



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

Evaluación del daño provocado en células epiteliales por la
toxina A de C. difficile mediante ensayos
espectrofluorométricos usando Bisbenzamidias y MTT.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A
ALMA OLIVIA MONROY LOPEZ



MEXICO, D. F.

1896

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

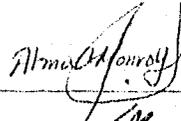
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente **Prof. LOPEZ LOPEZ MARISOL**
Vocal **Prof. ENCISO MORENO JOSE ANTONIO**
Secretario **Prof. GARCIA TAMAYO FERNANDO**
1er suplente **Prof. ROSALES OLIVARES ARTURO VICTOR**
2er suplente **Prof. LOPEZ MACIAS CONSTANTINO III ROBERTO**

Sitio donde se desarrolló el tema: **Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría, CMN Siglo XXI, IMSS.**

Sustentante: **Monroy López Alma Olivia.**



Asesor: **Dr. José Antonio Enciso Moreno.**



AGRADECIMIENTOS

A mi madre a mi padre (Herminia y Cirilo)

a mis hermanos (Miguel y la bonita Anita)

mi familia pilar de mi carrera

con todo mi amor

A mis queridos e inolvidables

abuelitos Consuelo y Napoleón

que en algún lugar del cielo verán con alegría

coronar mi esfuerzo

A Antonio mi exigente y brillante asesor

mi gratitud por guíarme en el camino del saber

A mis sinodales
Profesores Marisol López I. y
Fernando García T.

muchas gracias por su apoyo

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

por el apoyo económico brindado

A la Facultad de Química de la UNAM
el Centro Médico Nacional siglo XXI, IMSS
instituciones orgullo de México

Al Dr. J. Torres, a Carmen Linares

Al Dr. R. Cedillo

A Mauricio S. y a Juan Manuel G. por su apoyo técnico

A los Dra. Marcelino Cerejido y Refugio García

A todos ellos infinitamente - GRACIAS - por las facilidades

concedidas a lo largo de mi tesis

ABREVIATURAS

CCM- Células cebadas de mucosa intestinal

CCTC- Células cebadas de tejido conectivo.

CDC- Agar sangre para anaerobios.

ECP- Efecto citopátogenico.

FECC- Factor estimulador precursor de diferenciación y crecimiento de células cebadas.

GM-CSF- Factor estimulador de colonias de macrófagos-granulocitos.

H33258- Bisbenzamida Hoechst 33258.

H33342- Bisbenzamida Hoechst 33342.

IgA- Inmunoglobulina A.

IgG- Inmunoglobulina G.

IgM- Inmunoglobulina M

IgE- Inmunoglobulina E.

IL- Interleucinas.

IFN- γ - Interferon gama.

LC4- Leucotrieno C 4.

MTT- (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-bromuro 2,5-difenil tetrazolo).

PAF- Factor activador de plaquetas.

PEA- Agar sangre alcohol feniletílico.

PGD2- Protanglandina D 2.

PMS- Sulfato de fencina.

R.I. Respuesta Inflamatoria.

SII- Síndrome de inflamación intestinal.

T.A.- Temperatura ambiente.

TNF- α - Factor de necrosis tumoral alfa.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.-	Aspectos fisiopatológicos de la liberación de mediadores de respuesta inflamatoria.	27
Figura 2.-	Participación de mediadores de respuesta inflamatoria a nivel intestinal.	30
Figura 3.-	Interacción bioquímica entre la sal de MTT y el PMS	35

INDICE DE TABLAS

1.-	Efecto de diferentes concentraciones de toxina A de <u>C.difficile</u> sobre células IEC-18 y HRMC.	53
2.-	Evaluación de viabilidad celular en células IEC-18 y HRMC tratadas con diferentes concentraciones de toxina A de <u>C.difficile</u> a las 4 horas y 24 horas utilizando azul tripano.	54
3.-	Evaluación de viabilidad celular en células HRMC tratadas con diferentes concentraciones de toxina A de <u>C.difficile</u> a las 4 horas utilizando bisbenzamidias.	56
4.-	Evaluación de viabilidad celular en células HRMC tratadas con diferentes concentraciones de toxina A de <u>C.difficile</u> a las 24 horas utilizando bisbenzamidias.	57
5.-	Evaluación de viabilidad celular en células IEC-18 y HRMC tratadas con diferentes concentraciones de toxina A de <u>C.difficile</u> a las 4 horas utilizando la sal de MTT.	59
6.-	Evaluación de viabilidad celular de células IEC-18 tratadas con toxina A de <u>C.difficile</u> y con Histamina.	62

7.- Evaluación de viabilidad celular de células IEC-18 tratadas con toxina A de <i>C.difficile</i> y con PAF.	63
8.- Evaluación de viabilidad celular de células IEC-18 tratadas con toxina A de <i>C.difficile</i> y con TNF-alfa.	64
9.- Evaluación de viabilidad celular de células IEC-18 tratadas con toxina A de <i>C.difficile</i> y con diferentes mediadores de respuesta inflamatoria.	65

