CCL20 (Yoshino et al., 2013). Yoshino y colaboradores, concluyen que la flagelina juega un rol importante en el desenlace de la ICD.

Seguidamente Nicolas y colaboradores, en cultivos de células epiteliales a partir de *C. difficile* ATCC 43255 y dos aislados clínicos reportaron la secreción de vesículas de membrana (VM) capaces de codificar un total de 262 proteínas carentes de exotoxinas y enterotoxinas, dentro de las cuales se reveló la presencia de las proteínas Cwp8, Cwp10, Cwp66, FliC, FliL y FliS1. Estas anteriores se relacionan directamente con estimular la expresión de genes de citoquinas proinflamatorias, incluidas IL-1 β , IL-6, IL-8 y la proteína quimioatrayente de monocitos-1 en células Caco-2 del epitelio colorrectal humano. Además, estas vesículas extracelulares indujeron citotoxicidad en células Caco-2 (Nicholas et al., 2017). Entonces, las VM de *C. difficile* son nanocomplejos importantes que provocan una respuesta proinflamatoria e inducen citotoxicidad en las células epiteliales del colon, lo que puede contribuir, junto con las toxinas, a la lesión de la mucosa intestinal durante la infección por *C. difficile* (Nicholas et al., 2017).

Se considera TcdA la responsable de activar la producción de interleucinas proinflamatorias como, IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α por monocitos humanos como también IL-8 e IL-6 por células intestinales epiteliales (Sun et al., 2010; Álvarez-Hernández et al., 2018; Foschetti et al., 2020). Por su parte, TcdB es considerado el principal factor de virulencia de *C. difficile*, con alta citotoxicidad, generalmente más potente (~1000 veces) que TcdA (Fettucciari et al., 2017), sobre todo, en modelos de cultivo celular (Chumbler et al., 2016), causando liberación de factor de necrosis tumoral (TNF)- α y la interleucina IL-1 β . Esta respuesta celular induce la entrada masiva de PMNs, promoviendo la destrucción del epitelio intestinal. La neutrofilia se correlaciona con un pronóstico reservado (Pepin et al., 2009), por lo que una respuesta inflamatoria exagerada es en gran parte responsable de la patología asociada a infecciones de *C. difficile* (Kelly & Kyne, 2011).

Se ha observado en ensayos *in vitro* que los PMNs por sí solos tienen actividad fagocítica contra bacterias (Beutler, 2004). No obstante, funcionan mejor en conjunto con células y proteínas del sistema inmune, como anticuerpos producidos por células linfoides que opsonizan la bacteria para su destrucción por células mieloides (Beutler, 2004). La fagocitosis de las bacterias usualmente acelera la apoptosis de los PMNs, lo que promueve una resolución de la infección. Sin embargo, algunos patógenos bacterianos dependiendo de sus factores de virulencia, pueden alterar la apoptosis para sobrevivir (Kennedy & DeLeo, 2009). También Brito y colaboradores, reportaron que en presencia de TcdA, los PMNs pasaron de una forma esférica a una alargada, presentaron reorganización del citoesqueleto de F-actina como agregados, disminución en la expresión de L-selectina y aumento de Mac-1, adherencia incrementada y disminución en la actividad oxidativa. Estos efectos los relacionaron con la glicosilación de GTPasas de la familia Rho en los PMNs (Brito et al., 2002).

Acerca de TcdB, existen estudios con PMNs sobre muerte celular, estallido respiratorio y fagocitosis con resultados incongruentes. Por ejemplo, en un estudio se trataron PMNs con toxinas provenientes de un filtrado de cultivo para evaluar si las cepas toxigénicas son más resistentes a la fagocitosis que las no toxigénicas. No observaron cambios en la actividad fagocítica ni en la viabilidad de los PMNs con las cepas toxigénicas (Dailey et al., 1987).

También, se ha descrito que TcdB induce una migración intensa de PMNs mediada por TNF- α y productos de lipoxigenasa a partir de monocitos de rata (Souza et al., 1997). Goy y colaboradores, describen que la activación de PMNs con fragmentos no citotóxicos de TcdB producen mayor activación en los PMNs que con la toxina entera de TcdB y TcdA, determinado mediante la medición del calcio intracelular, la producción aumentada de ROS, la activación de integrinas y la desgranulación de los PMNs (Goy et al., 2015). En contraste, otro estudio realizado pero con PMNs caninos, demostró que el tratamiento con TcdB por una hora redujo la capacidad fagocítica, la actividad del estallido respiratorio y los niveles de F-actina (Kang et al., 2009).

1.1.6 Diferencias celulares e inmunológicas entre humanos y ratones

El hombre y el ratón son diferentes con respecto a su tamaño, comportamiento, esperanza de vida, condiciones de vida, nichos ecológicos y otras propiedades. No obstante, el líder del sistema modelo para la investigación biomédica es el ratón. La secuenciación del genoma en ambas especies demostró que el número de genes en el ratón es 20,210, mientras que los humanos tienen solo 19,042. El 75% de los genes de ratón y el 80% de los genes humanos son ortólogos. Estos ortólogos uno a uno exhiben una mediana de identidades de nucleótidos y aminoácidos del 85,3% y 88,2%, respectivamente (Russell, 1985; Bryda, 2013).

Para ratones CD-1, el porcentaje de PMNs que poseen es ~10–30 % (300–2000 células/ μ L); y, el porcentaje de linfocitos ~50–70 % (1000–7000 células/ μ L). En contraste, los humanos poseen un porcentaje de PMNs ~50-70% (3500-7000 células/ μ L); y, el

porcentaje de linfocitos ~20-40% (1400–4000 células/ μ L) (Haley, 2003). El contenido de gránulos en los PMNs de humanos es muy diferente al de los ratones, lo que podría alterar drásticamente las funciones efectoras de los PMNs en los ratones frente a los humanos. Por ejemplo, los PMNs de ratón no producen defensinas, expresan criptidinas (Ganz, 2003; Mestas & Hughes, 2004). Además, la expresión de proteínas bactericidas que aumenta la permeabilidad (BPI), mieloperoxidasa (MPO), β -glucuronidasa, lisozima, fosfatasa alcalina y arginasa-1 son expresadas en mayor concentraciones en humanos que en ratones (Church et al., 2009). Asimismo, las vías de activación de la producción de sustancias reactivas de oxígeno (ROS) difieren entre los PMNs de humanos y de ratón (Bagaitkar et al., 2012).

La producción de interleucinas proinflamatorias también difiere, es decir, la secreción de IL-10 está bien establecida en los PMNs murinos, mientras que los PMNs humanos parecen no secretar cantidades detectables de IL-10 (Tamassia et al., 2013). Además, si los PMNs humanos pueden expresar IL-6, IL-17A, IL-17F e IFN- γ , se ha descrito que sus homólogos en ratón es objeto de informes contradictorios (Tecchio et al., 2014). Mientras tal como describe que la interleucina IL-8 fue identificada como la quimioatrayente más importante para el reclutamiento de PMNs humanos, el ortólogo, su contraparte está ausente en los ratones. En contraste, los ratones expresan una quimiocina conocida como CXCL1/MGSA desempeña un papel fundamental en la respuesta inmunitaria del huésped al reclutar y activar neutrófilos para matar microorganismos en el sitio del tejido. La CXCL1 existe de forma reversible como monómeros y dímeros, y media su función al unirse a glucosaminoglucanos (GAG) y al receptor CXCR2 (Sawant et al., 2016a)

Entre las más importantes diferencias que emplean los humanos y ratones como estrategias inmunológicas de defensas se describen: (i) los humanos emplean mecanismos mediante inducción de resistencia contra patógenos y antígenos nocivos para desactivarlos o eliminarlos, mientras los ratones emplean mecanismos de tolerancia para mantenerlos a niveles bajos; (ii) los humanos presentan estrategias comunes contra mecanismos no infecciosos, pero los ratones no las presentan; (iii) el sistema inmunológico humano es capaz de sintetizar ~10-15 μ g de lipopolisacárido (LPS)/kg para inducir shock, en contraste, los ratones ~15 mg de LPS/kg; (iv) en ratones, existe una alta expresión de óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) cataliza la conversión de la arginasa en macrófagos, pero en humanos este mecanismo no existe; (v) el interferón- γ (TNF- γ) en humanos, induce expresión de idolamina-pirrol 2,3-dioxigenasa (IDO) para realizar depleción de L-triptófano (L-Trp), por su parte los ratones, expresan GTPasas relacionadas a la inmunidad (IRG, por sus siglas en inglés) para activar el proceso de autofagia (Bryant & Monie, 2012; Zschaler et al., 2014); (vi) la estructura y las propiedades fisicoquímicas de moléculas importantes como las selectinas, las quinasas PI3 y las serina proteasas son diferentes, lo que podría afectar la migración de los PMNs a los sitios tumorales, la señalización celular intracelular y los mecanismos efectoras de los PMNs; y, (vii) los ratones no son capaces de expresa Fc α RI, uno de los receptores Fc más potentes que desencadena funciones efectoras como el estallido oxidativo, la liberación de citoquinas, la NETosis y la fagocitosis en los PMNs, así como

suficiente concentración de anticuerpos dependientes de citotoxicidad celular (ADCC) (Otten et al., 2005; Aleyd et al., 2015).

A pesar de la vital importancia que tienen los PMNs para todos los animales respecto a su respuesta a los patógenos, estas diferencias entre ratones y humanos es importante considerarlas para evitar caer en la simple extrapolación de resultados entre especie de animales cuando se desarrolla un modelo experimental. Sin embargo, uso de modelos murino es esencial para avanzar en el entendimiento de la fisiopatología de enfermedades *in vivo* y el rol de ciertas células como los PMNs en estas patologías.

Debido a la falta de técnicas moleculares, para manipular genéticamente *C. difficile*, los primeros estudios de infección involucraron la administración intragástrica de toxinas purificadas a animales. Sugiriendo que TcdA era el principal factor de virulencia y que TcdB desempeñaba un papel menos importante en la enfermedad (Lyerly et al., 1986). Este paradigma ha ido cambiando, con la aparición de cepas variantes naturales que no producían TcdA pero sí producían TcdB (TcdA⁻ TcdB⁺), y además causaban una ICD fulminante en humanos (Drudy et al., 2007). Y también ha ido cambiando los enfoques de investigación con biomodelos animales o ensayos *in vivo*.

El efecto de las toxinas A (TcdA) y B (TcdB) en la patología producida por *C. difficile* se ha estudiado principalmente *in vitro* (López-Ureña et al., 2019). El estudio más reciente actualmente, describe el hallazgo sobre la inmunopatogénesis de los PMNs de humanos y su resistencia al ser expuestos a TcdB contra la actividad glucosiltransferasa ejercida por esta toxina sobre las pequeñas GTPasas pertenecientes a la superfamilia de proteínas Ras, que incluye Roa y Rac1; asimismo, se confirmó que la toxina no disminuía la actividad fagocítica del PMN (Chaves-Cordero et al., 2022); Aunque existe información sobre estudios *in vivo* acerca de los efectos inmunopatogénicos de los PMNs con diferentes enfoques en la inmunopatogénesis de este enteropatógeno; ninguno ha utilizado estrategias de agotamiento o depleción de PMNs expuestos a las toxinas de *C. difficile*, y sobre todo, a investigar el papel exacto que juega la inflamación neutrofílica en el contexto de la ICD sin la presencia de los neutrófilos (Jose & Madan, 2016). Es por eso que se hace necesario estudiar la actividad de las toxinas de *C. difficile* en este modelos *in vivo* para determinar la función de los PMNs durante la infección y cómo las toxinas pueden afectar el funcionamiento en condiciones fisiológicas reales en los PMNs.

1.2 JUSTIFICACIÓN

1.2.1 Importancia

Las toxinas A (TcdA) y B (TcdB) de *Clostridioides difficile* son los principales factores de virulencia de la diarrea causada por *C. difficile*. Esta patología ocurre, además, en presencia de un reclutamiento masivo de PMNs al sitio de infección. A pesar del alto conocimiento de la actividad de estas toxinas con algunos estudios *in vivo* con enfoques en la inmunopatogénesis de este enteropatógeno y que de manera indirecta han obtenido resultados relacionados con los PMNs (Wershil et al., 1998; Dingle et al., 2011; Hasegawa et al., 2011); Asimismo, se han estudiado muy poco los posibles efectos inmunomoduladores de los PMNs y los efectos inmunorreguladores de estas toxinas *in vivo* (estudios principalmente *in vitro* (Chaves-Cordero et al., 2022)) en los procesos inflamatorios asociados a los PMNs (Jose & Madan, 2016; López-Ureña et al., 2019). No existen estudios *in vivo* utilizando estrategias de agotamiento o depleción de PMNs expuestos a las toxinas de *C. difficile* para conocer el papel de estas células en la patología causada por *Clostridioides difficile* en el lumen intestinal.

Por lo tanto, esta investigación evaluó el efecto en la respuesta inflamatoria (por la presencia de los PMNs) en la patogénesis causada por las toxinas A (TcdA) y B (TcdB) de *C. difficile* utilizando un biomodelo de asa intestinal ligada en ratones neutropénicos y no neutropénicos.

Los datos generados en este estudio permitirán, entre otras cosas, mejorar el conocimiento sobre la contribución de los PMNs en la respuesta inflamatoria desencadenada por las toxinas de *C. difficile* en un ambiente fisiopatológico real.

1.3 HIPÓTESIS

1.3.1 Hipótesis nula

Los PMNs reclutados en el lumen intestinal no exacerban la patogénesis de la infección producida por la acción de las toxinas de *Clostridioides difficile*.

1.3.2 Hipótesis alterna

Los PMNs reclutados en el lumen intestinal exacerban la patogénesis de la infección producida por la acción de las toxinas de *Clostridioides difficile*.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo general

- Evaluar el papel de los neutrófilos (PMNs) en la patogénesis producida por las toxinas A (TcdA) y B (TcdB) de *Clostridioides difficile* en un modelo murino.

1.4.2 Objetivos específicos

1.4.2.1 Comprobar un protocolo de depleción sistémica de neutrófilos en ratones para aplicar ensayos de intoxicación *in vivo* utilizando las toxinas A (TcdA) y B (TcdB) de *Clostridioides difficile*.

1.4.2.2 Evaluar la capacidad de asociación y fagocitosis entre las células vegetativas de *Clostridioides difficile* cepa VPI10463/RT003 y los PMNs mediante ensayos *in vitro* con sangre periférica de humano y ratón.

1.4.2.3 Analizar potencial patogénico inducido por las toxinas de *Clostridioides difficile* utilizando un modelo de asa intestinal ligada murina mediante la realización de un análisis histopatológico.

1.4.2.4 Evaluar el potencial inflamatorio de las toxinas A (TcdA) y B (TcdB) de *Clostridioides difficile* utilizando un modelo de asa intestinal ligada murina para cuantificación de citoquinas proinflamatorias en el lumen intestinal y medición de la actividad mieloperoxidasa (MPO) para evaluar la migración de neutrófilos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Consideraciones bioéticas

La experimentación con ratones se llevó a cabo de acuerdo con la ley correspondiente (Ley de Bienestar de los Animales de Costa Rica, Ley 7451). Debido a que este proyecto se realizó en colaboración con la Universidad de Costa Rica (UCR), y el Departamento de Microbiología. El proyecto y biomodelo revisados y aprobados por el Comité Institucional de Cuido y Uso de Animales (CICUA) de la UCR bajo el Decreto Ejecutivo N°26668 con folio N°CICUA-043-2021. Asimismo, el proyecto fue adscrito al Consejo Nacional de Investigación en Salud (CONIS) bajo el oficio N°UNA-PCVET-OFIC-087-2021.

2.2 Animales

Se utilizaron cien ratones *Swiss* machos de la cepa Hsd:ICR procedentes del Bioterio de la Escuela de Medicina Veterinaria (EMV-UNA) de la Universidad Nacional de Costa Rica (UNA), con edades entre (5-8) semanas y un peso corporal entre (20-24 g). Los animales se mantuvieron agrupados en jaulas de policarbonato adecuadas para su tamaño, en un ambiente controlado y un fotoperíodo de 12 horas. El agua fue administrada *ad libitum*, al igual que la comida (pellets para roedores).

2.3 Cepas toxigénicas

2.3.1 Cepas bacterianas

Para este estudio se utilizaron tres cepas de *C. difficile* conservadas en la bacterioteca del Laboratorio de Investigación de Bacteriología Anaerobia (LIBA) de la UCR (Ver cuadro I).

Cuadro I. Cepas de *Clostridium difficile* utilizadas para la purificación de sus toxinas y ser utilizadas en biomodelo de asa intestinal ligada murina para esta investigación.

Cepa	PT ^a	RT ^b	ST ^c	T ^d	Tipo TcdB ^e	CPE ^f	Perfil de Toxinas
<i>C. difficile</i> NAP1/027	NAP1	027	01	III	C	A	A+B+CDT+ (Quesada-Gómez et al., 2016)
<i>C. difficile</i> NAP1/019	NAP1	019	67	XXIII	V	V	A+B+CDT+ (Quesada-Gómez et al., 2015)

<i>C. difficile</i> VPI 10463/003	VPI	003	ND	0	C	A	A+B+CDT- (Huelsenbeck et al., 2007)
--	------------	------------	-----------	----------	----------	----------	--

^aPT= Pulsotipo.

^bRT= Ribotipo.

^cST= Tipo de secuencia. ND= No determinado.

^eC=Clásica. V= Variante.

^fCPE= Efecto citopático. A= Arborizante.

2.3.2 Cultivo y curva de crecimiento de *Clostridioides difficile*

Las cepa de *C. difficile* VPI 10463/RT003 se cultivó en caldo Brucella (BBL, Becton, Dickinson and Company) suplementado con vitamina K al 0.1% (ThermoScientific), y eritrocitos lisados de caballo al 5.0% a 37°C en sistema de anaerobiosis (AN20P, ANOXOMAT) mantenida con una mezcla gaseosa de 5% H₂, 5% CO₂ y N₂ 90% (Edwards et al., 2013). Todos los medios de crecimiento y las soluciones fueron colocados en la cámara anaerobia 24 horas antes de ser utilizados (Edwards et al., 2013; Quesada-Gómez et al., 2015). Antes del uso de la bacteria en los ensayos *in vitro*, esta se cultivó por 24 horas en agar Brucella (BBL, Becton, Dickinson and Company).

Para determinar la concentración de *C. difficile* en caldo, se realizó una curva de crecimiento. Para esto la bacteria se cultivó en 40 mL de caldo Brucella (BBL, Becton, Dickinson and Company) a partir de un cultivo en agar Brucella (BBL, Becton, Dickinson and Company) por 24 horas a 37°C en jarras de anaerobiosis. Este cultivo se ajustó a una densidad óptica de 600 nm (OD600) de 0,05 utilizando caldo pre-reducido. Este punto se determinó como tiempo de 0 h. Posteriormente el caldo se llevó nuevamente a condiciones de incubación en anaerobiosis y se determinó el OD600 a los 3, 4, 5 y 6 h con un espectrofotómetro (Spectronic 20D+, ThermoScientific). Para esto se tomó 5 ml de alícuota de cultivo del caldo que se recolectó en los puntos de tiempo designados. Para cuantificar la concentración bacteriana (unidades formadoras de colonias [UFC]/mL) en cada punto, se realizaron diluciones del cultivo y se platearon (utilizando el método de esparcimiento en placa) en agar Brucella (BBL, Becton, Dickinson and Company) suplementado (descrito anteriormente) después de 24 h de incubación anaerobia. Se realizaron tres réplicas de este procedimiento por separado, y cada réplica se ejecutó en tiempos específicos diferentes.

Para el análisis de los resultados, se calculó el promedio \pm la desviación estándar en términos de UFC/mL, así como el valor absoluto de la densidad óptica (D.O.) y la concentración bacteriana correspondiente en valores (UFC/mL-1). Se calculó una ecuación lineal de regresión probit con ecuación de crecimiento logístico para medir la actividad del crecimiento de la bacteria mediante el valor R.

2.4 Toxinas

Las toxinas, TcB_{NAP1/027}, y TcdB_{NAP1/019} se obtuvieron a partir de aislamientos clínicos de pacientes hospitalarios en Costa Rica. La toxina TcdA se obtuvo a partir de la cepa de referencia VPI 10463. La toxina TcdA se utilizaron para efectos comparativos con las toxinas TcdB en los ensayos que se consideró necesario.

Las toxinas fueron obtenidas de las cepas anteriormente descritas y cultivadas en sistema de diálisis por 72 horas en caldo infusión cerebro corazón y purificadas por cromatografía de intercambio iónico y filtración en gel. La pureza de las toxinas se evaluó en SDS-PAGE con la tinción de Coomassie en un gel al 7.5% cargado con 1.5 µg de TcdA_{VPI} (VPI), TcdB_{NAP1} (NAP1/RT027 Y NAP1/RT019, respectivamente). La identificación final de la toxina se realizó por espectrometría de masas.