INDICE

1.	INTRODUCCION	Pagina
1.1.	Objetivos.	3
1.2.	Justificación.	4
2.	ANTECEDENTES	
2.1.	Generalidades.	5
2.2.	Taxonomía de <i>Clostridium difficile</i> .	8
2.3.	Crecimiento e identificación de <i>Clostridium difficile</i> .	8
2.4.	Sintomatología causada por <i>Clostridium difficile</i> .	11
	2.4.1. Mecanismos patofisiológicos	12
2.5.	Factores de virulencia de <i>Clostridium difficile</i> .	14
	2.5.1. Efecto citotóxico de la toxina A.	15
	2.5.2. Efecto de la toxina A a nivel intestinal.	20
2.6.	Biología de las células cebadas.	22
	2.6.1. Modulación de la función de las células cebadas en el tracto gastrointestinal	24
	2.6.1.1. Implicaciones de las células cebadas en la diarrea inflamatoria.	26
	2.6.2. Mediadores liberados por las células cebadas.	27
2.7.	Métodos usados para evaluar la viabilidad celular.	31
3.	MATERIAL Y METODOS.	
3.1.	Líneas celulares.	40
3.2.	Cultivo de líneas celulares.	40
3.3.	Congelamiento y descongelamiento de líneas celulares.	42
3.4.	Evaluación de la citotoxicidad en líneas celulares IEC-18 y IIRMC tratadas con toxina A de <i>Clostridium difficile</i> .	43

3.4.1	Evaluación de la viabilidad celular en líneas celulares IEC-18 y HRMC tratadas con toxina A de <u>C. difficile</u> usando Hoechst 33258 y 33342	44
3.4.2	Evaluación de la viabilidad celular en líneas celulares IEC-18 y HRMC tratadas con toxina A de <u>C. difficile</u> usando MTT	47
3.4.3	Evaluación de la viabilidad celular <u>in vitro</u> en células IEC-18 tratadas con toxina A de <u>C. difficile</u> en combinación con mediadores de respuesta inflamatoria.	49
3.5.	Análisis estadístico de los resultados.	50
4.	RESULTADOS.	
4.1.	Obtención de los porcentajes de redondeamiento de las células IEC-18 y HRMC tratadas con toxina A de <u>Clostridium difficile</u> .	51
4.2.	Evaluación de la viabilidad celular en células IEC-18 y HRMC tratadas con toxina A de <u>Clostridium difficile</u> utilizando las Bishenzamidas I133258 y I133342.	55
4.3.	Evaluación de la viabilidad celular en células IEC-18 y HRMC tratadas con toxina A de <u>Clostridium difficile</u> utilizando la sul de MTT.	58
4.4.	Evaluación de la viabilidad celular en células IEC-18 tratadas con toxina A de <u>Clostridium difficile</u> y con mediadores de respuesta inflamatoria.	60
5.	DISCUSION.	66
6.	CONCLUSIONES.	72
7.	BIBLIOGRAFÍA	73
8.	APENDICE.	83

1. INTRODUCCIÓN

1.1. OBJETIVOS:

General:

Establecer un método fluorométrico de viabilidad celular para medir el efecto de la toxina A de *Clostridium difficile* y de mediadores de respuesta inflamatoria sobre células epiteliales intestinales y células cebadas.

Particulares:

- i) Establecer un método fluorométrico para cuantificar viabilidad de células epiteliales y células cebadas tratadas *in vitro* con toxina A de *Clostridium difficile*.
- ii) Establecer un método colorimétrico para cuantificar viabilidad de células epiteliales y células cebadas tratadas *in vitro* con toxina A de *Clostridium difficile*.
- iii) Analizar mediante un método fluorométrico la viabilidad de células epiteliales tratadas *in vitro* con mezclas de toxina A de *Clostridium difficile* y mediadores de respuesta inflamatoria.
- iv) Evaluar el efecto sinérgico de la combinación de toxina A de *Clostridium difficile* con tres mediadores de respuesta inflamatoria: Histamina, Factor Activador de Plaquetas (PAF) y Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α).

1.2. JUSTIFICACIÓN

Este trabajo representa una de las partes que componen un estudio en el cual se pretende analizar una enfermedad gastrointestinal llamada "colitis pseudomembranosa" que es ocasionada por la toxina A de Clostridium difficile, la cual ha sido poco estudiada en México.

En la actualidad sólo se cuenta con métodos cualitativos para medir el efecto de la toxina A de Clostridium difficile sobre diferentes blancos celulares. La estandarización de un método cuantitativo de viabilidad celular puede permitir evaluar más correctamente el efecto de dicha toxina y de otros factores de respuesta inflamatoria, sobre la viabilidad de células epiteliales intestinales.