Todas las toxinas fueron suministradas por el Laboratorio de Investigación en Bacteriología Anaerobia de la Facultad de Microbiología (LiBA) y el Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET) de la Universidad de Costa Rica donde permanecen a -80°C en buffer HEPES 20 mM pH 6.9 suplementado con NaCl 50 mM.

2.5 Muestras de sangre

Para los ensayos con sangre periférica y obtención de los PMNs, se utilizó sangre humana colectada a partir de la vena cefálica en tubos de heparina de litio (Vacuette®). La colecta de la sangre se realizó posterior a la firma de un consentimiento informado por parte del donante (Anexo 1).

La muestra de sangre murina se obtuvo bajo anestesia con capilares heparinizados a partir del plexo venoso de la órbita ocular derecha. Aproximadamente se colectó 1 mL de sangre en recipientes de plástico previamente rotulados, con anticoagulante (EDTA) (BD, Vacutainer®). En el momento de la colecta, ninguno de los sujetos presentó síntomas ni signos de enfermedad, no había recibido inmunizaciones recientes y tampoco se encontraba bajo terapia medicamentosa.

2.6 Modelo de depleción de neutrófilos polimorfonucleados (PMNs)

En el proceso de depleción, los ratones (*Swiss* machos de la cepa Hsd:ICR [CD-1®]) fueron inoculados intraperitonealmente con 100 µg de anticuerpo monoclonal anti-ratón Ly6G/Ly6C [Gr-1] (*InVivoMab*, BioXCell) suspendido en solución de Fosfato-Buferado-Salino (PBS) (Cell culture, gibco) en un volumen final de 100 µL. Los ratones control fueron inoculados solo con la solución de PBS. Los ratones se mantuvieron en condiciones controladas (descritas en el apartado 2.1) por 24 horas, tiempo en el que los PMNs alcanzan su mayor nivel de depleción en sangre periférica (Barquero-Calvo et al., 2013).

2.7 Análisis hematológicos

La sangre de ratones fue sometida a análisis hematológicos para evaluar si se encontraba dentro de los parámetros normales definidos por el fabricante de acuerdo a la especie. Asimismo, se evaluó si la depleción de los neutrófilos con GR-1 afectó algún parámetro hematológico en los ratones. Se colectó la sangre completa de diez animales depletados y diez animales no depletados en tubos con EDTA, y se procedió a realizar un hemograma completo en el Laboratorio de Inmunología de la Escuela de Medicina Veterinaria mediante el equipo VETSCAN® HM5 Hematology Analyzer (Abaxis) siguiendo las recomendaciones de análisis sugeridas por el fabricante.

La disminución significativa en la cantidad de los PMNs en la sangre de los ratones depletados, se evaluó mediante el análisis de los resultados hematológicos para cada grupo fue calculado el promedio e intervalos de confianza (IC) 95% en términos de N° de células $\times 10^9/L$. Se realizó una comparación estadística por medio de una distribución de t de Student. Para esta validación, los análisis estadísticos se realizaron en el programa InfoStat (versión 2017.1.2) y se admitió un nivel de significancia estadística con valores de $p < 0,05$ y $p < 0,01$.

2.8 Citometría de flujo

Para evaluar la cantidad de PMNs en la sangre total de forma más específica en los ratones sometidos a la depleción, se realizó una cuantificación de estas células por la técnica de citometría de flujo (guava easyCyte™, Merk-Millipore™). Para esto, los PMNs se marcaron con el anticuerpo monoclonal específico para PMNs FITC (5/6 isotiocianato de fluoresceína) (Thermo Scientific™) anti-Ly6G (RB6-8C5) (Invitrogen, ThermoScientific), siguiendo las recomendaciones del fabricante (Barquero-Calvo et al., 2013). Brevemente, se realizó una lisis de los eritrocitos utilizando la solución BD FACS Lysing Buffer (BD Biosciences); posteriormente, se centrifugó (mini Spin plus, Eppendorf) la muestra a 200 rpm durante 5 minutos a $-4^{\circ}C$. Los leucocitos restantes se colorearon con el anticuerpo PE anti-Ly6G (RB6-8C5) por 10 minutos en oscuridad. La población de PMNs se seleccionó en un diagrama de dispersión frontal vs. lateral (Forward vs. Side Scatter) de acuerdo con sus características celulares. El análisis de las poblaciones de interés se realizó mediante el paquete informático para citometría programa FlowJo (versión 10.1).

2.9 Cuantificación de leucocitos totales en sangre

Previo a realizar los ensayos *in vitro* con sangre completa de humano y ratón con células vegetativas de *C. difficile*, se realizó un recuento total de leucocitos en cámara de Neubauer de $1/10 \text{ mm}^2$ (Boeco, Germany). Esto se realizó para poder establecer más adelante el índice de multiplicidad de infección (MOI, por sus siglas en inglés). Para el conteo de leucocitos se utilizó el reactivo de Turk (Sigma-Aldrich™), utilizando una dilución 1:20.

Subsecuentemente, se aplicaron las fórmulas descritas por Doig y Thompson (Doig & Thompson, 2017). Para realizar el recuento diferencial de leucocitos se hicieron frotis sanguíneos teñidos con coloración de Wright (Prelab). Se tomaron fotografías de las células sanguíneas con ayuda de un microscopio óptico con cámara fotográfica digital incorporada (Modelo 4H08758, OLIMPUS, Tokio, Japón) y se midió el largo y ancho de la célula con analizador de imágenes (Modelo yw2310, Kernel Version).

2.10 Ensayo *in vitro* de fagocitosis con PMNs

El ensayo de fagocitosis *in vitro* se realizó utilizando una concentración de leucocitos PMNs de $\sim 5 \times 10^6$ Leu/mL (Ver apartado 2.6). Asimismo, se preparó el inóculo de *C. difficile* (cepa VPI 10463) en tubos cónicos de 50 mL (Fisherbrand, Fisher Scientific®) bajo las condiciones de crecimiento previamente descritas (Ver apartado 2.3) hasta alcanzar una concentración entre 3×10^6 y 5×10^7 UFC/mL. Los tubos fueron centrifugados (centrifuge 5804R, eppendorf) a 5000 rpm por 10 minutos. El pellet de células obtenido fue re-suspendido con 140 μ L de solución de Fosfato-Bufferado-Salino (PBS, por sus siglas en inglés) (Cell culture, gibco). Una vez obtenida la suspensión de bacterias y calculada la concentración de esta, se estableció el índice de MOI a utilizar con proporciones de 1:5 y 1:10.

El ensayo de fagocitosis *in vitro* se realizó con 500 μ L de sangre (humana o de ratón) (Ver apartado 2.1) utilizando un MOI de 1:5 y 1:10 (Leu:Clostridio). Las células bacterianas se añadieron a partir de la suspensión obtenida en una placa de 24 multipocillos para cultivo celular (Celltreat®) de acuerdo con el MOI calculado. La sangre con las bacterias se incubó por 30 minutos y 60 minutos a 37 °C en una incubadora con agitación constante de 100 rpm (Model IN-666, Gemmyco). A cada tiempo se tomaron 5 μ L para hacer un frotis en portaobjetos de vidrio y se tiñeron con la tinción de Wright (Prelab). Posteriormente, las muestras se analizaron por microscopía de luz (BX43, OLIMPUS, Tokio, Japón). El porcentaje de fagocitosis se estimó como el número de células de *C. difficile* por PMN, contando como mínimo 20 PMNs en diferentes campos de microscopio. La capacidad de fagocitosis de los PMNs se determinó de acuerdo a una escala con cuatro categorías: Categoría 1= 0 clostridios/PMN, categoría 2= 1-5 clostridios/PMN, categoría 3= 6-10 clostridios/PMN, y categoría 4= >10 clostridios/PMN. Estos recuentos se realizaron por triplicado en tiempos diferentes.

2.11 Ensayo *in vitro* con depleción de plaquetas

Para evaluar el papel de las plaquetas en los ensayos de fagocitosis con PMNs *in vitro*, se realizó un protocolo de depleción de plaquetas en sangre siguiendo la metodología descrita por Rucavado y colaboradores (Rucavado et al., 2001). El procedimiento consistió en la administraron de 200 μ L (80 μ g) de aspercetina purificada (a partir de veneno de la serpiente

Bothrops asper) por vía intraperitoneal a los ratones 24 h previas a colectar la sangre (Ver apartado 2.5) y siguiendo las consideraciones bioéticas (Ver apartado 2.1). Posteriormente, se siguió la misma metodología (Ver apartado 2.9) para realizar el ensayo *in vitro* con sangre de ratón. La aspercetina fue suministrada por el Instituto Clodomiro Picado de la Universidad de Cota Rica.

2.12 Biomodelo de Inflamación

2.12.1 Diseño experimental

Para medir el potencial patogénico de las toxinas de las diferentes cepas utilizadas se realizó el modelo de asa ligada ileal en cien ratones *Swiss* machos de la cepa Hsd:ICR (Pawlowski et al., 2010). Brevemente, se utilizaron ratones depletados y ratones no depletados en un modelaje experimental por bloques en el que se inoculó en las asas ileales 300 μ L (1 μ g / μ L) de la toxina de interés (Ver cuadro II) para determinar la respuesta inflamatoria provocada, caracterizar el daño en el epitelio intestinal y migración y desgranulación de PMNs. Realizando uso de la ecuación recursiva, se realizó experimentación y tratamientos con diez grupos experimentales compuestos por diez animales por cada grupo. Los grupos experimentales que se usaron en el biomodelo que fueron expuestos de acuerdo al tipo de toxinas de las cepas de *C. difficile* de la siguiente manera:

Cuadro II. Esquema de los biomodelos experimentales de acuerdo a la cepa de *C. difficile*, tipo de toxina, concentración de toxina, tratamiento aplicado al murino y la cantidad de animales utilizado por tratamiento.

Cepa ^a	Toxina ^b	[CA] ^c	T	N° de animales
<i>C. difficile</i> _{VPI10463/003}	TcdA _{VPI10463}	1.0 μ g/ μ l	ND	10
	TcdA _{VPI10463}	1.0 μ g/ μ l	D	10
<i>C. difficile</i> _{NAP1/027}	TcdB _{NAP1/027}	1.0 μ g/ μ l	ND	10
	TcdB _{NAP1/027}	1.0 μ g/ μ l	D	10
<i>C. difficile</i> _{NAP1/019}	TcdB _{NAP1/019}	1.0 μ g/ μ l	ND	10
	TcdB _{NAP1/019}	1.0 μ g/ μ l	D	10

<i>C. difficile</i> _{VPI10463/003} + <i>C. difficile</i> _{NAPI/027}	TcdA _{VPI10463+} TcdB _{NAPI/027}	1.0 µg/µl- 1.0 µg/µl	ND	10
	TcdA _{VPI10463+} TcdB _{NAPI/027}	1.0 µg/µl- 1.0 µg/µl	D	10
N/A	PBS	1.0 µg/µl	ND	10
N/A	PBS	1.0 µg/µl	D	9

^aNA= No aplica.

^bPBS= Solución de Fosfato-Buferado-Salino.

^c[CA]= Concentración aplicada.

^dND= No depletado. D= Depletado.

2.12.2 Modelo de asa ligada de intestino en Swiss

Para el ensayo de asa ligada se utilizó anestesia profunda con una mezcla de ketamina (60 mg/kg de peso corporal) (Bremer Pharma, GMBH) y xilazina (5 mg/kg de peso corporal) (alfasan, Woerden-Holland) administrado por vía intraperitoneal. Subsecuentemente, realizó una laparatomía medial en cada ratón ligándose con hilo quirúrgico de ácido poliglicólico USP 3-0 (Atramat®) y en una sección de aproximadamente 4-6 cm de íleo se inoculó 0,3 mL de toxina purificada o PBS dependiendo el caso. Para la realización del experimento de asa ligada se contó con un periodo de ayuno de 24 horas con libre acceso de agua.

Luego de inoculados, el abdomen se suturó con el mismo material mencionado. Se permitió un tiempo de vigilia, analgesia y recobro de conciencia completa al animal. Después de un período de 4 horas a cada animal se aplicó eutanasia por dislocación cervical y el asa intestinal fue removida. Brevemente, se procedió a dividir el asa en tres porciones, la primera porción fue homogenizada en formalina amortiguada al 10% (GAMMA®) para los análisis histopatológicos. Seguidamente, las dos porciones restantes fueron homogenizadas en amortiguador de bromuro de hexadecil-trimetil-amonio (HTAB) (Sigma-Aldrich™) con un coctel de inhibidores de proteasas (Roche®) y congelada a -80°C para la determinación de la actividad mieloperoxidasa (MPO) y para cuantificación de citoquinas, respectivamente.

2.12.3 Histología de las asas intestinales

Las asas intestinales fijadas en formalina amortiguada al 10% (GAMMA®) se enviaron al Laboratorio de Patología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Costa Rica para los análisis histopatológicos. Brevemente, las asas fueron embebidas en parafina para obtener cortes finos. Subsecuentemente, fueron teñidas con hematoxilina-eosina (abcam®) siguiendo los protocolos convencionales. Para cada intestino se midieron varios parámetros para indicar los grados de severidad del daño generado por las

toxinas, entre ellos integridad epitelial, inflamación de lámina propia (LH) y submucosa (SM). Para cada uno de estos parámetros se utilizó una escala histopatológica de 0 (ausencia total de alteraciones con respecto a los controles) a 4 (daño severo) (Carter et al., 2015).

Para el análisis de los resultados se determinó la mediana de cada parámetro y se agruparon los datos para determinar el nivel de daño epitelial. Además, se realizó un análisis estadístico mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguido por un test de Dunn.

2.12.4 Determinación de la actividad mieloperoxidasa (MPO)

La migración y desgranulación de neutrófilos en el tejido intestinal se estimó mediante la medición de la actividad MPO (de Araújo Junqueira et al., 2011). Brevemente, por cada 56 mg de tejido congelado, se homogenizó en amortiguador HTAB (Sigma-Aldrich™) (PBS, HTAB al 50% p/v y H₂O₂ al 0,1% v/v). Este homogenizado fue centrifugado a 5 000 rpm por un período de 5 min a 4 °C y luego de tomaron 20 µL del sobrenadante para ser mezclados con 200 µL de disolución de *o*-dianisidina al 0,017% (Sigma-Aldrich™) y determinar el cambio de absorbancia a 450 nm durante los tiempos 0, 1 y 2 minutos.

El cambio en la absorbancia a través del tiempo está asociado con la actividad enzimática de la MPO. Para cada grupo fue calculado el promedio ± el error estándar en términos de MPO/mg de tejido intestinal. Se realizó una comparación estadística por medio de un análisis de varianzas de una vía (ANOVA) con una prueba *post hoc* de Bonferroni.

2.12.5 Cuantificación de citoquinas proinflamatorias

Del asa intestinal ligada se midieron las concentraciones de las interleucinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, CXCL-1 e IL-10 en el tejido intestinal según ha sido descrito previamente (Cavalcante et al., 2006) y siguiendo las recomendaciones del fabricante de los kits comerciales de ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) (eBioscience®). Para cada una de las citoquinas se obtuvo la cantidad en ng/mg de tejido intestinal para cada grupo experimental.

Para la cuantificación de citoquinas proinflamatorias, los grupos fueron comparados con un ANOVA de una vía y una prueba *post hoc* de Bonferroni para determinar diferencias en la capacidad para inducir la secreción de citoquinas proinflamatorias, inflamatorias y anti-inflamatorias en el intestino.

2.13 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos de los ensayos *in vitro* (Ver apartados 2.7, 2.8 2.9 y 2.10). Para el biomodelo de inflamación (Ver apartado 2.12) se utilizó el programa Prism 9 para macOS (versión 9.0.1 [128] y se admitió un nivel de significancia estadística con valores de $p < 0,05$ y $p < 0,01$.

3. RESULTADOS

3.1 El tratamiento sistémico de depleción con GR-1 induce la disminución significativa de los PMNs en sangre periférica, en lámina propia y submucosa intestinal.

Para validar el funcionamiento del anticuerpo GR-1 en el modelo de depleción de los PMNs en ratones de la cepa CD-1, se realizaron ensayos utilizando ratones inoculados con PBS (n=10) como control negativo o inoculados con el anticuerpo monoclonal GR-1 (n=10). Se evaluó sí a las 24 horas posteriores de la inyección intraperitoneal indujo una disminución estadísticamente significativa de PMNs en sangre periférica y en lámina propia y submucosa intestinal.

Para cuantificar la cantidad de PMNs en sangre se realizó inicialmente un hemograma completo (Ver cuadro III) y posteriormente se realizaron análisis por citometría de flujo con un marcador de fluorescencia específicos para PMNs. Según los resultados hematológicos, GR-1 indujo una disminución estadísticamente significativa de PMNs ($p < 0,05$) (Cuadro III). Adicionalmente, se determinó que la depleción de PMNs no afectó los otros parámetros hematológicos evaluados, ya que no se observó que GR-1 indujera alguna alteración que fuera estadísticamente significativa comparado con el grupo control ($p > 0,05$).

Cuadro III. Comparación de parámetros hematológicos entre grupos experimentales de ratones control (PBS) y ratones depletados (anticuerpo monoclonal anti-ratón Ly6G/Ly6C [GR-1+ PBS]).

Parámetro hematológico ^a	U ^b	PBS + [GR-1] ^c		PBS		Valor <i>p</i>
		X	IC 95%	X	IC 95%	
LEU	10 ⁹ /l	5,77	[3,03 - 8,52]	7,95	[7,13 - 8,77]	0,0680
LIN	10 ⁹ /l	5,57	[2,97 - 8,16]	7,40	[6,58 - 8,21]	0,0985
MON	10 ⁹ /l	0,09	[-0,01 - 0,19]	0,13	[0,00 - 0,27]	0,5350
NEU	10 ⁹ /l	0,12	[0,03 - 0,20]	0,42	[0,15 - 0,69]	<u>0,0169</u>
HEM	10 ¹² /l	9,97	[8,16 - 11,78]	10,02	[9,78 - 10,26]	0,9366
Hb	g/dl	14,70	[11,76 - 17,64]	15,30	[14,75 - 15,85]	0,5930

^aLEU= Leucocitos. LIN= Linfocitos. MON= Monocitos. NEU= Neutrófilos. HEM= Modelo de equilibrio homogéneo. Hb= Hemoglobina.

^bU= Unidades. l= Litros. g/dl= Gramos/decilitros.

^cPBS+[GR-1]= Solución de Fosfato-Bufferado-Salino + anticuerpo monoclonal anti-ratón Ly6G/Ly6C. X= Promedio. IC= Intervalo de confianza.

Para corroborar los datos de depleción de PMNs obtenidos con el análisis hematológico, se realizó un análisis de citometría de flujo para cuantificar los PMNs marcándose con el anticuerpo monoclonal específico para PMNs FITC (5/6 isotiocianato de fluoresceína anti-Ly6G (RB6-8C5). La población de PMNs se seleccionó y se cuantificó en un diagrama de dispersión frontal vs. lateral (Unidades de fluorescencia relativa vs intensidad de luz verde). Se determinó que los ratones control (PBS) tenían un 10,3% de PMNs, mientras que el grupo depletado un 0,38% (Figura 1A). Este análisis permitió confirmar la disminución significativa de PMNs observada en el análisis hematológico y validez del método de depleción en ratones *Swiss*.

Subsecuentemente, se examinaron histológicamente las asas intestinales de veinte ratones para evaluar si el modelo sistémico de depleción que se validó en sangre periférica, era capaz de inducir la reducción de PMNs a nivel lámina propia y submucosa intestinal. Para esto, se cuantificó el número de PMNs presentes en estos tejidos en ratones depletados (GR-1+TcdA) o ratones no depletados (PBS).

En la Figura 1C, se observa una diferencia significativa $p < 0,01$ entre ambos grupos experimentales. En la figura 1B, se observa la presencia abundante de PMNs (no-depletado) (flechas amarillas), mientras (depletado) (flechas amarillas), se observa una disminución de la presencia de estas células. En ninguno de los dos casos se observaron alteraciones histológicas producto del tratamiento con PBS o el anticuerpo GR-1.

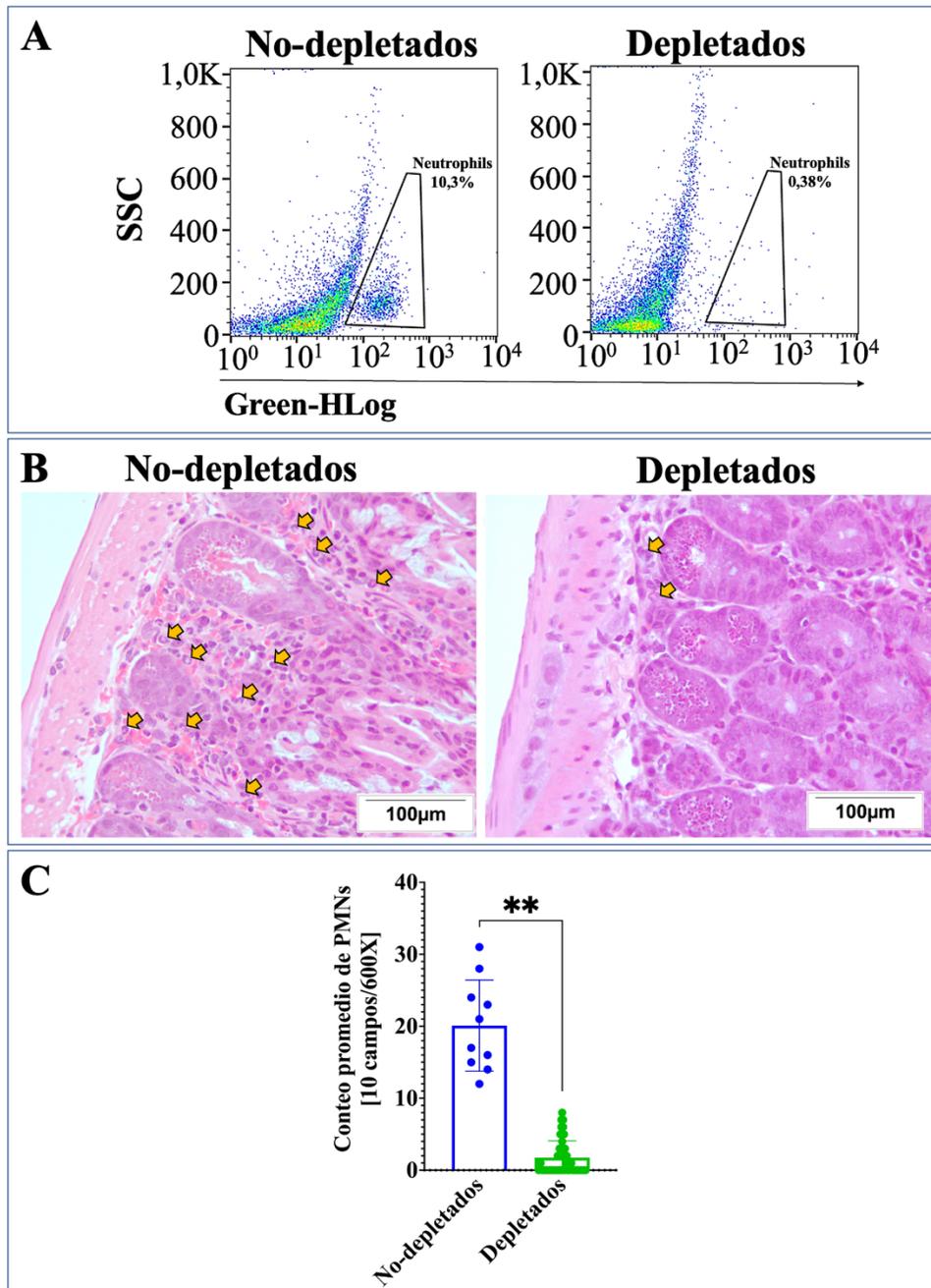


Figura 1. Evaluación de la depleción de PMNs en sangre periférica y lámina propia y submucosa intestinal. La depleción de PMN se realizó tratando los ratones con 100 µg de anticuerpo Ly6G/Ly6C (GR-1) (depletado) o PBS (no-depletado) durante 24 h. La depleción de PMN se evaluó en: (A) sangre periférica mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpo FITC anti-Ly6G (RB6-8C5); y en (B-C), lámina propia y submucosa cuantificando PMNs (flechas amarillas) en secciones de tejido de las asas ileales ligadas teñidas con hematoxilina-eosina (H&E) (40X). Los resultados se expresan como la media del recuento de PMN por campo de visión del microscopio \pm desviación estándar (DE). Se compararon los grupos de ratones no-depletados y depletados. Se muestran los valores de P, $p < 0,01$ (**).

3.2 Estandarización de una curva de crecimiento de *Clostridioides difficile* para determinar la concentración de bacterias/mL.

Para realizar los ensayos de fagocitosis de PMNs con sangre periférica de humano o ratón, se requirió la estandarización de un inóculo de bacterias para poder establecer una multiplicidad de infección específica. Para esto se realizó una curva de crecimiento donde se midió densidad óptica y las unidades formadoras de colonias (UFC) a través del tiempo. La curva de crecimiento estandarizada fue adaptada y modificada. Se eligió el tiempo de crecimiento de 6 h debido a que durante este tiempo se observó la mayor tasa de velocidad de crecimiento de la bacteria según la ecuación calculada sobre la D.O. y UFC/mL-1.

Se obtuvieron las lecturas a lo largo del tiempo 0, 3, 4, 5 y 6 horas de la OD (indicadas por puntos color rojo) y las UFC (indicadas por puntos color negro) (Figura 2). Ambas curvas mostraron un coeficiente de correlación cercano a 1. Indicando correspondencia entre ambas variables y permitiendo definir una buena ecuación que representa el comportamiento de los datos.

Las tasas de crecimiento se distribuyeron normalmente en el medio de cultivo. En los análisis de regresión lineal, la ecuación de la D.O. fue $Y = 0.0013477X + 0.02666$ con $R^2 = 0.9875$, y la ecuación de UFC/mL-1 fue $Y = 909508X + 18739676$ con $R^2 = 0.9458$. Todos los residuos del modelo de regresión probit con ecuación de crecimiento logístico para medir la actividad del crecimiento de la bacteria se distribuyeron normalmente, lo que indica un ajuste adecuado del modelo ejecutado.

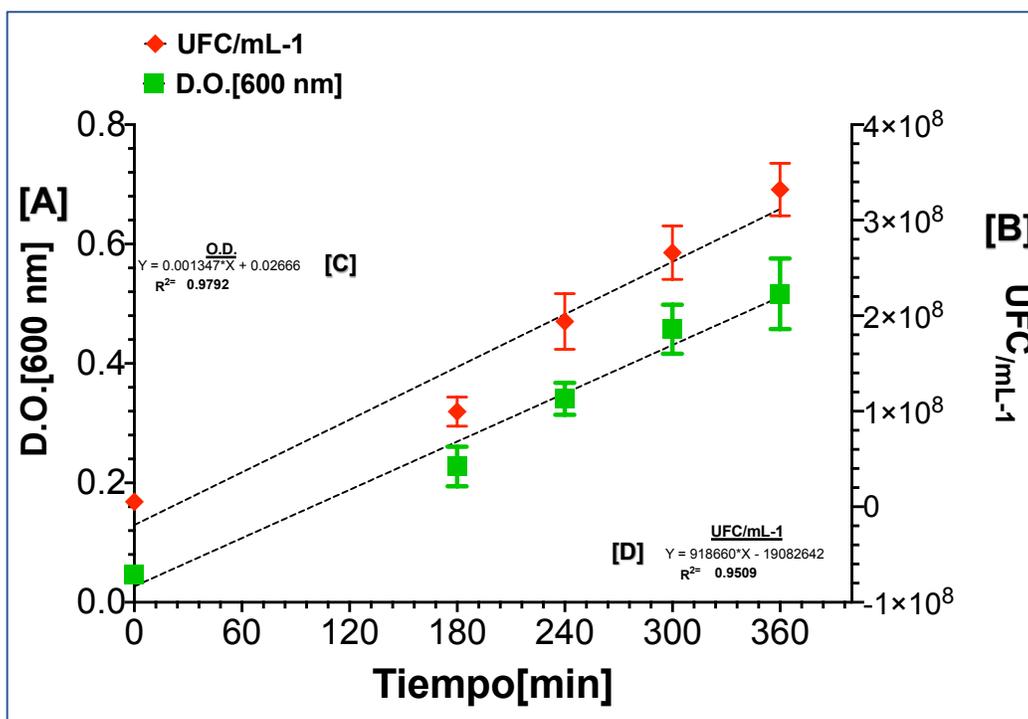


Figura 2. Curva de crecimiento modificada y cuantificación de la dinámica de multiplicación a las 0, 3, 4, 5 y 6 h de la cepa VPI10463/003 de

Clostridioides difficile. (A) La densidad óptica (D.O. 600 nm) y (B) la concentración de bacterias correspondiente en valores absolutos (UFC/mL-1) se presentaron en función del tiempo durante cada hora de incubación de crecimiento exponencial ejecutándose tres replicas por separado y en tiempos diferentes. Asimismo, se utilizó una ecuación lineal de regresión probit con ecuación de crecimiento logístico para medir la actividad del crecimiento de la bacteria; (C) la ecuación de la D.O. fue $Y = 0.001347 * X + 0.03666$ con $R^2 = 0.979275$, y (D) la ecuación de UFC/mL-1 fue $Y = 918660 * X + 19082642$ con $R^2 = 0.9509$. Los resultados son presentados con las barras de error como la media \pm desviación estándar (DE).

3.3 La capacidad fagocítica de los PMNs de ratón contra *C. difficile* es mayor que la de los PMNs humanos.

Después de 30 minutos de incubación en el ensayo de fagocitosis, se determinó el porcentaje de infección entre *C. difficile* y los PMNs (Ver apartado 2.10). El porcentaje de infección fue aumentando a medida que aumentó la multiplicidad de infección (MOI) de MOI5 a MOI10. En el caso de los ratones, se observaron porcentajes de infección mayores (>10 bacterias/PMN) por campo a partir de intervalos de tiempo entre 0,5 a 1 h, siendo estos niveles mayores comparados con los porcentajes de infección de PMNs humanos (Figura 3A). Se utilizó una escala de categorías de número de bacterias por célula de 1 a 4.

La cuantificación del porcentaje de infección se realizó a partir de frotis de sangre teñidas con la tinción de Wright. Lo primero que se observó es que los PMNs de humanos y ratones, a pesar de ser el mismo tipo de célula sanguínea, tienen algunas diferencias morfológicas y de coloración particulares (Figuras 3B y 3C, respectivamente). Respecto a sus características fagocíticas, tal como se cuantificó en la Figura 3A, los PMNs de ratones fueron más eficientes que los PMNs de humanos en asociarse con los clostridios (Figura 3D y 3E) con un porcentaje de infección de 15,0% (C2, MOI10), mientras en ratones fue de 17,07% (C2, MOI10), 17,07% (C3, MOI10) y 46,37% (C4, MOI10) (Figura 3A). Adicionalmente, se observó un proceso caracterizado por formación de abundantes grumos de plaquetas en los ensayos *in vitro* con sangre de ratón (Figura 3G); en contraste, este fenómeno no se observó en la sangre de humano.

Debido al fenómeno anterior, se realizó otro ensayo utilizando sangre de ratón al cual se había tratado previamente con la toxina aspercetina para disminuir la concentración de plaquetas circulantes. Cuando se utilizó esta sangre baja en plaquetas se redujo el número de plaquetas con respecto a los valores del control de $1.1 \cdot 10^6 \pm 1.1 \cdot 10^5$ células/mL a valores de $2.0 \cdot 10^5 \pm 5.5 \cdot 10^4$ células/mL permaneciendo a niveles muy bajos incluso después de 18 h. El porcentaje de asociación entre la bacteria y los PMNs aumentó aún más, tanto en MOI5 como MOI10 con porcentajes de 67,74% (C4, MOI5) y 82,61% (C4, MOI10). La depleción parcial de plaquetas con aspercetina favoreció la capacidad de fagocitosis de los PMNs de ratón en casi un 37,0%.

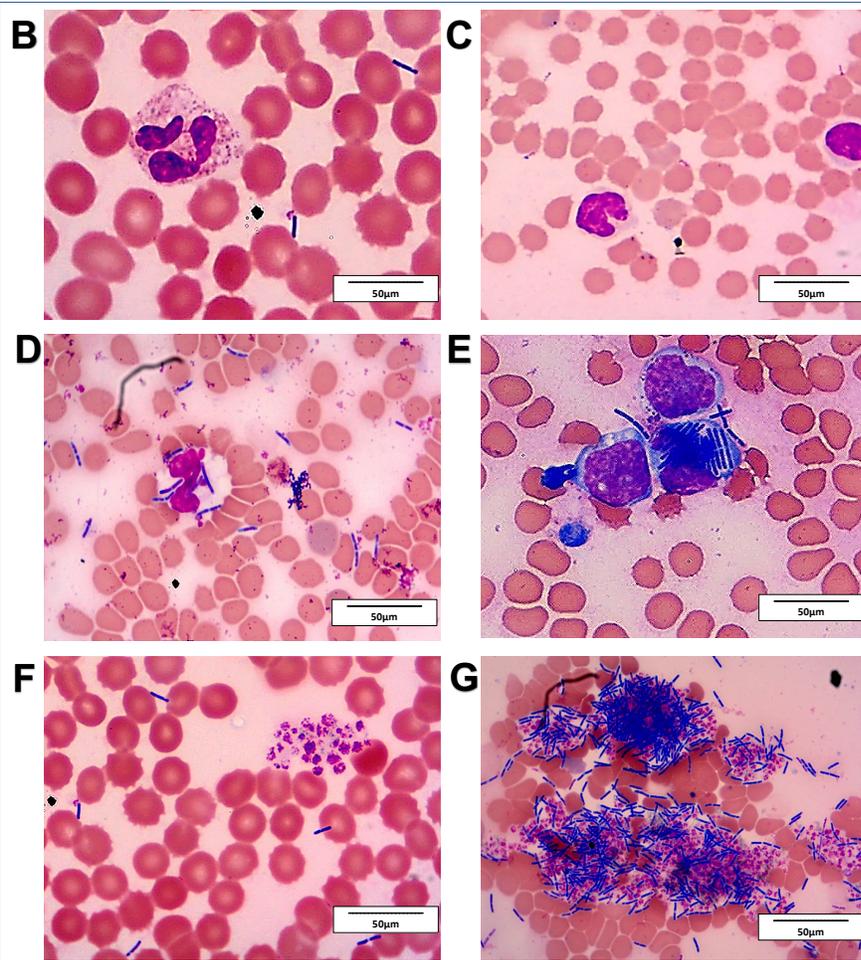
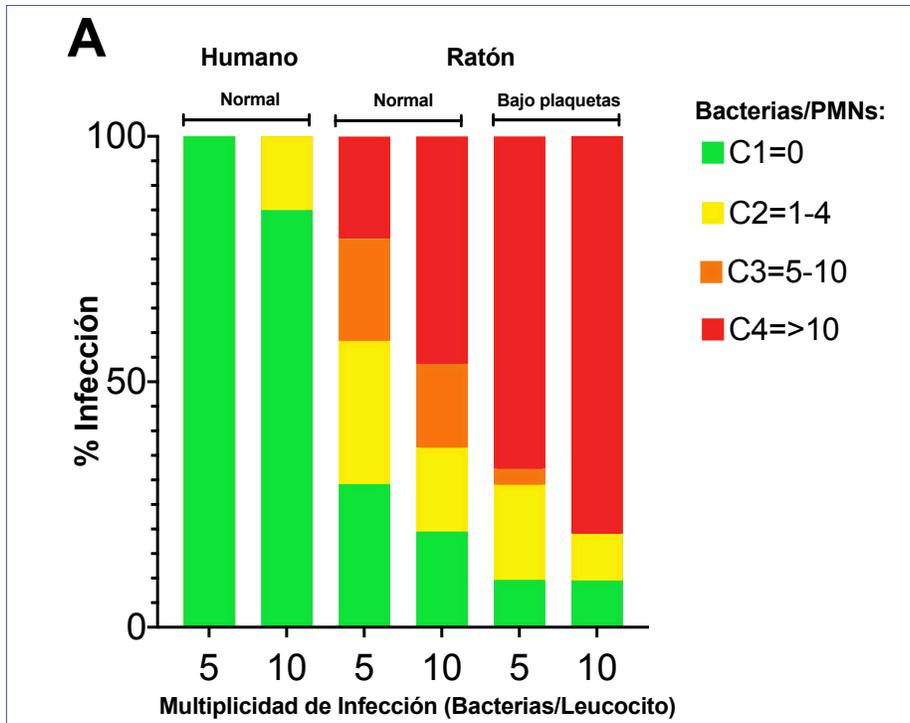


Figura 3. Evaluación de la capacidad fagocítica de los PMNs. (A) La sangre completa se trató con células vegetativas de *C. difficile* cepa VPI10463 por treinta minutos y una hora y se incubó posteriormente a 37°C en agitación para determinar la capacidad fagocítica de los PMNs. Se realizó recuento de 20 PMNs por MOI por tiempo. El porcentaje de infección corresponde a la cantidad de PMNs que fagocitaron al menos un bacilo de *C. difficile*. La imágenes inferiores son representativas de lo que se observó en el microscopio óptico durante los ensayos *in vitro*. (B) representa la morfología celular de los PMNs de humanos; y, (C), representa la morfología celular de los PMNs de ratones. (D) representa la baja capacidad fagocítica de los PMNs de humanos; mientras, € , representa la elevada capacidad fagocítica de los PMNs de ratón. (F) representa la baja actividad plaquetaria en humanos; en contraste, (G) representa la elevada actividad plaquetaria en la sangre del ratón.

3.4 La depleción de PMNs generó una disminución en los parámetros de daño histopatológico inducidos por las toxinas de *Clostridioides difficile*.

En el análisis histopatológico del intestino delgado e íleo, la toxina TcdAVPI10463 fue la principal responsable en inducir el mayor daño histopatológico (Figura 4A, 4B y 5), seguido de la combinación de toxinas de TcdAVPI10463+TcdBNAP1 (Figuras 4E, 4F y 5). Particularmente, TcdAVPI10463 alteró la integridad epitelial (Figura 5A) e inflamación en lamina propia (LH) (Figura 5B) y submucosa (SM) (Figura 5C) con reclutamiento de PMNs (Figura 4A y 4B). Asimismo, en los ratones tratados con TcdAVPI10463 y depletados de PMNs se observó la mayor disminución en escala de daño histopatológico en comparación con los grupos control de ratones no depletados ($P < 0,01$) (Figuras 5A, 5B y 5C).

Respecto a TcdBNAP1, esta toxina no indujo alteración en la integridad epitelial (Figura 5A), aunque si una respuesta inflamatoria a nivel de LH (Figura 5B) y SM (Figura 5C). La depleción de PMNs generó en la mayoría de los casos una disminución significativa en la escala de daño histopatológico respecto al grupo control de ratones no-depletados ($p < 0,01$). Por otra parte, la toxina TcdBVNAP1 indujo un daño histopatológico y respuesta inflamatoria SM similar al purificado de TcdBNAP1 (Figura 5C). Sin embargo, TcdBVNAP1 indujo una mayor actividad inflamatoria LH que TcdBNAP1 (Figura 5B).

Tanto en TcdAVPI10463 como en TcdBNAP1/027 y TcdBVNAP1, se observa que la depleción de PMNs produjo una disminución en la escala del daño histopatológico posterior al tratamiento con las toxinas utilizadas (Figuras 4 y 5).