La utilización de métodos de evaluación de viabilidad celular en general usando colorantes fluorescentes como las bisbenzamidas ha permitido en muchos otros sistemas celulares para la evaluación de efectos por drogas o compuestos tóxicos, nos puede permitir prescindir de la utilización de métodos radioactivos, alcanzando con los primeros excelentes niveles de sensibilidad en la detección de células viables.

Es por lo anterior que en este trabajo se estandarizaron las condiciones para medir la viabilidad celular de células epiteliales intestinales y células cebadas utilizando los colorantes H33258 y H33342 y la sal de MTT, como una alternativa a los métodos de evaluación de viabilidad celular por redondeamiento celular y de incorporación de timidina tritiada.

2. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades.

Desde el inicio del uso de antibióticos por vía oral se estableció que estos tienen efectos colaterales, siendo los trastornos gastrointestinales los más frecuentes.

El uso de antibióticos tiene un efecto que no se limita a la eliminación de los patógenos sino que además se extiende a la flora normal. Se ha sugerido que el cuerpo posee inherente a su función cerca de 1×10^4 células diferentes, de las cuales una décima parte pertenecen a la flora normal intestinal que vive en equilibrio con el organismo. Esta proporción de células no deja dudas de la importancia que tiene la microflora normal bacteriana en los eventos de salud y enfermedad.

La superficie luminal del tracto intestinal es el *hábitat* de la mayor parte de la flora intestinal y es además un ecosistema altamente susceptible al desequilibrio provocado por agentes antimicrobianos.

Los cambios en la flora intestinal debidos a una dieta o a una enfermedad que requiera el uso de antibióticos pueden en consecuencia, afectar la flora normal intestinal y favorecer la colonización de bacterias patógenas. Las más de las veces, estos efectos conducen a la presencia de diarrea, aunque en algunos casos más severos, aparecen hacia condiciones más peligrosas; un ejemplo de ello es la colitis intestinal, que puede terminar en un fenómeno de necrosis, el cual se conoce como síndrome de colitis pseudomembranosa. Esto, es una enfermedad en la cual el patrón de lesiones es tan característico que sirve de diagnóstico para la propia enfermedad.

Cuando se administra oralmente un antibiótico puede inhibirse la proliferación de los microorganismos presentes en el tracto gastrointestinal, produciendo la pérdida de bacterias preexistentes y la virtual esterilización del tracto digestivo. En ausencia de la flora normal, las condiciones microambientales del sistema digestivo cambian, ocurriendo crecimiento descontrolado de microorganismos tales como *Clostridium difficile*, lo cual puede provocar alteraciones en la función digestiva. En particular, *C.difficile* es considerado como un patógeno oportunista que afecta principalmente a los pacientes hospitalizados a los cuales se les ha suministrado un esquema de antibióticos. Así como otros agentes responsables de infecciones nosocomiales, *C.difficile* puede persistir por periodos prolongados sin actividad patogénica en la superficie del tejido gastrointestinal. También puede ser esparcido por el personal médico o por utensilios que no tienen un lavado adecuado o pobremente desinfectados (Kelly y cols,1994). Cuando las condiciones del microambiente presentes en el intestino grueso son estrictamente anaerobias, se favorece la proliferación de anaerobios obligados, los cuales son principalmente bacterias gram negativas en forma de bastones largos y delgados con extremos aplanados y a los cuales se les denomina fusiformes. Por tanto, en ausencia de la flora normal, las condiciones del intestino cambian y se instalan este tipo de microorganismos que son resistentes a los antibióticos aplicados y además son capaces de provocar alteraciones perjudiciales a la función digestiva. Así ocurre con el daño epitelial causado por *C. difficile* en el tracto gastrointestinal, el cual es considerable e irreversible. Cuando *C. difficile* es la causa de la enfermedad, ninguna otra bacteria ha sido observada invadiendo la mucosa intestinal (Bartlett,1990), lo cual sugiere que las exotoxinas producidas por este microorganismo son los mediadores más probables de la enfermedad.

Fue hasta el final de los años 70's que *C.difficile* fue reconocido como un agente etiológico en más del 90% de los casos de colitis pseudomembranosa (Bartlett,1990).

Los reportes de estudios anatómicos que indican daño por *C.difficile* comienzan con el reporte original de Finney en 1893 acerca de las lesiones pseudomembranosas en el tracto gastrointestinal. Fue hasta 1935 que se describe este microorganismo de manera formal por Hall y O'Toole. Estos autores denominaron a esta bacteria "difficult clostridium" por la dificultad en su aislamiento y por su lento crecimiento en medio de cultivo.