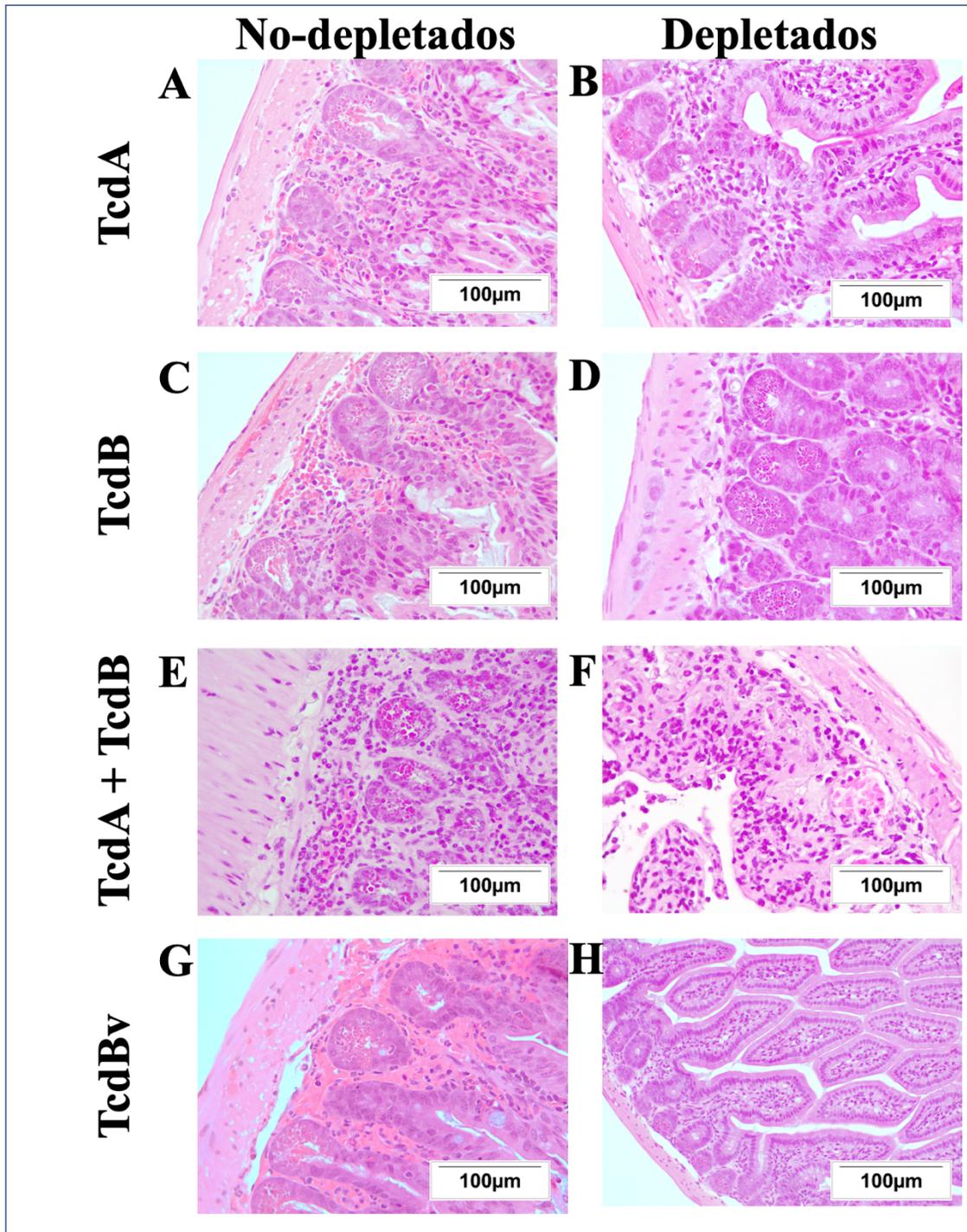


Figura 4. Imágenes histopatológicas de tejidos con las asas ileales ligadas de ratones tratados con las toxinas TcdA_{VPI110463}, TcdB_{NAP1/027}, TcdB_{VNAP1/019} o combinaciones de TcdA+TcdB en ratones no-depletados y depletados. Los tejidos se fijaron con formalina al 10 % y se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E) para el análisis histopatológico. Las fotografías (aumento 40X) muestran las alteraciones histopatológicas y las infiltraciones de neutrófilos inducidas por cada tratamiento con toxina en el grupo no-depletado (A, C, E y G) y en el grupo depletado (B, D, F y H).

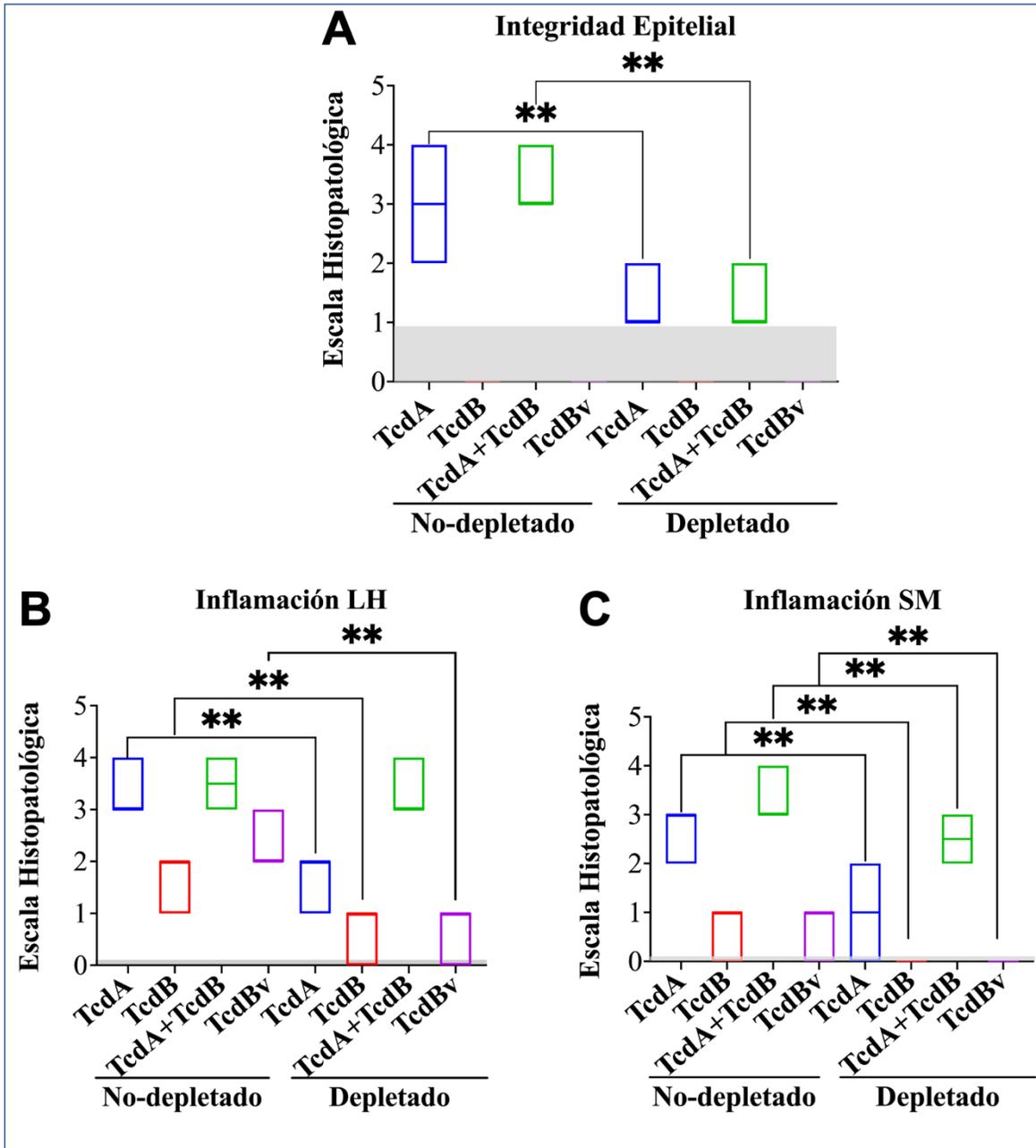


Figura 5. Cuantificación de las alteraciones histopatológicas observadas en tejidos de las asas ileales ligadas tratadas con toxinas de *Clostridioides difficile* en ratones no-depletados y depletados. Los tejidos fijados y teñidos con hematoxilina-eosina (H&E) se analizaron utilizando una escala histopatológica para clasificar las alteraciones y daños epiteliales de 1 (leve) a 4 (severo). Los parámetros histopatológicos evaluados fueron (A) daño epitelial, (B) inflamación de la lámina propia y (C) inflamación de la submucosa. La barra sombreada representa el valor promedio obtenido para los controles (PBS). Los resultados se expresan como la mediana \pm los valores extremos. Se compararon

los grupos de ratones no-depletados y depletados. Se muestran los valores de P, $p < 0,01$ (**).

3.5 TcdA_{VPI10463} indujo la mayor respuesta proinflamatoria, inflamatoria y antiinflamatoria en ambos grupos experimentales.

Para evaluar y caracterizar el proceso proinflamatorio agudo ocasionado por las toxinas de *C. difficile*, se cuantificaron las citoquinas CXCL-1 para evaluar reclutamiento de PMNs, y TNF- α , IL-1 β e IL-6 como citoquinas proinflamatorias. Como citoquina antiinflamatoria se cuantificó la citoquina IL-10. TcdA_{VPI10463} indujo la mayor producción citoquinas. La producción de citoquinas inducida por esta toxina se disminuyó significativamente en los grupos experimentales depletados ($p < 0,01$) (Figura 6). La combinación de TcdA_{VPI10463} +TcdB_{NAP1} indujeron un nivel menor de producción de citoquinas CXCL1, TNF- α , IL-10 e IL-1 β en comparación con TcdA_{VPI10463/003} por sí sola ($p < 0,01$) (Figura 6A, 6B, 6C y 6E, respectivamente).

Respecto a TcdB_{VNAP1}, se reportaron los niveles más elevados de TNF- α , pero similares a los niveles generados por TcdA_{VPI10463}. Al comparar los grupos control con los grupos depletados indujo diferencias significativas ($p < 0,01$) (Figura 6C).

Tanto en TcdA como en TcdB, se observa una disminución significativa en la producción de citoquinas proinflamatorias, inflamatorias y antiinflamatorias posterior al tratamiento con las toxinas utilizadas en ambos grupos experimentales (ratones depletados y no depletados) (Fig. 7).

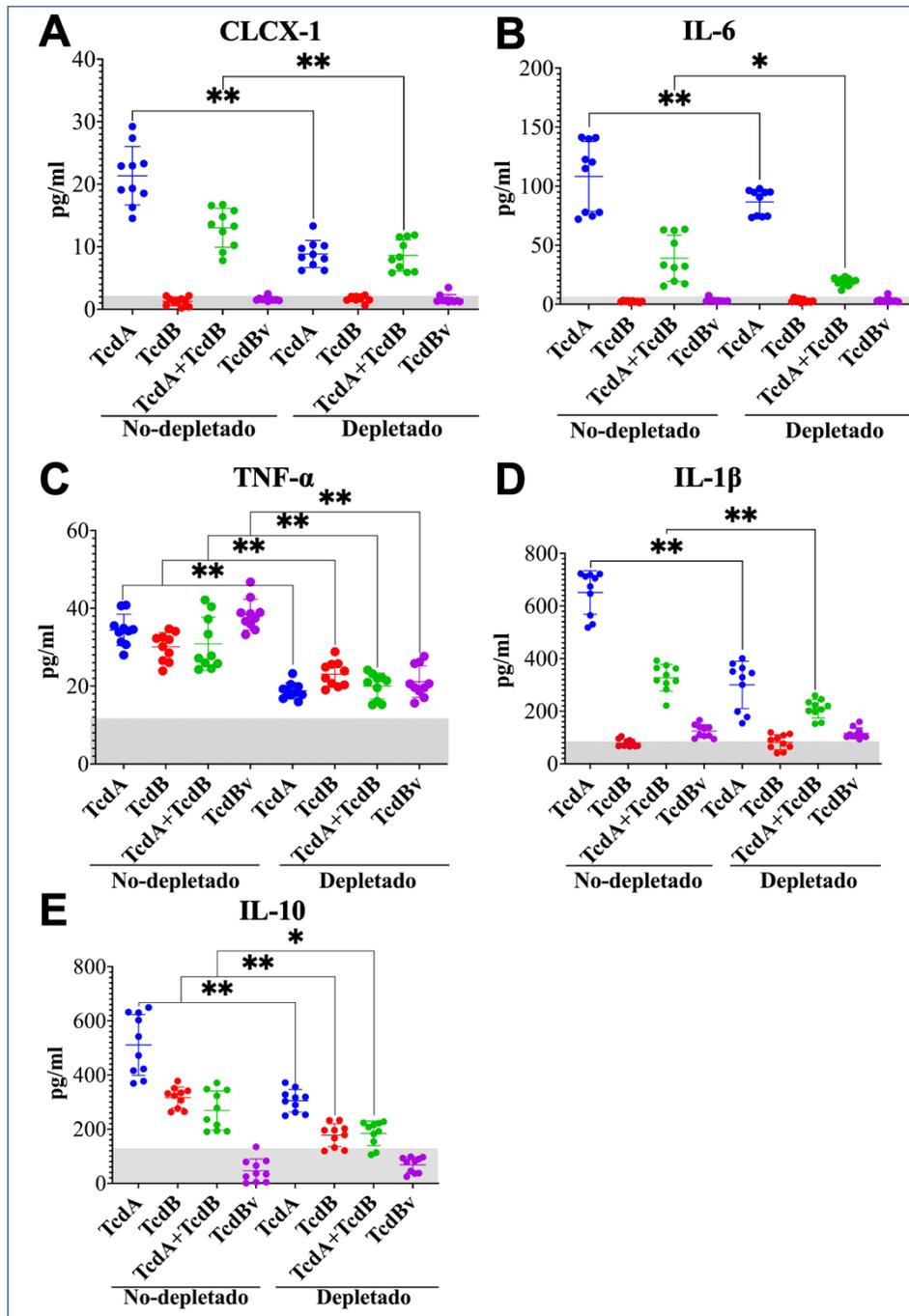


Figura 6. Cuantificación de CXCL-1, TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-10 en los tejidos de las asas ileales ligadas tratadas con toxinas de *Clostridioides difficile* en ratones no-depletados y depletados. La producción de (A) CLCX1, (B) IL-6, (C) TNF- α , (D) IL-1 β y (E) IL-10 cuantificadas mediante ELISA a partir de tejido del asa ileal ligada homogenizada en solución HTAB. Cada barra representa la media \pm desviación estándar (DE). La barra sombreada representa el valor promedio obtenido para los controles (PBS). Se compararon los grupos experimentales de ratones no-depletados y depletados. Se muestran los valores de P, $p < 0,05$ (*) y $p < 0,01$ (**).

3.6 La depleción de los PMNs disminuye la actividad mieloperoxidasa (MPO) inducida por la toxina TcdB_{NAPI}.

Para evaluar la actividad de los PMNs, se midió la actividad MPO como un indicador indirecto de migración y desgranulación neutrofílica. TcdB_{NAPI} indujo un incremento en la actividad MPO y una disminución de esta actividad en los ratones depletados de PMNs ($p < 0,01$) (Figura 7).

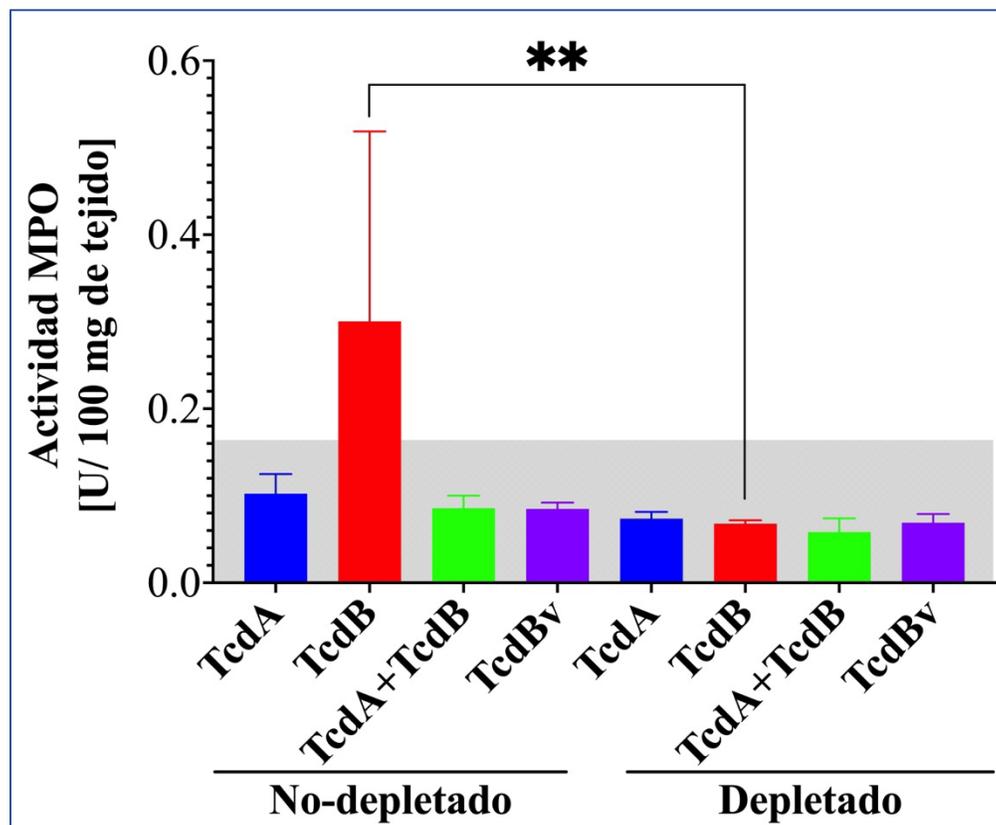


Figura 7. Cuantificación de la actividad de MPO en tejidos de las asas ileales ligadas tratadas con toxinas de *Clostridioides difficile* en ratones no-depletados y depletados. La actividad de MPO se midió mediante un método colorimétrico utilizando un lector ELISA. Los tejidos se homogenizaron en una solución de bromuro de hexadecil-trimetilamonio (HTAB) y el sobrenadante se mezcló con una solución de *o*-dianisidina. Se determinó el cambio de absorbancia a 450 nm (actividad MPO) después del 1 minuto. Los resultados se expresan como valores medios \pm desviación estándar (DE). La barra sombreada en gris representa los valores obtenidos para el grupo de control (PBS). Se compararon los grupos de ratones no-depletados y depletados. Se muestran los valores de P, $p < 0,01$ (**).

4. DISCUSIÓN

El uso de modelos *in vivo* como las asas intestinales ligadas de ratón, permiten estudiar las interacciones moleculares y la patogénesis ocasionada por *Clostridioides difficile* en el hospedero. Estos modelos ofrecen la posibilidad de evaluar experimentalmente cambios sistémicos o celulares a partir del tejido de la mucosa intestinal obtenida del animal tratado (Chen et al., 2008). Evaluando la respuesta inflamatoria exacerbada y el reclutamiento intensivo de leucocitos PMNs, el cual es un factor determinante en la severidad de la ICD (Poutanen, 2004). Ante la necesidad de mejorar el conocimiento sobre la contribución de los PMNs en la respuesta inflamatoria desencadenada por las toxinas de *C. difficile* en un ambiente fisiopatológico real, esta investigación evaluó el papel de los PMNs en la patología causada por *Clostridioides difficile* en el lumen intestinal. Se determinó el efecto en la respuesta inflamatoria (por la presencia de los PMNs) en la patogénesis causada por las toxinas A (TcdA) y B (TcdB) utilizando un biomodelo de AILM de ratones neutropénicos y no neutropénicos midiendo parámetros de respuesta proinflamatoria, indicadores de daño histopatológico y de migración y desgranulación de PMNs. Adicionalmente, se evaluó la capacidad de los PMNs de fagocitar y asociarse a los clostridios en un modelo *in vitro*.

Debido a que en los resultados de validación *in vitro* se determinó una disminución significativa de PMNs en sangre periférica (Cuadro III y Figura 1A). El modelo sistémico de depleción con RB6-8C5 también se llevó a cabo a nivel histopatológico demostrándose el efecto de la depleción a nivel histológico (Figura 1B y 1C). El análisis de tejido intestinal permitió excluir cualquiera de las limitaciones descritas en otros estudios con el modelo de depleción (Bao & Cao, 2011; Ostanin et al., 2012; Bansal et al., 2018). En ese sentido, este estudio constituiría el primer estudio *in vivo* utilizando un modelo de depleción de PMNs combinado con un biomodelo de AILM utilizando las toxinas TcdA, TcdB, TcdBv y combinaciones de *C. difficile*.

Simultáneamente, para el ensayo de fagocitosis *in vitro*, se cuantificó la cinética de multiplicación a partir de la curva de crecimiento modificada de la cepa VPI_{10463/003} de *C. difficile*, el crecimiento se correlacionó positivamente entre las UFC/mL y la O.D. (Figura 2); aunque, en estudios anteriores ya se ha correlacionado inversamente las tasas de crecimiento de *C. difficile*, especialmente cuando se utilizan cepas de *C. difficile* hipervirulentas/epidémicas o no hipervirulentas/epidémicas, incluso el crecimiento de la bacteria no sea podido correlacionar con la gravedad de la ICD, producción de toxinas, presencia de la delección del gen *tcdC*, toxina binaria, ribotipos o cepas específicas (Carlson et al., 2013); los autores hipotetizan que existe un factor sustancial alternativo que permite regular cambios en el metabolismo de los aislamientos del esporulado y este asigna de mejor manera los recursos a la producción de toxinas (Hundsberger et al., 1997; Carlson et al., 2013).