La colitis pseudomembranosa causada por *C.difficile* fue una condición relativamente rara en la era pre-antibiótica, pero llegó a ser una complicación común con el uso acentuado de antibióticos en la década de los años 50's. En el período de 1960 a 1970, la colitis pseudomembranosa se ubicó como uno de los mayores problemas clínicos, particularmente al ocurrir la introducción de los antibióticos de amplio espectro, tales como la lincomicina y la clindamicina. Tras algunos estudios, la colitis pseudomembranosa fue atribuida a isquemia mucosal o a una infección viral, hasta que Larson y cols. reportaron en 1977, que en las heces de pacientes afectados con *C.difficile* se presentaban cantidades de toxina elevadas, capaces de producir cambios citopáticos en células de cultivo.

Hoy se reconoce que la infección ocasionada por *C.difficile* es responsable virtualmente de todos los casos de colitis pseudomembranosa y de un 20% de los casos de diarrea y colitis asociada con antibióticos (Borriello y cols, 1990; Bartlett, 1990 y Kelly y cols, 1994).

En resumen, el uso indiscriminado de antibióticos puede alterar el equilibrio normal del tracto gastrointestinal, favoreciendo el desarrollo de bacterias patógenas u oportunistas capaces de producir cuadros clínicos severos tales como la colitis pseudomembranosa, la cual presenta como característica importante una respuesta inflamatoria severa y es producida principalmente por *C.difficile*.

2.2. Taxonomía de C.difficile

El género *Clostridium* consta de bacilos gram positivos a gram variables con flagelos que son generalmente móviles y peritricos. Los clostridios no producen catalasa y sólo producen bajos niveles de superóxido. Se piensa que una razón por la cual son anaerobios es que no tienen manera de librarse del H₂O₂ tóxico y del CO₂ producido a partir de oxígeno molecular. Los estudios taxonómicos moleculares del género *clostridium*, indican que las composiciones de bases de DNA presentan poca heterogeneidad, registrando valores de 23 a 50% de G-C, aunque la mayoría de las especies muestran valores entre 25 y 30% de G-C (Brock, 1994). Este género está clasificado de la siguiente manera :

FAMILIA: *Bacillacea*, género: *Clostridium*. Bacilos gram positivos, formás en uso de palillo de tambor o en raqueta de tenis, que forman esporas en condiciones anaerobias, localizadas centralmente, subterminalmente o terminalmente de forma ovalada o redonda dentro de la bacteria. Son termoresistentes; forman cápsula y son de movilidad variable. También tienen capacidad variable de reducir el nitrato (McFadin, 1995).

Los clostridios son bacterias que viven dentro de los límites de temperatura de 55 a 70°C, por lo tanto son organismos termófilos que crecen a temperaturas mayores de 45 a 50°C.

2.3. Crecimiento e identificación de C.difficile.

El aislamiento primario de *C.difficile* a partir de muestras fecales puede lograrse por técnicas de selección de esporas mediante alcohol y calor, utilizando medios de cultivo selectivos.

C. difficile crece en agar sangre para anaerobios (CDC) y en agar de yema de huevo. También puede aislarse a partir de muestras fecales, cultivándolas en agar que contiene cicloserina-cefoxitina-fructuosa, el cual es un medio selectivo para *C. difficile*. Las cepas de *C. difficile* también pueden crecer en caldo de infusión cerebro-corazón. Como una característica de *C. difficile*, las colonias no son hemolíticas cuando se incuban las muestras fecales por 48 hrs en agar sangre para anaerobios. Además presentan un tamaño de 2 a 4 mm de diámetro, con crecimiento de colonias ovaladas y planas formando bordes rizoides. Las colonias son grises, translúcidas y observadas al microscopio de disección exhiben un punteado interno cristalino e iridiscente. En agar yema de huevo son negativas para lecitinasa y lipasa. Además se pueden inocular en dos medios selectivos: PEA (agar sangre alcohol feniletílico) y agar fructuosa yema de huevo cefoxitina cicloserina, a partir de materia fecal no tratada. Las colonias de *C. difficile* en PEA son similares a las observadas en agar sangre. Luego de 48 horas de incubación en agar fructuosa yema de huevo con cefoxitina cicloserina, las colonias de *C. difficile* miden aproximadamente de 5 a 8 mm de diámetro y exhiben una fluorescencia verde amarillenta al usar luz UV de longitud de onda larga. Cuando se utiliza microscopía óptica se puede observar que las colonias son amarillentas, circulares o irregulares, planas, con borde rizoide y aspecto de vidrio esmerilado. La incubación de *C. difficile* en medios enriquecidos y selectivos es de 2 a 7 días a 35-37°C. La movilidad de *C. difficile* se puede demostrar mediante la preparación de un montaje húmedo de una colonia reciente o un cultivo en caldo (Lenette, 1994).