El procedimiento anterior, permitió evaluar las interacciones PMN:bacteria en la sangre completa de humano y ratón. Al evaluar la actividad fagocítica *in vitro* se observó que la capacidad fagocítica de los PMNs de ratón contra *C. difficile* fue más eficiente que la de los PMNs humanos (Figuras 3A, 3D y 3E). Una primera razón de estos resultados, podría ser el proceso evolutivo entre ambas especies (Mestas & Hughes, 2004). La evolución no sólo modificó la estructura y especificidad del ligando en los dominios TLR extracelulares sino también realizó cambios en los patrones de expresión celular. Las diferencias entre especies existen en activación y función de las moléculas efectoras liberadas por las células inmunitarias para controlar patógenos (Rehli, 2002; Zschaler et al., 2014). Segundo, la primera línea de defensa en los humanos es la familia de péptidos antimicrobianos denominado defensinas siendo los PMNs una rica fuente de estas (Ouellette & Selsted, 1996; Ganz, 2003). Sin embargo, los PMNs en ratones no expresan defensinas (Risso, 2000). Por el contrario, las células de Paneth, que están presentes en las criptas del intestino delgado de ratones, expresan >20 criptodinas, pero de estas, solo dos en humanos (HNP-5 y HNP-6) son expresadas (Mestas & Hughes, 2004; Zschaler et al., 2014).

Estas evidencias reflejan diferentes presiones evolutivas relacionadas con la exposición a microorganismos a través de la ingesta de alimentos y la especificidad por la presencia de los receptores celulares, lo que podría explicar la rápida respuesta de los leucocitos PMNs en el proceso de fagocitosis en ratones.

Adicionalmente, un hallazgo exclusivo de los ensayos en ratones fue la formación de abundantes grumos de plaquetas en los ensayos *in vitro* con sangre de ratón (Figura 3G). Este fenómeno no se observó con la sangre de humano (Figura 3F). Para tratar de entender este hallazgo, a un grupo de ratones se trató con aspercetina para inducir una depleción parcial de plaquetas. La disminución de la cantidad de plaquetas en sangre favoreció aún más el proceso de asociación (fagocitosis) de los PMNs frente a las bacterias ensayadas.

Se ha descrito que la depleción plaquetaria realizada por algunos patógenos microbianos [P. ej., el virus de la varicela Zóster y *Helicobacter pylori*, entre otros] ayuda a mejorar la infección mediante la estimulación colateral del sistema inmunitario (Semple et al., 2007, 2007; Kapur et al., 2015). Nuestros resultados sugieren que la depleción plaquetaria mejora el proceso fagocítico en *C. difficile*, el cual es un tema que debe seguirse investigando. A pesar de las limitaciones de este ensayo al utilizar un solo donador (los datos podrían variar con otros donadores). Los resultados obtenidos evidencian elementos importantes de la interacción entre el PMN-*C. difficile* en un modelo *in vitro*.

El biomodelo de AILM permitió caracterizar el efecto inducido por las toxinas de *C. difficile* en el íleo. Nuestro estudio demostró que las combinaciones de toxinas TcdA_{VPI10463}+TcdB_{NAP1} es responsable de inducir la mayor alteración en la mucosa intestinal, respuesta inflamatoria y exacerbada infiltración de PMNs (Figura 4 y 5A, B y C). En un estudio utilizando un modelo de instilación rectal murina con una mezcla de toxinas de TcdA y TcdB recombinante a partir de la cepa VPI10463, reportaron que esta combinación inducía

una inflamación aguda muy sutil a nivel histopatológico con resultados que no se incrementaban significativamente (como actividad de MPO) reportando datos inconclusos (Markham et al., 2021)

Los resultados con TcdA_{VPI1046}, indicaron que fue la toxina responsable de inducir alteración en la mucosa intestinal (Figuras 4 y 5). Nuestros resultados evidencian la capacidad de TcdA en provocar la entrada de PMNs, daño tisular extenso en un período de incubación corto, mismo proceso inflamatorio descrito en varios modelos de asa intestinal animal, cultivos celulares y ensayos *in vitro* (Lima et al., 1988; Lysterly et al., 1985a; Mitchell et al., 1986; Triadafilopoulos et al., 1987a). En ese sentido, la literatura citada muestra que TcdA inhibe la migración y proliferación de células epiteliales intestinales, que son importantes para el mantenimiento y reparación de la barrera epitelial (Brito et al., 2005).

Los resultados de la actividad biológica de las combinaciones de toxinas TcdA y TcdB en las asas ligadas de los ratones no depletados mostraron un comportamiento similar a TcdA tratada por separado en los animales. Posiblemente esta combinación de toxinas potencie la actividad biológica en el íleon de los ratones; Frädriich y colaboradores, describen la capacidad del sistema inmune reclutar no solamente neutrófilos, sino que otras células inmunitarias como los eosinófilos en el sitio de la infección por ICD. En contraste, existe la hipótesis que TcdA y TcdB tenían efectos sinérgicos basados en que TcdB no dañaría el intestino a menos que TcdA primero irrumpiera el epitelio intestinal (Zhang et al., 2017). En ese sentido, es sería posible aseverar cuánta es la concentración TcdA o de TcdB que la bacteria secreta en el colon cuando está causando ICD en un huésped, ya que fisiológicamente no ha sido posible cuantificarlo (Hirota et al., 2012). Sin embargo, existen estudios que han descrito que el sinergismo es dado inoculando ambas toxinas a la misma concentración; mientras que, por separado TcdB necesitaría el doble que TcdA (Lysterly et al., 1985b; Hirota et al., 2012).

Por su parte TcdB_{NAPI}, indujo respuestas inflamatorias LH y SM menores a las inducidas por TcdA_{VPI10463} (Figuras 4C y 5). Adicionalmente, es posible apreciar, que TcdB_{NAPI} fue capaz de activar y producir la infiltración de PMNs (Figuras 4C y 4D). Se ha descrito que TcdB no muestra una enterotoxicidad tan aguda en modelos de asa intestinal animal (Libby & Wilkins, 1982; Lysterly et al., 1985b; Mitchell et al., 1986; Lyras et al., 2009; Lönnroth & Lange, 2009, 2009); además, es considerada una toxina con mecanismos de muerte celular bimodal dependiendo de la concentración en el medio en el que se encuentra (Chumbler et al., 2016).

Sobre TcdB_{VNAPI}, los resultados histopatológicos (Fig. 4G, 4H y 5) fueron similares a los inducidos por TcdB_{NAPI} exceptuando la inflamación LH (Fig. 5B), donde TcdB_{VNAPI} mostró una mayor inflamación. Evidentemente, es posible apreciar la infiltración de PMNs (Fig. 4C y 4D). Estos resultados demuestran que TcdB_{VNAPI} y TcdB_{NAPI} no presentan una mayor actividad biológica en el intestino y reclutamiento de PMNs que TcdA_{VPI10463}. De hecho, un estudio desarrollado por López-Ureña y colaboradores, utilizando el biomodelo de

AILM, cultivos celulares y ensayos *in vitro* para comparar TcdB_{VPI} con sus TcdBs equivalentes de cepa NAP1 y NAP1v. Demostraron que la mayor diferencia entre las toxinas TcdBs de *C. difficile* se basa en la rapidez de ingresar a la célula diana en etapas más tempranas a la endocitosis y que TcdB_{NAP1} no es considerada más citotóxica que TcdB_{VNAP1} y TcdB_{VPI} (López-Ureña et al., 2016).

La aseveración anterior permite demostrar que TcdB_{NAP1} y TcdB_{VNAP1} utilizadas en esta investigación son equivalentes entre sí, esto evita cualquier tipo de cuestionamiento sobre el modelo de intoxicación aplicado para validar nuestros resultados. Asimismo, este sería considerado el primer estudio *in vivo* en generar datos sobre la actividad proinflamatoria, histopatológica y actividad mieloperoxidasa (MPO) en un modelo de depleción combinado con un biomodelo de asa intestinal ligada murina sobre la actividad biológica de la TcdB_{VNAP1} de *C. difficile*.

Estos datos permiten evidenciar que los PMNs, que están involucrados en la defensa del huésped, también pueden ser perjudiciales para un organismo cuando ocurre la desregulación, y en este caso contribuyen con el daño del tejido y la respuesta inflamatoria inducida por las toxinas. Este fenómeno se conoce como la paradoja de los PMNs (Pelletier et al., 2004; Pelletier & Girard, 2007; Goncalves et al., 2011). Conociendo la función de los PMNs en el proceso de inflamación comparados con los resultados de esta investigación, es posible concluir que en este modelo los PMNs promueven parte del proceso patológico que se observa en la infección causada por *C. difficile*.

Por otro lado, el biomodelo de AILM permitió cuantificar mediante la medición de citoquinas, la respuesta proinflamatoria, inflamatoria y antiinflamatoria. Mayormente, TcdA_{VPI10463} mostró capacidad para inducir la secreción de citoquinas proinflamatorias en las asas ileales ligadas. Los resultados basales de la quimioquina murina CXCL-1, revelan la detección del reclutamiento de PMNs en el sitio de la infección, ya que esta quimioquina no es producida constitutivamente en el tejido a menos que existan estímulos inflamatorios en el lumen intestinal del huésped (Shea-Donohue et al., 2008). CXCL1, es considerada un potente quimioatrayente de PMNs (Sawant et al., 2016b), y los ratones no expresan un homólogo estructural para el quimioatrayente de PMNs en humanos (IL-8) (Steiner et al., 1997a). Las concentraciones relativamente bajas obtenidas en este estudio comparadas con otros estudios en modelos de infección con ratones podrían deberse al fenómeno descrito durante el reclutamiento activo de PMNs donde los niveles de CXCL-1 pueden variar espacial y temporalmente en muchos órdenes de magnitud relacionados a su concentración descrito por Sawant y colaboradores.

Por su parte, IL-1 β es considerada una citoquina multifuncional prototípica que juega un papel crucial en el inicio y amplificación del proceso inflamatorio del intestino (Reinecker et al., 1991; O'Neill & Dinarello, 2000; Al-Sadi et al., 2012). Esta citoquina es la que más se ha asociado con la respuesta inmunológica inducida por las toxinas y otros componentes secretados por *C. difficile*, como su activación descrito como un proceso independiente de la

actividad glicosiltransferasa de las toxinas (He et al., 2002; Jafari et al., 2013). De todas las toxinas purificadas utilizadas en esta investigación, TcdA fue la única capaz de generar la inflamación del intestino delgado desencadenando la acumulación de líquido, la infiltración de PMNs y el daño tisular en el biomodelo de AILM. Estos mismos efectos fueron descritos en estudios previos donde se evaluó la actividad de TcdA y TcdB en el íleo de murinos por separado (Lyerly et al., 1985b; Triadafilopoulos et al., 1987b, 1989). Adicionalmente, se ha descrito que IL-1 β e IL-8 mediadores inflamatorios innatos como se encuentran elevados en el tejido de pacientes con ICD (Steiner et al., 1997b).

Subsecuentemente, después de las cuatro horas del proceso de inflamación dado por la intoxicación provocada en el íleon de los ratones por las toxinas purificadas TcdA_{VPI10463}, TcdB_{NAPI} y TcdB_{VNAPI}, se detectó estimulación en varios mediadores inflamatorios diferentes, incluidos TNF- α , IL-6 e IL-10 todos asociados con ICD (Steiner et al., 1997b; Ng et al., 2003a; Ishida et al., 2004b; Vohra & Poxton, 2012b). En el modelo de ligadura intestinal TNF- α se utiliza como un indicador del inicio en el proceso patogénico, ya que esta citoquina es capaz de inducir la secreción de otros mediadores proinflamatorios (Ng et al., 2003b). Los resultados de TNF- α e IL-6 comparados con otros estudios muestran valores absolutos bajos, lo cual podría explicarse con la cinética de secreción de otras citoquinas como respuesta a varios estímulos incluidos inflamación o daño en el tejido como IL-10 (inmunosupresora) (Ng et al., 2003).

Interesantemente, IL-10 se produjo en cantidades altas en las asas ileales tratadas con TcdA; en contraste, una expresión nula de IL-10 en TcdBv. La mayoría de los estudios practicados con asa ileal y cultivos celulares han reportado concentraciones de IL-10 por debajo de los 100 pg/mL, pero han sido estudios evaluando sobrenadantes libres de bacterias o utilizando las toxinas TcdA y TcdB en conjunto en modelos de hámsteres (López-Ureña et al., 2019). Tamassia y colaboradores, mencionan que la producción de interleucinas proinflamatorias difiere en humanos y ratones, es decir, la secreción de IL-10 está bien establecida en los PMNs murinos, mientras que los PMNs humanos parecen no secretar cantidades detectables de IL-10.

Otro posible factor de este fenómeno observado en nuestros resultados con IL-10 y su elevada producción, puede ser explicado a partir de estudios recientes con ensayos *in vivo* (células epiteliales cecales de ratón) e *in vitro* (células intestinales humanas [HCT-8]) en los que reportan que la estimulación temprana de la expresión de un ARNm es capaz de controlar positivamente dos receptores de adenosina inducidos por los efectos a corto plazo (2 a 6 horas) por las toxinas de *C. difficile* (Warren et al., 2012; Foschetti et al., 2020). Estos receptores de adenosina: A_{2A} y A_{2B}, se localizan en células inmunitarias más que en células epiteliales en el tracto intestinal (Haskó & Pacher, 2008). En los macrófagos, A_{2A} efectúa la activación del receptor que disminuye la secreción de sustancias inflamatorias (citoquinas), como TNF- α e IL-6 y aumenta la IL-10 (Cronstein, 1994; Sullivan et al., 2001).

Nuestros resultados sugieren que esa estimulación temprana durante las cuatro horas del proceso de infección con el biomodelo de AILM permitieron que el sistema inmune realizará mecanismos reguladores para evolucionar y mantener la homeostasis inmune intestinal modulando la respuesta inmunitaria frente a *C. difficile* (Steiner et al., 1997b; Ng et al., 2003b; Ishida et al., 2004a; Vohra & Poxton, 2012a).

Otro importante mediador proinflamatorio que se cuantificó en esta investigación fueron las concentraciones expresadas de IL-6. En este caso, se encontraron valores elevados solamente en el grupo de asas ileales de ratones no depletados y tratados con TcdA_{VPI10463}, seguido por las combinaciones de TcdA + TcdB. TcdB_{NAP1/027} y TcdB_{NAP1/019} no generaron secreción de esta interleucina en el modelo de asa ileal. IL-6 se ha descrito como una de las principales citoquinas secretadas en células epiteliales e inmunes a nivel intestinal, inducidas por ambas toxinas o incluso por otros metabolitos pertenecientes a sobrenadantes libres de bacterias por vías NOD y NFκβ dependientes (He et al., 2002; Ng et al., 2003b; Hasegawa et al., 2011). Inclusive, se ha asociado a IL-6 con el reclutamiento de PMNs en modelos de asa íleal, lo cual aumenta el daño epitelial (Ishida et al., 2004a; Jose & Madan, 2016).

Las diferencias en la expresión de citoquinas entre nuestro modelo y otros estudios que involucran la exposición a las toxinas purificadas en cultivos celulares y asas intestinales, podrían deberse en parte a la falta de interacción directa entre el reconocimiento y la señalización del huésped-patógeno, a la interacción de la toxina y los componentes de secreción derivados de *C. difficile* (Ausiello et al., 2006).

Todas las citoquinas cuantificadas en nuestro estudio del grupo experimental de ratones no depletados mostraron niveles de producción de IL-1β, IL-10, IL-6, TNF-α y CXCL1 diferencias significativas en comparación con el grupo de ratones depletados y tratados con TcdA. Esto solo confirma dos preceptos, que TcdA como enterotoxina sigue produciendo una mayor respuesta proinflamatoria que TcdB, sin importar si la toxina purificada pertenece a una cepa hipervirulenta. Y que, con el modelo de depleción, se confirma que la eliminación sistémica de los PMNs reduce la respuesta inflamatoria. Esto podría sugerir que la resolución del problema con la paradoja de los PMNs y la exacerbada respuesta inflamatoria generada por estos y los estímulos inflamatorios continuos que desencadenan una inflamación crónica, podrían resolverse reduciendo el número de PMNs o sus agonistas (Trampas extracelulares de PMNs) (NETs, por sus siglas en inglés) en el tejido circundante.

La actividad de la enzima MPO en el tejido ileal se incrementó solamente con los ratones (no-depletados) tratados con TcdB_{NAP1} en este estudio (Figura 7). En contraste, TcdB_{VNAP1} y TcdA_{VPI10463} expresaron valores de U/mg muy bajos en comparación con TcdB_{NAP1}, pero similares entre sí. Estos resultados son correlacionables con los hallazgos publicados por Quesada-Gómez y colaboradores, sin embargo, estos autores trataron con 10 µg de las toxinas purificadas TcdB_{NAP1} y TcdB_{VNAP1} las asas ileales ligadas murinas. Otro estudio, utilizando un modelo de inyección cecal en ratones tratados con TcdA y TcdB recombinantes, reportaron datos similares con nuestros hallazgos respecto a TcdB y la

actividad MPO (Peritore-Galve et al., 2022). En ese sentido, Peritore-Galve y colaboradores, describen que la inflamación puede contribuir al daño epitelial en algunos modelos produciendo resultados controversiales difíciles de correlacionar con resultados de otros autores. También Frädrieh y colaboradores, describen la importancia de la pureza de la TcdA o TcdB nativas aisladas de cultivos de *C. difficile*, se debe garantizar una pureza de TcdA >99 % en relación con la contaminación cruzada con TcdB para estar a salvo de efectos inespecíficos.

Este resultado confirma que la actividad MPO es un importante marcador de la respuesta inflamatoria exacerbada, proceso de desgranulación de leucocitos y reclutamiento neutrofílico inducido por TcdA y TcdB. Todos estos efectos han sido descritos como las principales causas de daño epitelial (Costa et al., 2016). Asimismo, se observó una tendencia de disminución de actividad MPO en los ratones depletados de PMNs, lo cual coincide con que los PMNs (principales productores de MPO) participan en la defensa del huésped contra las toxinas. Sin embargo, pueden ser perjudiciales cuando se produce un reclutamiento e infiltración exacerbado de estas células en el sitio de infección.

En humanos, *C. difficile* coloniza el intestino grueso mostrando una fuerte afectación del colon descendente, y en los modelos de intoxicación en ratones, la enfermedad ocurre principalmente en el ciego y colon (Sun et al., 2011). Lo cual sugiere que nuestro biomodelo *in vivo* de asa intestinal murina combinada con el sistema de depleción de PMNs son datos que podrían extrapolarse a ICD humana. Además, en nuestro estudio la administración de TcdA, pero no de TcdB, desencadenó la acumulación de líquido, la infiltración de células inmunitarias y el daño tisular en las asas ileales. En contraste con estos estudios, Lyras y colaboradores, informaron que las cepas que expresan TcdB deficientes en TcdA aún podrían desencadenar la enfermedad en el modelo de infección de hámster (Lyras et al., 2009). Dado que el sitio principal de colonización, inflamación y daño en el hámster infectado con *C. difficile* es el ciego (Hirota et al., 2012), es incierta la traducción de estos datos a ICD humana. En nuestro estudio, observamos que TcdA, pero no TcdB, desencadenó inflamación del colon y daño tisular cuando se administró la toxina directamente en el asa del ratón. Esto podría sugerir que también el mecanismo de acción de las toxinas dependerá del tipo de animal; asimismo, de la capacidad colonización, presencia de receptores y adherencia dependerán del tipo de toxina.

Mencionado todo lo anterior, es importante destacar que tanto TcdA como TcdB son importantes para la patogenia de *C. difficile*, por esa razón se utilizaron ambas toxinas en este estudio. Nuestro modelo con asa ileal utilizó dos tipos de TcdBs pertenecientes a las cepas NAP1 de *C. difficile*. Tal y como se mencionó, TcdA indujo una mayor actividad proinflamatoria e histopatológica en ratones no depletados, contrario a esto, TcdB produjo actividades menores, exceptuando la actividad MPO. En otros modelos con asa ligada intestinal, ya se ha demostrado previamente que los conejos, los hámsteres y los ratones responden más activamente a TcdA tanto a nivel proinflamatorio e histopatológico, en

comparación con TcdB (Knetsch et al., 2013; Yoshino et al., 2013). Este precepto sugiere que los comportamientos de las toxinas *in vivo* e *in vitro* pueden variar.

En resumen, en esta investigación se concluyó que la capacidad fagocítica de los PMNs de ratón fue más eficiente que la de los PMN humanos, posiblemente por diferencias en la presencia de receptores celulares a nivel de especie. También, se identificó la formación grumos de plaquetas durante los ensayos *in vitro* en ratones, posiblemente relacionado con la disminución y/o depuración de plaquetas observado en algunas infecciones bacterianas y virales para mejorar el proceso de infección.

Finalmente, se observó que la remoción parcial de los PMNs, tanto periférica como tisularmente, generó una disminución en la patogénesis producida por *C. difficile*, ocasionando una reducción de la respuesta proinflamatoria, inflamatoria, indicadores de daño histopatológico y migración y desgranulación de PMNs. La reducción de estos efectos fue observada mayormente con la enterotoxina TcdA. En contraste, también se logró identificar que TcdB_{VNAP1} no presentó mayor actividad biológica que TcdA, y su actividad histopatológica es casi similar a la TcdB_{NAP1}.

Es necesario realizar más investigaciones combinando ensayos *in vivo* e *in vitro* que permitan caracterizar todo el proceso patológico en el ratón y los PMNs, mayormente evaluando moléculas o sustancias citotóxicas liberadas por los PMNs en el momento de la infección para que estos mismos sirvan como biomarcadores para terapias contra la patología causada por las toxinas de la bacteria. En este sentido, resulta interesante investigar cómo intervienen las trampas extracelulares de PMNs (NETs) y toda la función inmunológica que esta NETosis conlleva, ya que no hay información acerca de este tema en esta área de investigación en *Clostridioides difficile*.

5. CONCLUSIONES

- 5.1 Con el uso del modelo de depleción sistémica de PMNs en ratones, se evidenció que la presencia de los PMNs en el lumen intestinal durante la ICD contribuyen en el potencial patogénico e inflamatorio inducido por las toxinas TcdA y TcdB de *C. difficile*.
- 5.2 Al evaluar la capacidad de asociación (fagocitosis) de los PMNs de ratón en los ensayos *in vitro* contra *C. difficile*, la asociación PMN:Clostridio fue más eficiente en los PMNs de ratón que en PMNs de humanos, lo cual sugiere un reconocimiento más eficiente mejorando la actividad fagocítica.
- 5.3 Por medio de análisis histopatológicos se evidenció que la toxina TcdA_{VPI10463} indujo mayor alteración tisular con respecto a las toxinas TcdB. TcdB_{NAP1} y TcdB_{VNAP1} presentaron un efecto histopatológico leve y similar entre ellas.
- 5.4 TcdA_{VPI10463} presentó el mayor potencial patogénico e inflamatorio al inducir una mayor producción citoquinas y quimioquinas IL-1 β , IL-10-IL-6, TNF- α y CXCL-1, respectivamente.
- 5.5 TcdB_{NAP1} indujo una mayor actividad MPO, pero una enterotoxicidad leve en las asas ileales de ratones utilizados en esta investigación.

6. RECOMENDACIONES

- 6.1 Seguir estudiando el efecto directo de las toxinas de *C. difficile*, con ensayos *in vivo* con enfoques sobre el efecto e interacción de las múltiples señales celulares y extracelular de los PMNs y eosinófilos (expresión y desgranulación de gránulos citotóxicos, posibles biomarcadores, NETs, ROS e interacción de receptores celulares) que se desencadenan por la respuesta inflamatoria de las toxinas de *C. difficile*.
- 6.2 Ampliar la descripción proinflamatoria, bioquímica y de mortalidad en TcdBv, ya que aún no ha sido aclarado para esta toxina. Realizando enfoques experimentales *in vivo* que permitan caracterizar con mayor detalle el proceso patogénico por el que pasan los sujetos experimentales expuestos específicamente a esta toxina. Esto permitirá contar con el perfil patogénico e inflamatorio completo para esta variedad de toxina de *C. difficile*.
- 6.3 Diseñar un biomodelo murino *in vivo* que permita evaluar cuánta es la concentración de TcdA o de TcdB que la bacteria secreta en el colon cuando está causando ICD en un huésped, ya que fisiológicamente no ha sido posible cuantificarlo.
- 6.4 En el ensayo para la determinación de la actividad MPO a partir del tejido congelado, es importante destacar que durante la preparación de la solución con *o*-dianisidina [0,017%] y debido a su baja solubilidad, debe ser preparada el mismo día a ser utilizada y disuelta con solventes orgánicos como etanol absoluto, metanol grado reactivo o lavar los pocillos con una solución de HCL [6N]/ 50% de etanol.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abad, C. L. R., & Safdar, N. (2021). A Review of Clostridioides difficile Infection and Antibiotic-Associated Diarrhea. *Gastroenterology Clinics of North America*, 50(2), 323–340. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2021.02.010>
- Aleyd, E., Heineke, M. H., & van Egmond, M. (2015). The era of the immunoglobulin A Fc receptor FcαRI; its function and potential as target in disease. *Immunological Reviews*, 268(1), 123–138. <https://doi.org/10.1111/imr.12337>
- Al-Sadi, R., Guo, S., Dokladny, K., Smith, M. A., Ye, D., Kaza, A., Watterson, D. M., & Ma, T. Y. (2012). Mechanism of Interleukin-1β Induced-Increase in Mouse Intestinal Permeability *In Vivo*. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 32(10), 474–484. <https://doi.org/10.1089/jir.2012.0031>
- Álvarez-Hernández, D. A., González-Chávez, A. M., González-Hermosillo-Cornejo, D., Franyuti-Kelly, G. A., Díaz-Girón-Gidi, A., & Vázquez-López, R. (2018). Perspectivas históricas y vigentes sobre la infección por Clostridium difficile. *Revista de Gastroenterología de México*, 83(1), 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2017.03.004>
- Andino-Molina, M., Barquero-Calvo, E., Seyboldt, C., Schmoock, G., Neubauer, H., Tzoc, E., Rodríguez, C., & Quesada-Gómez, C. (2019). Multidrug-resistant Clostridium difficile ribotypes 078 and 014/5-FLI01 in piglets from Costa Rica. *Anaerobe*, 55, 78–82. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.11.004>
- Ausiello, C. M., Cerquetti, M., Fedele, G., Spensieri, F., Palazzo, R., Nasso, M., Frezza, S., & Mastrantonio, P. (2006). Surface layer proteins from Clostridium difficile induce inflammatory and regulatory cytokines in human monocytes and dendritic cells. *Microbes and Infection*, 8(11), 2640–2646. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.07.009>
- Awad, M. M., Johanesen, P. A., Carter, G. P., Rose, E., & Lyras, D. (2014). Clostridium difficile virulence factors: Insights into an anaerobic spore-forming pathogen. *Gut Microbes*, 5(5), 579–593. <https://doi.org/10.4161/19490976.2014.969632>
- Bagaitkar, J., Matute, J. D., Austin, A., Arias, A. A., & Dinauer, M. C. (2012). Activation of neutrophil respiratory burst by fungal particles requires phosphatidylinositol 3-phosphate binding to p40phox in humans but not in mice. *Blood*, 120(16), 3385–3387. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-07-445619>
- Balsells, E., Shi, T., Leese, C., Lyell, I., Burrows, J., Wiuff, C., Campbell, H., Kyaw, M. H., & Nair, H. (2019). Global burden of Clostridium difficile infections: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Global Health*, 9(1), 010407. <https://doi.org/10.7189/jogh.09.010407>
- Bansal, S., Yajjala, V. K., Bauer, C., & Sun, K. (2018). IL-1 Signaling Prevents Alveolar Macrophage Depletion during Influenza and Streptococcus pneumoniae Coinfection. *The Journal of Immunology*, 200(4), 1425–1433. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700210>
- Bao, Y., & Cao, X. (2011). Revisiting the protective and pathogenic roles of neutrophils: Ly-6G is key! *European Journal of Immunology*, 41(9), 2535–2538. <https://doi.org/10.1002/eji.201141979>

- Barquero-Calvo, E., Martirosyan, A., Ordoñez-Rueda, D., Arce-Gorvel, V., Alfaro-Alarcón, A., Lepidi, H., Malissen, B., Malissen, M., Gorvel, J.-P., & Moreno, E. (2013). Neutrophils Exert a Suppressive Effect on Th1 Responses to Intracellular Pathogen *Brucella abortus*. *PLoS Pathogens*, *9*(2), e1003167. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003167>
- Bartlett, J. G. (2006). Narrative Review: The New Epidemic of *Clostridium difficile* – Associated Enteric Disease. *Annals of Internal Medicine*, *145*(10), 758. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-145-10-200611210-00008>
- Båverud, V. (2002). *Clostridium difficile* infections in animals with special reference to the horse. A review. *Veterinary Quarterly*, *24*(4), 203–219. <https://doi.org/10.1080/01652176.2002.9695137>
- Beutler, B. (2004). Innate immunity: An overview. *Molecular Immunology*, *40*(12), 845–859. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2003.10.005>
- Bobo, L. D., El Feghaly, R. E., Chen, Y.-S., Dubberke, E. R., Han, Z., Baker, A. H., Li, J., Burnham, C.-A. D., & Haslam, D. B. (2013). MAPK-Activated Protein Kinase 2 Contributes to *Clostridium difficile*-Associated Inflammation. *Infection and Immunity*, *81*(3), 713–722. <https://doi.org/10.1128/IAI.00186-12>
- Brito, G. A. C., Carneiro-filho, B., Oriá, R. B., Destura, R. V., Lima, A. A. M., & Guerrant, R. L. (2005). *Clostridium difficile* Toxin A Induces Intestinal Epithelial Cell Apoptosis and Damage: Role of Gln and Ala-Gln in Toxin A Effects. *Digestive Diseases and Sciences*, *50*(7), Art. 7. <https://doi.org/10.1007/s10620-005-2771-x>
- Brito, G. A. C., Sullivan, G. W., Ciesla, Jr., W. P., Carper, H. T., Mandell, G. L., & Guerrant, R. L. (2002). *Clostridium difficile* Toxin A Alters In Vitro–Adherent Neutrophil Morphology and Function. *The Journal of Infectious Diseases*, *185*(9), 1297–1306. <https://doi.org/10.1086/340236>
- Brown, A. W. W., & Wilson, R. B. (2018). *Clostridium difficile* colitis and zoonotic origins—A narrative review. *Gastroenterology Report*, *6*(3), 157–166. <https://doi.org/10.1093/gastro/goy016>
- Bryant, C. E., & Monie, T. P. (2012). Mice, men and the relatives: Cross-species studies underpin innate immunity. *Open Biology*, *2*(4), 120015. <https://doi.org/10.1098/rsob.120015>
- Bryda, E. C. (2013). The Mighty Mouse: The impact of rodents on advances in biomedical research. *Missouri Medicine*, *110*(3), 207–211.
- Camorlinga, M., Sanchez-Rojas, M., Torres, J., & Romo-Castillo, M. (2019). Phenotypic Characterization of Non-toxigenic *Clostridioides difficile* Strains Isolated From Patients in Mexico. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 84. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00084>
- Carlson, P. E., Walk, S. T., Bourgis, A. E. T., Liu, M. W., Koplaku, F., Lo, E., Young, V. B., Aronoff, D. M., & Hanna, P. C. (2013). The relationship between phenotype, ribotype, and clinical disease in human *Clostridium difficile* isolates. *Anaerobe*, *24*, 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.04.003>
- Carter, G. P., Chakravorty, A., Pham Nguyen, T. A., Mileto, S., Schreiber, F., Li, L., Howarth, P., Clare, S., Cunningham, B., Sambol, S. P., Cheknis, A., Figueroa, I., Johnson, S., Gerding, D., Rood, J. I., Dougan, G., Lawley, T. D., & Lyras, D. (2015). Defining the Roles of TcdA and TcdB in Localized Gastrointestinal Disease, Systemic Organ Damage, and the Host Response during *Clostridium difficile* Infections. *MBio*, *6*(3). <https://doi.org/10.1128/mBio.00551-15>

- Cavalcante, I. C., Castro, M. V., Barreto, A. R. F., Sullivan, G. W., Vale, M., Almeida, P. R. C., Linden, J., Rieger, J. M., Cunha, F. Q., Guerrant, R. L., Ribeiro, R. A., & Brito, G. A. C. (2006). Effect of Novel A_{2A} Adenosine Receptor Agonist ATL 313 on *Clostridium difficile* Toxin A-Induced Murine Ileal Enteritis. *Infection and Immunity*, *74*(5), 2606–2612. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.5.2606-2612.2006>
- Chaves-Cordero, C., Quesada-Gómez, C., Chaves-Olarte, E., & Barquero-Calvo, E. (2022). Human neutrophils are resistant to *Clostridioides difficile* toxin B. *Anaerobe*, *102*553. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2022.102553>
- Chen, X., Katchar, K., Goldsmith, J. D., Nanthakumar, N., Cheknis, A., Gerding, D. N., & Kelly, C. P. (2008). A Mouse Model of *Clostridium difficile*–Associated Disease. *Gastroenterology*, *135*(6), 1984–1992. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.09.002>
- Cho, S. M., Lee, J. J., & Yoon, H. J. (2012). Clinical risk factors for *Clostridium difficile*-associated diseases. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, *16*(3), 256–261. <https://doi.org/10.1590/S1413-86702012000300007>
- Chumbler, N. M., Rutherford, S. A., Zhang, Z., Farrow, M. A., Lisher, J. P., Farquhar, E., Giedroc, D. P., Spiller, B. W., Melnyk, R. A., & Lacy, D. B. (2016). Crystal structure of *Clostridium difficile* toxin A. *Nature Microbiology*, *1*, 15002. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2015.2>
- Chumpitazi, B. P., Self, M. M., Czyzewski, D. I., Cejka, S., Swank, P. R., & Shulman, R. J. (2016). Bristol Stool Form Scale reliability and agreement decreases when determining Rome III stool form designations. *Neurogastroenterology & Motility*, *28*(3), 443–448. <https://doi.org/10.1111/nmo.12738>
- Church, D. M., Goodstadt, L., Hillier, L. W., Zody, M. C., Goldstein, S., She, X., Bult, C. J., Agarwala, R., Cherry, J. L., DiCuccio, M., Hlavina, W., Kapustin, Y., Meric, P., Maglott, D., Birtle, Z., Marques, A. C., Graves, T., Zhou, S., Teague, B., ... The Mouse Genome Sequencing Consortium. (2009). Lineage-Specific Biology Revealed by a Finished Genome Assembly of the Mouse. *PLoS Biology*, *7*(5), e1000112. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000112>
- Costa, C. L., López-Ureña, D., de Oliveira Assis, T., Ribeiro, R. A., Silva, R. O. S., Rupnik, M., Wilcox, M. H., de Carvalho, A. F., do Carmo, A. O., Dias, A. A. M., de Carvalho, C. B. M., Chaves-Olarte, E., Rodríguez, C., Quesada-Gómez, C., & de Castro Brito, G. A. (2016). A MLST Clade 2 *Clostridium difficile* strain with a variant TcdB induces severe inflammatory and oxidative response associated with mucosal disruption. *Anaerobe*, *40*, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.06.005>
- Cowardin, C. A., & Petri, W. A. (2014). Host recognition of *Clostridium difficile* and the innate immune response. *Anaerobe*, *30*, 205–209. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.08.014>
- Crobach, M. J. T., Vernon, J. J., Loo, V. G., Kong, L. Y., Péchiné, S., Wilcox, M. H., & Kuijper, E. J. (2018). Understanding *Clostridium difficile* Colonization. *Clinical Microbiology Reviews*, *31*(2). <https://doi.org/10.1128/CMR.00021-17>
- Cronstein, B. N. (1994). Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. *Journal of Applied Physiology*, *76*(1), 5–13. <https://doi.org/10.1152/jappl.1994.76.1.5>
- Dailey, D. C., Kaiser, A., & Schloemer, R. H. (1987). Factors influencing the phagocytosis of *Clostridium difficile* by human polymorphonuclear leukocytes. *Infection and Immunity*, *55*(7), 1541–1546. <https://doi.org/10.1128/iai.55.7.1541-1546.1987>
- de Araújo Junqueira, A. F. T., Dias, A. A. M., Vale, M. L., Spilborghs, G. M. G. T., Bossa, A. S., Lima, B. B., Carvalho, A. F., Guerrant, R. L., Ribeiro, R. A., & Brito, G. A.

- (2011). Adenosine Deaminase Inhibition Prevents *Clostridium difficile* Toxin A-Induced Enteritis in Mice. *Infection and Immunity*, 79(2), 653–662. <https://doi.org/10.1128/IAI.01159-10>
- DePestel, D. D., & Aronoff, D. M. (2013). Epidemiology of *Clostridium difficile* Infection. *Journal of Pharmacy Practice*, 26(5), 464–475. <https://doi.org/10.1177/0897190013499521>
- Di Bella, S., Ascenzi, P., Siarakas, S., Petrosillo, N., & di Masi, A. (2016). Clostridium difficile Toxins A and B: Insights into Pathogenic Properties and Extraintestinal Effects. *Toxins*, 8(5), 134. <https://doi.org/10.3390/toxins8050134>
- Dilnessa, T., Getaneh, A., Hailu, W., Moges, F., & Gelaw, B. (2022). Prevalence and antimicrobial resistance pattern of Clostridium difficile among hospitalized diarrheal patients: A systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE*, 17(1), e0262597. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262597>
- Dingle, T. C., Mulvey, G. L., & Armstrong, G. D. (2011). Mutagenic Analysis of the Clostridium difficile Flagellar Proteins, FliC and FliD, and Their Contribution to Virulence in Hamsters. *Infection and Immunity*, 79(10), 4061–4067. <https://doi.org/10.1128/IAI.05305-11>
- Doig, K., & Thompson, L. A. (2017). A Methodical Approach to Interpreting the White Blood Cell Parameters of the Complete Blood Count. *American Society for Clinical Laboratory Science*, 30(3), 186–193. <https://doi.org/10.29074/ascls.30.3.186>
- Dorward, D. A., Lucas, C. D., Chapman, G. B., Haslett, C., Dhaliwal, K., & Rossi, A. G. (2015). The Role of Formylated Peptides and Formyl Peptide Receptor 1 in Governing Neutrophil Function during Acute Inflammation. *The American Journal of Pathology*, 185(5), 1172–1184. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.01.020>
- Drudy, D., Fanning, S., & Kyne, L. (2007). Toxin A-negative, toxin B-positive Clostridium difficile. *International Journal of Infectious Diseases*, 11(1), 5–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2006.04.003>
- Edwards, A. N., Suárez, J. M., & McBride, S. M. (2013). Culturing and Maintaining Clostridium difficile in an Anaerobic Environment. *Journal of Visualized Experiments*, 79, 50787. <https://doi.org/10.3791/50787>
- El Feghaly, R. E., Stauber, J. L., Deych, E., Gonzalez, C., Tarr, P. I., & Haslam, D. B. (2013). Markers of Intestinal Inflammation, Not Bacterial Burden, Correlate With Clinical Outcomes in Clostridium difficile Infection. *Clinical Infectious Diseases*, 56(12), 1713–1721. <https://doi.org/10.1093/cid/cit147>
- Engevik, M. A., Danhof, H. A., Chang-Graham, A. L., Spinler, J. K., Engevik, K. A., Herrmann, B., Endres, B. T., Garey, K. W., Hyser, J. M., Britton, R. A., & Versalovic, J. (2020). Human intestinal enteroids as a model of *Clostridioides difficile* -induced enteritis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 318(5), G870–G888. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00045.2020>
- Fettucciari, K., Ponsini, P., Gioè, D., Macchioni, L., Palumbo, C., Antonelli, E., Coaccioli, S., Villanacci, V., Corazzi, L., Marconi, P., & Bassotti, G. (2017). Enteric glial cells are susceptible to Clostridium difficile toxin B. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(8), 1527–1551. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2426-4>
- Foschetti, D. A., Braga-Neto, M. B., Bolick, D., Moore, J., Alves, La., Martins, Cs., Bomfin, Le., Santos, Aaqa., Leitão, Rfc., Brito, Gac., & Warren, Ca. (2020). Clostridium difficile toxins or infection induce upregulation of adenosine receptors and IL-6 with early pro-inflammatory and late anti-inflammatory pattern. *Brazilian Journal of*