El análisis bioquímico de productos metabólicos de *C. difficile* exhibe típicamente la presencia de los ácidos acético, propiónico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico e isocaproico. El sistema de la placa presumptiva permite la rápida diferenciación de los clostridios en general y es una

forma práctica para separar *C.difficile* de otros clostridios. En este sistema, *C.difficile* hidroliza esculina y gelatina, siendo su actividad negativa para indol y nitrato. *C.difficile* es sacarolítico y es una de las pocas bacterias que fermentan manitol. Recientemente se ha utilizado una prueba de cromatografía líquido-gas, para identificar a *C.difficile* a partir de un cultivo en caldo tirosina-norleucina (Lenette, 1994).

Así también se han desarrollado algunos ensayos inmunoenzimáticos para detectar *C.difficile* en muestras fecales, o a las toxinas A y B que produce *C.difficile*. Este método tiene una sensibilidad del 69 al 87% y una especificidad del 99 a 100% (Bartlett, 1990 y Kelly y cols, 1993). La técnica de PCR también ha sido utilizada para este propósito (Gumerlack y cols, 1993).

En general la presencia de la enterotoxina (toxina A), en un extracto libre de células se correlaciona con la enfermedad intestinal mediada por *C.difficile*.

La prueba de neutralización de las toxinas A y B y el aislamiento e identificación del microorganismo, no prueban contundentemente que un paciente tenga enfermedad gastrointestinal por *C.difficile*, debido a que el microorganismo así como las toxinas producidas por éste pueden aislarse de las heces de individuos sanos, particularmente de niños o lactantes menores de un año o de pacientes internados sin evidencia clínica de esta afección, y que han sido colonizados asintóticamente por el microorganismo. Por lo cual se requiere de conjuntar varios parámetros clínicos (como es analizar la presencia de toxina B en muestras fecales, la capacidad de adhesión de la bacteria a la célula huésped, la producción de enzimas hidrolíticas, etc.) para garantizar la exactitud en el diagnóstico.

2.4. Sintomatología provocada por C. difficile

La sintomatología de la infección causada por C. difficile incluye en orden de severidad: colitis asociada a antibióticos sin formación de pseudomembrana y colitis fulminante. Afortunadamente la más severa de las formas es la menos común.

La infección por C. difficile presenta comúnmente diarrea que va de ligera a la moderada y es algunas veces acompañada con calambres abdominales. La colitis severa sin formación de pseudomembrana puede presentarse acompañada con diarrea profusa, dolor abdominal, distensión e hiperpirexia con temperaturas de hasta 41°C . También suele presentarse leucocitosis polimorfonuclear periférica por arriba de los 50,000/mm³ y con el incremento común de leucocitos en las heces. Así también el cuadro puede mostrar sangre oculta en el colon pero la hematocesia franca es rara (Bartlett, 1990).

Algunas complicaciones de la enfermedad crónica incluyen toxicidad en megacolon, desequilibrio electrolítico severo, perforación colónica o hipoalbuminemia con edema de la submucosa. Los pacientes con colitis ocasionada por C. difficile presentan ocasionalmente un abdomen agudo y fulminante, con peligro de muerte. Los pacientes presentan letargia, fiebre, taquicardia y dolor abdominal. El tono muscular colónico puede estar perdido como resultado de una dilatación toxica o megacolónica, condiciones que son también observadas en pacientes con colitis ulcerativa (Bartlett, 1990).

La colitis pseudomembranosa es la más dramática de las manifestaciones que provoca C. difficile. Esta tiene un cuadro similar a la colitis sin formación de pseudomembrana, pero sin presencia de diarrea, con dolores abdominales ligeros, exhibiendo síntomas sistémicos más marcados cuando la pseudomembrana está presente. La sigmoidoscopia o la colonoscopia revelan placas amarillas

adherentes características, que varían en diámetro desde 2 a 10 mm. La mucosa aparece normal, o en algunos casos se presenta únicamente una eritomatosis blanda. El recto y el colon sigmoide están típicamente involucrados, aunque al parecer la colitis está confinada al colon proximal.

2.4.1. Mecanismos patofisiológicos

La enfermedad entérica inducida por *C.difficile* presenta 4 componentes que son : a) Alteración en el mecanismo controlador de la población bacteriana normal en el lumen colónico. b) Presencia de una fuente de *C.difficile*, ya sea proveniente de la flora endógena o fuente exógena. c) Capacidad del microorganismo para la producción de toxinas, principalmente de la toxina A. d) Susceptibilidad del individuo para contraer la infección por *C.difficile*.

Las esporas de *C.difficile* son resistentes al calor y persisten en el medio ambiente por meses y hasta por años. Así la infección resulta de la ingestión oral de estas esporas, las cuales sobreviven al ambiente ácido del estómago y se convierten finalmente a las formas vegetativas en el colon. Durante un esquema severo de tratamiento con antibióticos y una vez que el intestino se ha hecho susceptible a la infección por *C.difficile*, la colonización por esta bacteria ocurre por la vía oral-fecal. Los antibióticos que dañan la microflora entérica implicados en la infección causada por *C.difficile* son los que han tenido mayor impacto en la flora colónica, como la clindamicina, la ampicilina y las cefalosporinas. Cuando los niveles de antibióticos son bajos en el lumen colónico, *C.difficile* sobrevive por esporulación con regeneración de las formas vegetativas (Hartlett, 1990).