- Medical and Biological Research*, 53(9), e9877. <https://doi.org/10.1590/1414-431x20209877>
- Frädriich, C., Beer, L.-A., & Gerhard, R. (2016a). Reactive Oxygen Species as Additional Determinants for Cytotoxicity of *Clostridium difficile* Toxins A and B. *Toxins*, 8(1), Art. 1. <https://doi.org/10.3390/toxins8010025>
- Frädriich, C., Beer, L.-A., & Gerhard, R. (2016b). Reactive Oxygen Species as Additional Determinants for Cytotoxicity of *Clostridium difficile* Toxins A and B. *Toxins*, 8(1), 25. <https://doi.org/10.3390/toxins8010025>
- Furuya-Kanamori, L., Marquess, J., Yakob, L., Riley, T. V., Paterson, D. L., Foster, N. F., Huber, C. A., & Clements, A. C. A. (2015). Asymptomatic *Clostridium difficile* colonization: Epidemiology and clinical implications. *BMC Infectious Diseases*, 15(1), 516. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1258-4>
- Ganz, T. (2003). Defensins: Antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 3(9), 710–720. <https://doi.org/10.1038/nri1180>
- Goncalves, D. M., de Liz, R., & Girard, D. (2011). Activation of Neutrophils by Nanoparticles. *The Scientific World JOURNAL*, 11, 1877–1885. <https://doi.org/10.1100/2011/768350>
- Goy, S. D., Olling, A., Neumann, D., Pich, A., & Gerhard, R. (2015). Human neutrophils are activated by a peptide fragment of *Clostridium difficile* toxin B presumably via formyl peptide receptor: TcdB activates neutrophils. *Cellular Microbiology*, 17(6), 893–909. <https://doi.org/10.1111/cmi.12410>
- Haley, P. J. (2003). Species differences in the structure and function of the immune system. *Toxicology*, 188(1), 49–71. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(03\)00043-X](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00043-X)
- Hallett, J. M., Leitch, A. E., Riley, N. A., Duffin, R., Haslett, C., & Rossi, A. G. (2008). Novel pharmacological strategies for driving inflammatory cell apoptosis and enhancing the resolution of inflammation. *Trends in Pharmacological Sciences*, 29(5), 250–257. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.03.002>
- Hansen, A., Alston, L., Tulk, S. E., Schenck, L. P., Grassie, M. E., Alhassan, B. F., Veermalla, A. T., Al-Bashir, S., Gendron, F.-P., Altier, C., MacDonald, J. A., Beck, P. L., & Hirota, S. A. (2013). The P2Y6 Receptor Mediates *Clostridium difficile* Toxin-Induced CXCL8/IL-8 Production and Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction. *PLoS ONE*, 8(11), e81491. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081491>
- Hasegawa, M., Yamazaki, T., Kamada, N., Tawaratsumida, K., Kim, Y.-G., Núñez, G., & Inohara, N. (2011). Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 1 Mediates Recognition of *Clostridium difficile* and Induces Neutrophil Recruitment and Protection against the Pathogen. *The Journal of Immunology*, 186(8), 4872–4880. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003761>
- Haskó, G., & Pacher, P. (2008). A_{2A} receptors in inflammation and injury: Lessons learned from transgenic animals. *Journal of Leukocyte Biology*, 83(3), 447–455. <https://doi.org/10.1189/jlb.0607359>
- He, D., Sougioultzis, S., Hagen, S., Liu, J., Keates, S., Keates, A. C., Pothoulakis, C., & LaMont, J. T. (2002). *Clostridium difficile* toxin A triggers human colonocyte IL-8 release via mitochondrial oxygen radical generation. *Gastroenterology*, 122(4), 1048–1057. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.32386>

- Headland, S. E., & Norling, L. V. (2015). The resolution of inflammation: Principles and challenges. *Seminars in Immunology*, 27(3), 149–160. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2015.03.014>
- Hernández-Rocha, C., Pidal, P., Ajenjo, M. C., Quera, R., Quintanilla, M., Lubascher, J., Jemenao, M. I., Ibáñez, P., Álvarez-Lobos, M., Diomedi, A., Marcotti, A., Acuña, M., Arab, J. P., Riquelme, A., Candía, R., & Carvajal, S. (2016). Consenso chileno de prevención, diagnóstico y tratamiento de la diarrea asociada a *Clostridium difficile*. *Revista Chilena de Infectología*, 33(1), 98–118. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182016000100020>
- Hirota, S. A., Iablokov, V., Tulk, S. E., Schenck, L. P., Becker, H., Nguyen, J., Al Bashir, S., Dingle, T. C., Laing, A., Liu, J., Li, Y., Bolstad, J., Mulvey, G. L., Armstrong, G. D., MacNaughton, W. K., Muruve, D. A., MacDonald, J. A., & Beck, P. L. (2012). Intrarectal Instillation of *Clostridium difficile* Toxin A Triggers Colonic Inflammation and Tissue Damage: Development of a Novel and Efficient Mouse Model of *Clostridium difficile* Toxin Exposure. *Infection and Immunity*, 80(12), 4474–4484. <https://doi.org/10.1128/IAI.00933-12>
- Huelsenbeck, J., Dreger, S., Gerhard, R., Barth, H., Just, I., & Genth, H. (2007). Difference in the Cytotoxic Effects of Toxin B from *Clostridium difficile* Strain VPI 10463 and Toxin B from Variant *Clostridium difficile* Strain 1470. *Infection and Immunity*, 75(2), 801–809. <https://doi.org/10.1128/IAI.01705-06>
- Hundsberger, T., Braun, V., Weidmann, M., Leukel, P., Sauerborn, M., & Eichel-Streiber, C. (1997). Transcription Analysis of the Genes *tcdA-E* of the Pathogenicity Locus of *Clostridium Difficile*. *European Journal of Biochemistry*, 244(3), 735–742. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00735.x>
- Hung, Y.-P., Lee, J.-C., Tsai, B.-Y., Wu, J.-L., Liu, H.-C., Liu, H.-C., Lin, H.-J., Tsai, P.-J., & Ko, W.-C. (2021). Risk factors of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in hospitalized adults: Vary by hospitalized duration. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 54(2), 276–283. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2019.07.004>
- Iancu, L. S., Cârlan, A. F., & Ursu, R. G. (2017). *Clostridium difficile* Infection Diagnosis by Biological Molecular Methods. En S. Enany (Ed.), *Clostridium Difficile—A Comprehensive Overview*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.68692>
- Ishida, Y., Maegawa, T., Kondo, T., Kimura, A., Iwakura, Y., Nakamura, S., & Mukaida, N. (2004a). Essential Involvement of IFN- γ in *Clostridium difficile* Toxin A-Induced Enteritis. *The Journal of Immunology*, 172(5), 3018–3025. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.3018>
- Ishida, Y., Maegawa, T., Kondo, T., Kimura, A., Iwakura, Y., Nakamura, S., & Mukaida, N. (2004b). Essential Involvement of IFN- γ in *Clostridium difficile* Toxin A-Induced Enteritis. *The Journal of Immunology*, 172(5), Art. 5. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.3018>
- Jafari, N. V., Kuehne, S. A., Bryant, C. E., Elawad, M., Wren, B. W., Minton, N. P., Allan, E., & Bajaj-Elliott, M. (2013). *Clostridium difficile* Modulates Host Innate Immunity via Toxin-Independent and Dependent Mechanism(s). *PLoS ONE*, 8(7), e69846. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069846>
- Janežic, S., Potocnik, M., Zidaric, V., & Rupnik, M. (2016). Highly Divergent *Clostridium difficile* Strains Isolated from the Environment. *PLOS ONE*, 11(11), e0167101. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167101>

- Jank, T., & Aktories, K. (2008). Structure and mode of action of clostridial glucosylating toxins: The ABCD model. *Trends in Microbiology*, 16(5), 222–229. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.01.011>
- Jank, T., Gieseemann, T., & Aktories, K. (2007). Rho-glucosylating *Clostridium difficile* toxins A and B: New insights into structure and function. *Glycobiology*, 17(4), 15R–22R. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwm004>
- Jenior, M. L., Leslie, J. L., Young, V. B., & Schloss, P. D. (2017). *Clostridium difficile* Colonizes Alternative Nutrient Niches during Infection across Distinct Murine Gut Microbiomes. *MSystems*, 2(4). <https://doi.org/10.1128/mSystems.00063-17>
- Jose, S., & Madan, R. (2016). Neutrophil-mediated inflammation in the pathogenesis of *Clostridium difficile* infections. *Anaerobe*, 41, 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.04.001>
- Kachrimanidou, M., Tzika, E., & Filioussis, G. (2019). Clostridioides (*Clostridium*) *Difficile* in Food-Producing Animals, Horses and Household Pets: A Comprehensive Review. *Microorganisms*, 7(12), 667. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120667>
- Kang, J.-H., Lee, G.-S., Jeung, E.-B., & Yang, M.-P. (2009). Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid modulates phagocytic responses of canine peripheral blood polymorphonuclear neutrophilic leukocytes exposed to *Clostridium difficile* toxin B. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 130(3–4), 178–186. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.02.005>
- Kapur, R., Heitink-Pollé, K. M. J., Porcelijn, L., Bentlage, A. E. H., Bruin, M. C. A., Visser, R., Roos, D., Schasfoort, R. B. M., de Haas, M., van der Schoot, C. E., & Vidarsson, G. (2015). C-reactive protein enhances IgG-mediated phagocyte responses and thrombocytopenia. *Blood*, 125(11), 1793–1802. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-05-579110>
- Karen C., C., & John G., B. (2011). Biology of *Clostridium difficile*: Implications for Epidemiology and Diagnosis. *Annual Review of Microbiology*, 65(1), 501–521. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090110-102824>
- Keel, M. K., & Songer, J. G. (2006). The Comparative Pathology of *Clostridium difficile* - associated Disease. *Veterinary Pathology*, 43(3), 225–240. <https://doi.org/10.1354/vp.43-3-225>
- Kelly, C. P., Becker, S., Linevsky, J. K., Joshi, M. A., O’Keane, J. C., Dickey, B. F., LaMont, J. T., & Pothoulakis, C. (1994). Neutrophil recruitment in *Clostridium difficile* toxin A enteritis in the rabbit. *Journal of Clinical Investigation*, 93(3), 1257–1265. <https://doi.org/10.1172/JCI117080>
- Kelly, C. P., & Kyne, L. (2011). The host immune response to *Clostridium difficile*. *Journal of Medical Microbiology*, 60(8), 1070–1079. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.030015-0>
- Kennedy, A. D., & DeLeo, F. R. (2009). Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunologic Research*, 43(1–3), 25–61. <https://doi.org/10.1007/s12026-008-8049-6>
- Kim, S., Covington, A., & Pamer, E. G. (2017). The intestinal microbiota: Antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens. *Immunological Reviews*, 279(1), 90–105. <https://doi.org/10.1111/imr.12563>
- Knetsch, C. W., Lawley, T. D., Hensgens, M. P., Corver, J., Wilcox, M. W., & Kuijper, E. J. (2013). Current application and future perspectives of molecular typing methods to study *Clostridium difficile* infections. *Eurosurveillance*, 18(4). <https://doi.org/10.2807/es.18.04.20381-en>

- Knight, D. R., Elliott, B., Chang, B. J., Perkins, T. T., & Riley, T. V. (2015). Diversity and Evolution in the Genome of *Clostridium difficile*. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 721–741. <https://doi.org/10.1128/CMR.00127-14>
- Knight, D. R., & Riley, T. V. (2019). Genomic Delineation of Zoonotic Origins of *Clostridium difficile*. *Frontiers in Public Health*, 7, 164. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00164>
- Kobayashi, S. D., Malachowa, N., & DeLeo, F. R. (2018). Neutrophils and Bacterial Immune Evasion. *Journal of Innate Immunity*, 10(5–6), 432–441. <https://doi.org/10.1159/000487756>
- Lawson, P. A., Citron, D. M., Tyrrell, K. L., & Finegold, S. M. (2016). Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O’Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe*, 40, 95–99. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.06.008>
- Libby, J. M., & Wilkins, T. D. (1982). Production of Antitoxins to Two Toxins of *Clostridium difficile* and Immunological Comparison of the Toxins by Cross-Neutralization Studies. *Infection and Immunity*, 35(1), 374–376. <https://doi.org/10.1128/iai.35.1.374-376.1982>
- Lima, A. A., Lyerly, D. M., Wilkins, T. D., Innes, D. J., & Guerrant, R. L. (1988). Effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in rabbit small and large intestine in vivo and on cultured cells in vitro. *Infection and Immunity*, 56(3), Art. 3. <https://doi.org/10.1128/iai.56.3.582-588.1988>
- Lital Meyer, S., Ricardo Espinoza, A., & Rodrigo Quera, P. (2014). Infección por *clostridium difficile*: Epidemiología, diagnóstico y estrategias terapéuticas. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 25(3), 473–484. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(14\)70064-1](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(14)70064-1)
- Lönnroth, I., & Lange, S. (2009). TOXIN A OF CLOSTRIDIUM DIFFICILE: PRODUCTION, PURIFICATION AND EFFECT IN MOUSE INTESTINE. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Series B: Microbiology*, 91B(1–6), 395–400. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1983.tb00066.x>
- López-Ureña, D., Orozco-Aguilar, J., Chaves-Madrugal, Y., Ramírez-Mata, A., Villalobos-Jimenez, A., Ost, S., Quesada-Gómez, C., Rodríguez, C., Papatheodorou, P., & Chaves-Olarte, E. (2019). Toxin B Variants from *Clostridium difficile* Strains VPI 10463 and NAP1/027 Share Similar Substrate Profile and Cellular Intoxication Kinetics but Use Different Host Cell Entry Factors. *Toxins*, 11(6), 348. <https://doi.org/10.3390/toxins11060348>
- López-Ureña, D., Quesada-Gómez, C., Montoya-Ramírez, M., del Mar Gamboa-Coronado, M., Somogyi, T., Rodríguez, C., & Rodríguez-Cavallini, E. (2016). Predominance and high antibiotic resistance of the emerging *Clostridium difficile* genotypes NAP_{CR1} and NAP9 in a Costa Rican hospital over a 2-year period without outbreaks. *Emerging Microbes & Infections*, 5(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/emi.2016.38>
- Lyerly, D. M., Phelps, C. J., Toth, J., & Wilkins, T. D. (1986). Characterization of toxins A and B of *Clostridium difficile* with monoclonal antibodies. *Infection and Immunity*, 54(1), 70–76. <https://doi.org/10.1128/iai.54.1.70-76.1986>
- Lyerly, D. M., Saum, K. E., MacDonald, D. K., & Wilkins, T. D. (1985a). Effects of *Clostridium difficile* toxins given intragastrically to animals. *Infection and Immunity*, 47(2), Art. 2. <https://doi.org/10.1128/iai.47.2.349-352.1985>

- Lyerly, D. M., Saum, K. E., MacDonald, D. K., & Wilkins, T. D. (1985b). Effects of *Clostridium difficile* toxins given intragastrically to animals. *Infection and Immunity*, 47(2), 349–352. <https://doi.org/10.1128/iai.47.2.349-352.1985>
- Lyras, D., O'Connor, J. R., Howarth, P. M., Sambol, S. P., Carter, G. P., Phumoonna, T., Poon, R., Adams, V., Vedantam, G., Johnson, S., Gerding, D. N., & Rood, J. I. (2009). Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. *Nature*, 458(7242), 1176–1179. <https://doi.org/10.1038/nature07822>
- Mahida, Y. R., Makh, S., Hyde, S., Gray, T., & Borriello, S. P. (1996). Effect of *Clostridium difficile* toxin A on human intestinal epithelial cells: Induction of interleukin 8 production and apoptosis after cell detachment. *Gut*, 38(3), 337–347. <https://doi.org/10.1136/gut.38.3.337>
- Markham, N. O., Bloch, S. C., Shupe, J. A., Laubacher, E. N., Thomas, A. K., Kroh, H. K., Childress, K. O., Peritore-Galve, F. C., Washington, M. K., Coffey, R. J., & Lacy, D. B. (2021). Murine Intrarectal Instillation of Purified Recombinant *Clostridioides difficile* Toxins Enables Mechanistic Studies of Pathogenesis. *Infection and Immunity*, 89(4), e00543-20. <https://doi.org/10.1128/IAI.00543-20>
- McDonald, L. C., Killgore, G. E., Thompson, A., Owens, R. C., Kazakova, S. V., Sambol, S. P., Johnson, S., & Gerding, D. N. (2005). An Epidemic, Toxin Gene–Variant Strain of *Clostridium difficile*. *New England Journal of Medicine*, 353(23), 2433–2441. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa051590>
- McPhail, L. C., Clayton, C. C., & Snyderman, R. (1984). The NADPH oxidase of human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for regulation by multiple signals. *The Journal of Biological Chemistry*, 259(9), 5768–5775.
- Medzhitov, R. (2010). Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell*, 140(6), 771–776. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.006>
- Mestas, J., & Hughes, C. C. W. (2004). Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *The Journal of Immunology*, 172(5), 2731–2738. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.2731>
- Mitchell, T. J., Ketley, J. M., Haslam, S. C., Stephen, J., Burdon, D. W., Candy, D. C., & Daniel, R. (1986). Effect of toxin A and B of *Clostridium difficile* on rabbit ileum and colon. *Gut*, 27(1), 78–85. <https://doi.org/10.1136/gut.27.1.78>
- Mogensen, T. H. (2009). Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(2), 240–273. <https://doi.org/10.1128/CMR.00046-08>
- Na, X., Zhao, D., Koon, H. W., Kim, H., Husmark, J., Moyer, M. P., Pothoulakis, C., & Lamont, J. T. (2005). *Clostridium difficile* toxin B activates the EGF receptor and the ERK/MAP kinase pathway in human colonocytes. *Gastroenterology*, 128(4), 1002–1011. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.01.053>
- Nathan, C., & Ding, A. (2010). Nonresolving Inflammation. *Cell*, 140(6), 871–882. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.029>
- Nauseef, W. M., & Borregaard, N. (2014). Neutrophils at work. *Nature Immunology*, 15(7), 602–611. <https://doi.org/10.1038/ni.2921>
- Navarro, M. A., & Uzal, F. A. (2020). Pathobiology and diagnosis of clostridial hepatitis in animals. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 32(2), 192–202. <https://doi.org/10.1177/1040638719886567>
- Ng, E. K., Panesar, N., Longo, W. E., Shapiro, M. J., Kaminski, D. L., Tolman, K. C., & Mazuski, J. E. (2003a). Human intestinal epithelial and smooth muscle cells are

- potent producers of IL-6. *Mediators of Inflammation*, 12(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1080/0962935031000096917>
- Ng, E. K., Panesar, N., Longo, W. E., Shapiro, M. J., Kaminski, D. L., Tolman, K. C., & Mazuski, J. E. (2003b). Human intestinal epithelial and smooth muscle cells are potent producers of IL-6. *Mediators of Inflammation*, 12(1), 3–8. <https://doi.org/10.1080/0962935031000096917>
- Nicholas, A., Jeon, H., Selasi, G. N., Na, S. H., Kwon, H. I., Kim, Y. J., Choi, C. W., Kim, S. I., & Lee, J. C. (2017). Clostridium difficile -derived membrane vesicles induce the expression of pro-inflammatory cytokine genes and cytotoxicity in colonic epithelial cells in vitro. *Microbial Pathogenesis*, 107, 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.03.006>
- O'Neill, L. A. J., & Dinarello, C. A. (2000). The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: Crucial receptors for inflammation and host defense. *Immunology Today*, 21(5), 206–209. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(00\)01611-X](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(00)01611-X)
- Ostanin, D. V., Kurmaeva, E., Furr, K., Bao, R., Hoffman, J., Berney, S., & Grisham, M. B. (2012). Acquisition of Antigen-Presenting Functions by Neutrophils Isolated from Mice with Chronic Colitis. *The Journal of Immunology*, 188(3), 1491–1502. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102296>
- Otten, M. A., Rudolph, E., Dechant, M., Tuk, C. W., Reijmers, R. M., Beelen, R. H. J., van de Winkel, J. G. J., & van Egmond, M. (2005). Immature Neutrophils Mediate Tumor Cell Killing via IgA but Not IgG Fc Receptors. *The Journal of Immunology*, 174(9), 5472–5480. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.9.5472>
- Ouellette, A. J., & Selsted, M. E. (1996). Paneth cell defensins: Endogenous peptide components of intestinal host defense. *The FASEB Journal*, 10(11), 1280–1289. <https://doi.org/10.1096/fasebj.10.11.8836041>
- Pawlowski, S. W., Calabrese, G., Kolling, G. L., Freire, R., AlcantaraWarren, C., Liu, B., Sartor, R. B., & Guerrant, R. L. (2010). Murine Model of Clostridium difficile Infection with Aged Gnotobiotic C57BL/6 Mice and a BI/NAP1 Strain. *The Journal of Infectious Diseases*, 202(11), 1708–1712. <https://doi.org/10.1086/657086>
- Péchiné, S., & Collignon, A. (2016). Immune responses induced by Clostridium difficile. *Anaerobe*, 41, 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.04.014>
- Pelletier, M., Bouchard, A., & Girard, D. (2004). In Vivo and In Vitro Roles of IL-21 in Inflammation. *The Journal of Immunology*, 173(12), 7521–7530. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.12.7521>
- Pelletier, M., & Girard, D. (2007). Biological Functions of Interleukin-21 and Its Role in Inflammation. *The Scientific World JOURNAL*, 7, 1715–1735. <https://doi.org/10.1100/tsw.2007.275>
- Pepin, J., Truc Vo, T., Boutros, M., Marcotte, E., Dial, S., Dubé, S., Vasilevsky, C.-A., McFadden, N., Patino, C., & Labbé, A.-C. (2009). Risk Factors for Mortality Following Emergency Colectomy for Fulminant Clostridium difficile Infection. *Diseases of the Colon & Rectum*, 52(3), 400–405. <https://doi.org/10.1007/DCR.0b013e31819a69aa>
- Peritore-Galve, F. C., Shupe, J. A., Cave, R. J., Childress, K. O., Washington, M. K., Kuehne, S. A., & Lacy, D. B. (2022). Glucosyltransferase-dependent and independent effects of Clostridioides difficile toxins during infection. *PLOS Pathogens*, 18(2), e1010323. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010323>

- Poutanen, S. M. (2004). Clostridium difficile-associated diarrhea in adults. *Canadian Medical Association Journal*, 171(1), 51–58. <https://doi.org/10.1503/cmaj.1031189>
- Predrag, S. (2016). Analysis of risk factors and clinical manifestations associated with Clostridium difficile disease in Serbian hospitalized patients. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(4), 902–910. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.07.011>
- Pruitt, R. N., & Lacy, D. B. (2012). Toward a structural understanding of Clostridium difficile toxins A and B. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00028>
- Quesada-Gómez, C., López-Ureña, D., Acuña-Amador, L., Villalobos-Zúñiga, M., Du, T., Freire, R., Guzmán-Verri, C., Gamboa-Coronado, M. del M., Lawley, T. D., Moreno, E., Mulvey, M. R., Brito, G. A. de C., Rodríguez-Cavallini, E., Rodríguez, C., & Chaves-Olarte, E. (2015). Emergence of an Outbreak-Associated Clostridium difficile Variant with Increased Virulence. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(4), 1216–1226. <https://doi.org/10.1128/JCM.03058-14>
- Quesada-Gómez, C., López-Ureña, D., Chumbler, N., Kroh, H. K., Castro-Peña, C., Rodríguez, C., Orozco-Aguilar, J., González-Camacho, S., Rucavado, A., Guzmán-Verri, C., Lawley, T. D., Lacy, D. B., & Chaves-Olarte, E. (2016). Analysis of TcdB Proteins within the Hypervirulent Clade 2 Reveals an Impact of RhoA Glucosylation on Clostridium difficile Proinflammatory Activities. *Infection and Immunity*, 84(3), 856–865. <https://doi.org/10.1128/IAI.01291-15>
- Quesada-Gómez, C., Mulvey, M. R., Vargas, P., del MAR GAMBOA-CORONADO, M., Rodríguez, C., & Rodríguez-Cavillini, E. (2013). Isolation of a Toxigenic and Clinical Genotype of Clostridium difficile in Retail Meats in Costa Rica. *Journal of Food Protection*, 76(2), 348–351. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-169>
- Rehli, M. (2002). Of mice and men: Species variations of Toll-like receptor expression. *Trends in Immunology*, 23(8), 375–378. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(02\)02259-7](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(02)02259-7)
- Reinecker, H. C., Steffen, M., Doehn, C., Petersen, J., Pflüger, I., Voss, A., & Raedler, A. (1991). Proinflammatory cytokines in intestinal mucosa. *Immunologic Research*, 10(3–4), 247–248. <https://doi.org/10.1007/BF02919700>
- Risso, A. (2000). Leukocyte antimicrobial peptides: Multifunctional effector molecules of innate immunity. *Journal of Leukocyte Biology*, 68(6), 785–792.
- Rodríguez, C., Bouchafa, L., Soumillion, K., Ngyuvula, E., Taminiau, B., Van Broeck, J., Delmée, M., & Daube, G. (2019). Seasonality of Clostridium difficile in the natural environment. *Transboundary and Emerging Diseases*, 66(6), 2440–2449. <https://doi.org/10.1111/tbed.13301>
- Rosales, C. (2018). Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? *Frontiers in Physiology*, 9, 113. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00113>
- Rucavado, A., Soto, M., Kamiguti, A., Theakston, D., Fox, J., Escalante, T., & Gutiérrez, J. M. (2001). Characterization of Aspercetín, a Platelet Aggregating Component from the Venom of the Snake Bothrops asper which Induces Thrombocytopenia and Potentiates Metalloproteinase-induced Hemorrhage. *Thrombosis and Haemostasis*, 85(04), 710–715. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1615657>
- Rupnik, M., Wilcox, M. H., & Gerding, D. N. (2009). Clostridium difficile infection: New developments in epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 7(7), 526–536. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2164>

- Russell, E. S. (1985). A HISTORY OF MOUSE GENETICS. *Annual Review of Genetics*, 19(1), 1–29. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.19.120185.000245>
- Ryan, A., Lynch, M., Smith, S. M., Amu, S., Nel, H. J., McCoy, C. E., Dowling, J. K., Draper, E., O'Reilly, V., McCarthy, C., O'Brien, J., Ní Eidhin, D., O'Connell, M. J., Keogh, B., Morton, C. O., Rogers, T. R., Fallon, P. G., O'Neill, L. A., Kelleher, D., & Loscher, C. E. (2011). A Role for TLR4 in Clostridium difficile Infection and the Recognition of Surface Layer Proteins. *PLoS Pathogens*, 7(6), e1002076. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002076>
- Samra, Z., Talmor, S., & Bahar, J. (2002). High prevalence of toxin A-negative toxin B-positive Clostridium difficile in hospitalized patients with gastrointestinal disease. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 43(3), 189–192. [https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(02\)00400-5](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(02)00400-5)
- Sawant, K. V., Poluri, K. M., Dutta, A. K., Sepuru, K. M., Troshkina, A., Garofalo, R. P., & Rajarathnam, K. (2016a). Chemokine CXCL1 mediated neutrophil recruitment: Role of glycosaminoglycan interactions. *Scientific Reports*, 6(1), 33123. <https://doi.org/10.1038/srep33123>
- Sawant, K. V., Poluri, K. M., Dutta, A. K., Sepuru, K. M., Troshkina, A., Garofalo, R. P., & Rajarathnam, K. (2016b). Chemokine CXCL1 mediated neutrophil recruitment: Role of glycosaminoglycan interactions. *Scientific Reports*, 6(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/srep33123>
- Scapini, P., & Cassatella, M. A. (2014). Social networking of human neutrophils within the immune system. *Blood*, 124(5), 710–719. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-03-453217>
- Schwan, C., Stecher, B., Tzivelekidis, T., van Ham, M., Rohde, M., Hardt, W.-D., Wehland, J., & Aktories, K. (2009). Clostridium difficile Toxin CDT Induces Formation of Microtubule-Based Protrusions and Increases Adherence of Bacteria. *PLoS Pathogens*, 5(10), e1000626. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000626>
- Semple, J. W., Aslam, R., Kim, M., Speck, E. R., & Freedman, J. (2007). Platelet-bound lipopolysaccharide enhances Fc receptor-mediated phagocytosis of IgG-opsonized platelets. *Blood*, 109(11), 4803–4805. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-12-062695>
- Shea-Donohue, T., Thomas, K., Cody, M. J., Aiping Zhao, DeTolla, L. J., Kopydlowski, K. M., Fukata, M., Lira, S. A., & Vogel, S. N. (2008). Mice deficient in the CXCR2 ligand, CXCL1 (KC/GRO- α), exhibit increased susceptibility to dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis. *Innate Immunity*, 14(2), 117–124. <https://doi.org/10.1177/1753425908088724>
- Shen, E., Zhu, K., Li, D., Pan, Z., Luo, Y., Bian, Q., He, L., Song, X., Zhen, Y., Jin, D., & Tao, L. (2020). Subtyping analysis reveals new variants and accelerated evolution of Clostridioides difficile toxin B. *Communications Biology*, 3(1), 347. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-1078-y>
- Silva, M. T., & Correia-Neves, M. (2012). Neutrophils and Macrophages: The Main Partners of Phagocyte Cell Systems. *Frontiers in Immunology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00174>
- Songer, J. G., & Anderson, M. A. (2006). Clostridium difficile: An important pathogen of food animals. *Anaerobe*, 12(1), 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2005.09.001>
- Souza, M. H. L. P., Melo-Filho, A. A., Rocha, M. F. G., Lyerly, D. M., Cunha, F. Q., Lima, A. A. M., & Ribeiro, R. A. (1997). The involvement of macrophage-derived tumour

- necrosis factor and lipoxygenase products on the neutrophil recruitment induced by *Clostridium difficile* toxin B. *Immunology*, 91(2), 281–288. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1997.00243.x>
- Steiner, T. S., Flores, C. A., Pizarro, T. T., & Guerrant, R. L. (1997a). Fecal lactoferrin, interleukin-1beta, and interleukin-8 are elevated in patients with severe *Clostridium difficile* colitis. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, 4(6), Art. 6. <https://doi.org/10.1128/cdli.4.6.719-722.1997>
- Steiner, T. S., Flores, C. A., Pizarro, T. T., & Guerrant, R. L. (1997b). Fecal lactoferrin, interleukin-1beta, and interleukin-8 are elevated in patients with severe *Clostridium difficile* colitis. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, 4(6), 719–722. <https://doi.org/10.1128/cdli.4.6.719-722.1997>
- Sullivan, G. W., Rieger, J. M., Michael Scheld, W., Macdonald, T. L., & Linden, J. (2001). Cyclic AMP-dependent inhibition of human neutrophil oxidative activity by substituted 2-propynylcyclohexyl adenosine A_{2A} receptor agonists: Anti-inflammatory 2-propynylcyclohexyl-adenosines. *British Journal of Pharmacology*, 132(5), 1017–1026. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703893>
- Sun, X., & Hirota, S. A. (2015). The roles of host and pathogen factors and the innate immune response in the pathogenesis of *Clostridium difficile* infection. *Molecular Immunology*, 63(2), 193–202. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2014.09.005>
- Sun, X., Savidge, T., & Feng, H. (2010). The Enterotoxicity of *Clostridium difficile* Toxins. *Toxins*, 2(7), 1848–1880. <https://doi.org/10.3390/toxins2071848>
- Sun, X., Wang, H., Zhang, Y., Chen, K., Davis, B., & Feng, H. (2011). Mouse Relapse Model of *Clostridium difficile* Infection. *Infection and Immunity*, 79(7), 2856–2864. <https://doi.org/10.1128/IAI.01336-10>
- Tamassia, N., Zimmermann, M., Castellucci, M., Ostuni, R., Bruderek, K., Schilling, B., Brandau, S., Bazzoni, F., Natoli, G., & Cassatella, M. A. (2013). Cutting Edge: An Inactive Chromatin Configuration at the IL-10 Locus in Human Neutrophils. *The Journal of Immunology*, 190(5), 1921–1925. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203022>
- Tecchio, C., Micheletti, A., & Cassatella, M. A. (2014). Neutrophil-Derived Cytokines: Facts Beyond Expression. *Frontiers in Immunology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00508>
- Tenover, F. C., Akerlund, T., Gerding, D. N., Goering, R. V., Bostrom, T., Jonsson, A.-M., Wong, E., Wortman, A. T., & Persing, D. H. (2011). Comparison of Strain Typing Results for *Clostridium difficile* Isolates from North America. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(5), 1831–1837. <https://doi.org/10.1128/JCM.02446-10>
- The Lancet Infectious Diseases. (2019). *C difficile*—A rose by any other name.... *The Lancet Infectious Diseases*, 19(5), 449. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30177-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30177-X)
- Triadafilopoulos, G., Pothoulakis, C., O'Brien, M. J., & LaMont, J. T. (1987a). Differential effects of *Clostridium difficile* toxins A and B on rabbit ileum. *Gastroenterology*, 93(2), Art. 2. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(87\)91014-6](https://doi.org/10.1016/0016-5085(87)91014-6)
- Triadafilopoulos, G., Pothoulakis, C., O'Brien, M. J., & LaMont, J. T. (1987b). Differential effects of *Clostridium difficile* toxins A and B on rabbit ileum. *Gastroenterology*, 93(2), 273–279. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(87\)91014-6](https://doi.org/10.1016/0016-5085(87)91014-6)
- Triadafilopoulos, G., Pothoulakis, C., Weiss, R., Giampaolo, C., & LaMont, J. T. (1989). Comparative study of *Clostridium difficile* toxin a and cholera toxin in rabbit ileum.

- Gastroenterology*, 97(5), 1186–1192. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(89\)91689-2](https://doi.org/10.1016/0016-5085(89)91689-2)
- Ulfig, A., & Leichert, L. I. (2021). The effects of neutrophil-generated hypochlorous acid and other hypohalous acids on host and pathogens. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78(2), 385–414. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03591-y>
- van de Veerdonk, F. L., Netea, M. G., Dinarello, C. A., & Joosten, L. A. B. (2011). Inflammasome activation and IL-1 β and IL-18 processing during infection. *Trends in Immunology*, 32(3), 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.01.003>
- Villalobos-Zúñiga, M. A., & Boza-Cordero, R. (2012). *Epidemiologic, clinical, and microbiologic description of an outbreak of Clostridium difficile associated diarrhea in Costa Rica*. 54(n.3), 152–158.
- Vohra, P., & Poxton, I. R. (2012a). Induction of cytokines in a macrophage cell line by proteins of *Clostridium difficile*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 65(1), 96–104. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00952.x>
- Vohra, P., & Poxton, I. R. (2012b). Induction of cytokines in a macrophage cell line by proteins of *Clostridium difficile*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 65(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00952.x>
- Voth, D. E., & Ballard, J. D. (2005). *Clostridium difficile* Toxins: Mechanism of Action and Role in Disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(2), 247–263. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.2.247-263.2005>
- Warren, C. A., Li, Y., Calabrese, G. M., Freire, R. S., Zaja-Milatovic, S., van Opstal, E., Figler, R. A., Linden, J., & Guerrant, R. L. (2012). Contribution of Adenosine A_{2B} Receptors in *Clostridium difficile* Intoxication and Infection. *Infection and Immunity*, 80(12), 4463–4473. <https://doi.org/10.1128/IAI.00782-12>
- Waters, E. H., Orr, J. P., Clark, E. G., & Schaufele, C. M. (1998). Typhlocolitis Caused by *Clostridium Difficile* in Suckling Piglets. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 10(1), 104–108. <https://doi.org/10.1177/104063879801000122>
- Wershil, B. K., Castagliuolo, I., & Pothoulakis, C. (1998). Direct evidence of mast cell involvement in *Clostridium difficile* toxin a—Induced enteritis in mice☆☆☆. *Gastroenterology*, 114(5), 956–964. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(98\)70315-4](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(98)70315-4)
- Yoshino, Y., Kitazawa, T., Ikeda, M., Tatsuno, K., Yanagimoto, S., Okugawa, S., Yotsuyanagi, H., & Ota, Y. (2013). *Clostridium difficile* flagellin stimulates toll-like receptor 5, and toxin B promotes flagellin-induced chemokine production via TLR5. *Life Sciences*, 92(3), 211–217. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2012.11.017>
- Zhang, Y., Yang, Z., Gao, S., Hamza, T., Yfantis, H. G., Lipsky, M., & Feng, H. (2017). The role of purified *Clostridium difficile* glucosylating toxins in disease pathogenesis utilizing a murine cecum injection model. *Anaerobe*, 48, 249–256. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.10.006>
- Zschaler, J., Schlorke, D., & Arnhold, J. (2014). Differences in innate immune response between man and mouse. *Critical Reviews in Immunology*, 34(5), 433–454.
- Zumbado-Salas, R., Gamboa-Coronado, M. del M., Rodríguez-Cavallini, E., & Chaves-Olarte, E. (2008). *Clostridium difficile* in adult patients with nosocomial diarrhea in a Costa Rican hospital. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 79(2), 164–165.

8. ANEXOS

8.1 Anexo 1



CICUA Comité Institucional de
Cuido y Uso de Animales

17 de junio de 2021
CICUA-043-2021

Dr. Carlos Quesada Gómez
Facultad de Microbiología

Estimado señor:

El Comité Institucional de Cuido y Uso de Animales (CICUA), en su sesión ordinaria 217-2021, realizada el 10 de junio del 2021, se valoró el proyecto “Evaluación del papel de los neutrófilos en la patología producida por *Clostridioides (Clostridium) difficile* en un modelo murino”.

El Comité aprueba el proyecto.

Atentamente,

SARA MARIA
GONZALEZ
CAMACHO (FIRMA)

Firmado digitalmente por
SARA MARIA GONZALEZ
CAMACHO (FIRMA)
Fecha: 2022.01.19 15:17:04
-06'00'

Dra. Sara González Camacho
Coordinadora

NGS

C. Dra. María Laura Arias, Vicerrectora de Investigación
Archivo

8.2 Anexo 2

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA FINES DE INVESTIGACIÓN

“Evaluación del papel de los neutrófilos (PMNs) en la patología producida por *Clostridioides (Clostridium) difficile* utilizando en un biomodelo murino”

Este es un consentimiento informado para el uso de muestras sanguíneas en la investigación del Evaluación del papel de los neutrófilos (PMNs) en la patología producida por *Clostridioides (Clostridium) difficile* utilizando dos biomodelos murinos, las cuales serán donadas voluntariamente por mi persona.

Yo, Brayan Diddey Montoya Torres, con No. de DIMEX 134000575114, estudiante de la Maestría en Enfermedades Tropicales (PCVET) de la Escuela de Medicina Veterinaria en la Universidad Nacional, realizaré un proyecto de investigación sobre el rol de los PMNs en la patología causada por las toxinas A (TcdA) y toxina B (TcdB) de *C. difficile* utilizando el biomodelo de asa intestinal ligada murina con un modelo de ratones neutropénicos, asimismo evaluaremos la capacidad fagocítica (asociación) entre PMNs de humanos y murinos diseñando ensayos in vitro utilizando sangre periférica. Esta bacteria es la causa más común de infecciones intrahospitalarias de diarreas asociadas a antibióticos en Costa Rica y a nivel mundial. Y es considera un potencial agente zoonótico. Se caracteriza por provocar pseudomembranas a nivel intestinal compuestas principalmente por neutrófilos (PMNs). Por esto, consideramos de suma importancia la exploración y evaluación de la relación de asociación entre los sobrenadantes bacterianos de *C. difficile* en la actividad inmune de estas células sanguíneas.

Las muestras sanguíneas serán utilizadas a modo de reactivo en los experimentos, por lo tanto, no estaré bajo ningún tratamiento más que el de la colecta de sangre. Para el día de la colecta, me presentaré únicamente si estoy saludable, sin presentar síntomas ni signos de enfermedad, ni haber recibido inmunizaciones recientes; tampoco puedo encontrarme bajo terapia medicamentosa. Se prefiere la utilización de muestras de un solo individuo para disminuir la variabilidad entre ensayos. Se colectarán de 3 a 6 ml para cada muestra a partir de la vena cefálica en tubo de heparina de sodio o litio. Este proceso se realizará por triplicado para cada experimento.

Como donador soy consciente de las consecuencias que conlleva el procedimiento. Reconozco que las posibles consecuencias de la punción venosa son mínimas como una posible infección y/o un hematoma. Para esto, se tomarán todas las medidas de precaución necesarias para prevenir cualquier secuela negativa, como un procedimiento aséptico realizado por un microbiólogo. En caso de sufrir algún efecto secundario, se utilizará terapia medicamentosa proporcionada por el Laboratorio de Bacteriología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la UNA para disminuir la reacción. El beneficio de la participación es cooperar con el avance de esta investigación y no habrá recompensa monetaria por ello. Al ser participación voluntaria, reconozco que puedo dejar de participar en cualquier momento y mis derechos serán respetados por ello. Las muestras de sangre serán utilizadas en cada ensayo ser intoxicadas con los sobrenadantes de *C. difficile* y la muestra sobrante será desechada, así como también se desechará lo utilizado en el ensayo una vez sea finalizado. La información recogida por este proyecto se mantendrá confidencial.

El proyecto se realizará en el laboratorio de Bacteriología en la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional, y será supervisado por el coordinador de este laboratorio:

Elías Barquero Calvo, MQC, Ph.D.
Laboratorio de Bacteriología
PIET, Escuela de Medicina Veterinaria
Universidad Nacional
Teléfono: (506) 2562-4540
Fax: (506) 2261-0049
email: elias.barquero.calvo@una.cr

Yo, Brayan Diddey Montoya Torres, con No. de DIMEX 134000575114, soy consciente de la información proporcionada y accedo voluntariamente a ser participante de esta investigación. Entiendo que tengo el derecho de retirarme de la investigación en cualquier momento sin que me afecte en ninguna manera mi cuidado médico.

Firma: _____
Teléfono: (+506) 8395-1850
Correo: brayan.montoya.torres@est.una.ac.cr



UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
UNIVERSIDAD NACIONAL



Maestría en Bioética

otorga el presente certificado de aprovechamiento a:

Brayan Diddey Montoya Torres



Por haber cumplido con los requisitos establecidos en el curso virtual-presencial V-BPI-103

Buenas Prácticas Clínicas (investigación intervencional)

Aprobado por el CONIS en su sesión No. 112, del 28 junio de 2017.

Impartido en UNA Virtual Educación Permanente del 30 de septiembre al 06 de noviembre 2019,
con sesiones presenciales los días 30 de septiembre y 28 de octubre de 2019, duración efectiva 36 horas.
Obtuvo una calificación de 93.

M.Sc. Rocío Loria Bolaños
Coordinadora General
Maestría en Bioética, UNA



Dr. Allan González Estrada
Director
Escuela Filosofía, UNA

Tomo 1

Folio 3

Asiento 2044