La susceptibilidad del intestino humano al efecto de la toxina A no se ha estudiado extensivamente, pero algunos estudios preliminares indican que el colon podría ser la zona más vulnerable a la toxina.

Dentro de los eventos que siguen a la colitis causada por *C.difficile* se tienen: Distorsión de la flora normal bacteriana del colon: colonización con *C.difficile* y liberación de toxinas que causan daño a la mucosa e inflamación.

Las características histológicas de la colitis pseudomembranosa inducida por la toxina A de *C.difficile* están divididas en tres tipos (Price y Davies, 1977):

-Tipo I.- Lesión muy temprana, la cual se caracteriza por una necrosis de las placas epiteliales acompañada por un exudado de fibrina y de neutrófilos dentro del lumen colónico.

-Tipo II.- Lesión con exudado más prominente que las erupciones provenientes de una úlcera epitelial con el área circunestante de la mucosa intacta.

-Tipo III.- Lesión caracterizada por una necrosis epitelial difusa y una ulceración reabierto por una pseudomembrana que contiene mucina, fibrina, leucocitos y detritus celulares.

En resumen, dentro de las alteraciones observables provocadas por esta infección vistas a través de una endoscopia, se encuentran la formación de placas hiperémicas edematosas en la mucosa colónica. A medida que estas placas crecen, se condensan y forman placas pseudomembranosas adherentes que son núcleos inflamatorios de células epiteliales necrosadas, fibrina y moco. La lámina propia también está necrosada y posee un infiltrado de células polimorfonucleares. Muy frecuentemente, las criptas manifiestan morfología normal, aunque en casos severos también están necrosadas. Si la enfermedad no es atendida, esta puede ser fatal (Kelly, 1994).

2.5. Factores de virulencia de *C.difficile*.

Clostridium difficile produce dos toxinas principales denominadas A y B, que representan los principales factores de virulencia. Además es capaz de producir fimbrias, que le permiten asociarse a la mucosa del intestino. Puede también producir una cápsula y secretar enzimas hidrolíticas y otras toxinas tales como una actina-específica ADP-ribosil transferasa (Hafiz, 1974; Borriello y cols, 1988; Poppof y cols, 1988 y Bartlett, 1990).

El principal factor de virulencia es la toxina A, la cual genera la gran gama de efectos descritos anteriormente (Fiorentini y Thelestum, 1991);

El gen de la toxina A codifica para una proteína de 2,710 a.a. lo cual corresponde a una masa molecular de 308 kDa (Dove y cols, 1990).

La toxina A de *C. difficile* en su forma nativa tiene un peso molecular de 520-540 kDa (Kamiya y cols, 1989). Esta molécula tiene cinco actividades biológicas importantes: es letal, enterotóxica, citotóxica y citotónica, e induce hemaglutinación en eritrocitos de conejo.

La posibilidad de que estas actividades se encuentran en componentes separados ha sido descrita. En este sentido una subunidad de 230-310 kDa ha sido clonada y secuenciada, mostrando un patrón complicado de secuencias repetidas en el tercer C-terminal de la molécula (Fiorentini y Thelestum, 1991).

La estabilidad de la toxina A es rápidamente alterada por congelamiento y descongelamiento.

Por otro lado, se ha descrito que la toxina A es sensible a la digestión con quimi tripsina, así como a la proteasa V-8 de *S.aereus*, a la papaína y a la proteinasa K (Lyerly y cols, 1986a).

2.5.1. Efecto citotóxico de la toxina A.

La mayoría de las células de mamíferos son sensibles a la toxina A. Esta toxina provoca detenimiento irreversible de la división celular. El primer signo visible de la citotoxicidad consiste en la retracción y redondeamiento de las células intoxicadas, referido como el efecto citopatogénico (ECP), lo cual ha sido usado como parámetro para el daño provocado por la toxina A. También el núcleo es afectado, llegando a polarizarse en la célula. Estos cambios morfológicos parecen ser consecuencia de un rearrreglo del citoesqueleto, involucrando principalmente algunos componentes del sistema de microfilamentos. No obstante, estos cambios no han sido asociados directamente con un alto grado de letalidad celular. Otro de los efectos que provoca la toxina A es la inhibición de la síntesis macromolecular. También tiene un efecto en la permeabilización de la membrana plasmática, lo cual ocurre posteriormente a los cambios citoesqueléticos que finalmente conducen a la muerte celular (Fiorentini y Thelestam, 1991). En una tentativa para identificar las vías metabólicas en este proceso de citotoxicidad, se han analizado los cambios en los niveles citosólicos de calcio. Sin embargo no se ha encontrado ninguna relación de cambios en los niveles de calcio con el efecto de la toxina A de *C. difficile* en las células intoxicadas (Fiorentini y Thelestam, 1991).

Debido a que algunas líneas celulares de mamífero responden a la toxina A con diferentes sensibilidades, es difícil la medición del efecto citotóxico de la toxina A de manera cuantitativa. Aunado a esto, no se han desarrollado métodos cuantitativos que permitan evaluar con exactitud el número de células viables después del tratamiento con toxina A de *C. difficile* a diferentes tiempos.

En otras líneas celulares el redondeamiento es acompañado por una marginalización de los núcleos, los cuales parecen ser empujados hacia uno de los polos de la célula. Estos cambios morfológicos son generalmente irreversibles y seguidos por una inhibición de la división celular (Shahrabadi y cols,1984;Fiorentini y cols,1989a y Fiorentini y Thelestam,1991). Así, la toxina A se parece a la B, en que ambas ejercen una actividad antiproliferativa. Por otro lado, los linfocitos en suspensión tratados con toxina A no son afectados morfológicamente por el tratamiento con esta toxina. Sin embargo, la toxina A puede interactuar con diferentes células del sistema inmune y causar inhibición o estimulación de sus funciones (Pothoulakis y cols,1988,Gilbert y cols,1989;Däubener y cols,1988 y Miller y cols,1990).

La toxina A produce efecto citotóxico (redondeamiento) y efecto citotónico (elongación) en las células de ovario de hamster chino (CHO), cuando estas células son tratadas con concentraciones de 0.9-3.6µg/ml (Katoh y cols,1986 y Torres y Lönnroth,1988).

El tratamiento de células epiteliales con la toxina A por 24 horas produce anomalías y trastornos en la permeabilidad de estas células, llegando a provocar la pérdida de algunas áreas celulares esparcidas. Estas áreas celulares son perdidas por desprendimiento de la monocapa antes de la muerte celular. De hecho, después de 8 horas de tratamiento, las células intoxicadas aparecen escasamente más alargadas que las células control, pero sin evidencia de separación de célula a célula, ni de una clara muerte celular. Las uniones estrechas en las monocapas tratadas con la toxina A no son trastornadas, como se observa por microscopía electrónica. Aunque la integridad de la células se mantiene, la organización de la actina es marcadamente alterada (Hecht y cols,1988). Por microscopía de transmisión se ha observado que la toxina A parece no causar una alteración grave en los organelos celulares (Fiorentini y Thelestam,1991).

Por otro lado, las características peculiares de las células intoxicadas son la modificación de la posición y forma del núcleo y un desarrollo extensivo del aparato de Golgi (Fiorentini y Thelestan, 1991).

La toxina A causa infiltración de los iones K^+ en las células HeLa incubadas con $1\mu\text{g/ml}$ de la toxina. Sobre estas bases, el primer evento causado por la toxina podría ser un cambio en la permeabilidad (Rothman y cols, 1984). Sin embargo a bajas concentraciones de toxina (10 a 100 veces menos), el ECP fue visto hasta después de 120 minutos, cuando todavía no son evidentes los cambios en los niveles de potasio, indicando que el ECP antecede a la pérdida de los iones K^+ . Fiorentini y Thelestan (1990), han medido la liberación de nucleótidos marcados con ^3H -uridina a partir de células Y1 y de células IEC-6 tratadas con toxina A, encontrando que el ECP en ambas líneas celulares se desarrolla antes que la liberación significativa de marca radiactiva. Las células IEC-6, las cuales son más sensibles que las Y1, liberan cerca del 64% de la marca radiactiva cuando se incuban por 7 horas con $10\mu\text{g/ml}$ de toxina, presentándose la liberación completa del contenido celular radioactivo a las 24 horas.

Así, aunque el efecto de la toxina A sobre las membranas plasmáticas es todavía controversial y aparentemente la membrana celular no parece ser el blanco primario de la toxina, se mantiene la idea de que la toxina A de *C. difficile* debe ser internalizada para ejercer la acción citopatogénica (Henriques y cols, 1987).

Los experimentos relacionados con el proceso de internalización sugieren que las toxinas A y B tienen generalmente como blanco los elementos del citosol. Estas toxinas entran directamente al citosol a través de la superficie externa de la célula, sin la formación aparente de vesículas intracelulares. De este modo, la introducción de la toxina A aparentemente ocurre por

endocitosis mediada por un receptor (Henriques y cols, 1987). Estos autores (1987), han utilizado un método bioquímico indirecto para analizar el fenómeno de internalización de la toxina A en fibroblastos de pulmón humano (MRC-5). Al probar el efecto citotóxico de la toxina en presencia de antitoxina y tripsina, así como monesina, aminas lisomotrópicas e inhibidores de la energía del metabolismo, se observó que estos compuestos inhiben la acción de la toxina, lo cual sugiere que el principal blanco para la acción citopatogénica de la toxina A está localizado intracelularmente. La evaluación cuantitativa de este fenómeno no ha sido realizada.

Se sabe que algunas toxinas bacterianas afectan el citoesqueleto; por ejemplo, la tubulina sirve como sustrato para las toxinas del cólera y la producida por *Bordetella pertusis* (Kaslow y cols, 1981 y Lin y cols, 1985), mientras que la toxina diftérica y la enterotoxina de *Pseudomonas aeruginosa*, distorsionan la organización de la vimentina del filamento intermedio (Sharpe y cols, 1980). Así también, un factor citotóxico de *E. coli* incrementa la polarización y organización de la actina (Fiorentini y cols, 1989). La toxina A de *C. difficile* no parece poseer una actividad ADP-ribosilante, aunque se ha mostrado que perturba el citoesqueleto compuesto por actina en monocapas de células intestinales (Hecht y cols, 1988).

Es precisamente la redistribución de la F-actina lo que ocasiona una alteración paralela en las uniones estrechas que afectan la permeabilidad. Se conoce que el citoesqueleto de las células epiteliales es capaz de regular la permeabilidad de las uniones estrechas, aunque algunos autores sugieren que este efecto es secundario a los efectos citoesqueléticos producidos por la toxina A (Fiorentini y Thelestat, 1991). Así, los cambios estructurales de la actina, parecen estar involucrados en las etapas tempranas del proceso de intoxicación. También se ha reportado que

el aparato microtubular no parece estar involucrado en la respuesta temprana al tratamiento con toxina A (Fiorentini y cols,1989).

Los agentes despolimerizantes de los microtúbulos como lo son la colchicina y el dimecolcin (Wilson, 1975), no son capaces de proteger a las células contra el redondeamiento celular causado por la toxina A (Fiorentini y cols, 1990 y Lima y cols, 1988). Sin embargo, la migración del núcleo hacia un polo de la células es completamente inhibida por estas drogas sugiriendo que la integridad del aparato microtubular es requerido para la polarización nuclear inducida por la toxina A (Fiorentini y cols, 1990).

En resumen, el blanco intracelular primario de la toxina A todavía es desconocido, pero el citoesqueleto está claramente involucrado en la respuesta de la toxina. Por lo tanto el mecanismo podría ser atribuido a un debilitamiento de algunos elementos citoesqueléticos asociados con el sistema microfilamentario o microtubular.

La observación de la inhibición de la síntesis del DNA inducida por la toxina A en las células IEC-6, junto con el daño de la membrana, puede ser indicativo del mecanismo que causa muerte celular después de los cambios citoesqueléticos, que conducen finalmente al daño ECP (Fiorentini y Thelestam, 1991).

Sin embargo, los parámetros que permiten evaluar la viabilidad de células tratadas no han sido del todo estandarizados. Desde este punto de vista, la utilización de colorantes específicos para el DNA, pueden ser adecuados para establecer un método de cuantificación confiable para evaluar el daño celular en células tratadas con toxina A.

2.5.2. Efecto de la toxina A de *C.difficile* a nivel intestinal.

Se ha sugerido que el principal efecto de la toxina A en el intestino es estimular la liberación de mediadores inflamatorios provenientes de algunas células blanco (Pothoulakis y cols.1993)

La liberación de prostanglandinas así como de leucotrienos, es una respuesta *in vivo* a la toxina A. Sin embargo *in vitro*, el ECP observado en células en cultivo ocurre únicamente después de un período de latencia y parece no ser dependiente de la vía de síntesis de las prostanglandinas, los leucotrienos y el ácido araquidónico (Pothoulakis y cols,1993).

A nivel del sistema inmune se sabe que la infección causada por *C.difficile* en las células epiteliales de la mucosa intestinal provoca una colitis. Esta colitis se caracteriza por una infiltración de leucocitos polimorfonucleares (PMNs),provenientes de las capas mucosas del intestino (Pothoulakis y cols,1993).

Pothoulakis y cols (1988), han mostrado que la toxina A de *C.difficile* es capaz de activar directamente a los granulocitos humanos *in vitro*, causando una elevación en los niveles de calcio intracelular y estimulando la quimiotaxis y la quimioquinesis.

Miller y cols (1990), han demostrado que a muy bajas dosis de toxina A purificada, se produce la liberación de interleucina 1 (IL-1) a partir de macrófagos activados en el intestino.

De acuerdo a los resultados de Triadafilopoulos y cols (1987) y de Pothoulakis y cols (1988), se ha sugerido que la toxina A provoca una infiltración de los granulocitos en la lámina propia intestinal, donde son activados provocando la liberación de mediadores inflamatorios. Estos mediadores en turno podrían contribuir al daño epitelial, a la secreción de fluidos, a la liberación

de moco y por tanto a un incremento en la permeabilidad de la membrana del epitelio en el intestino.

Otros estudios con exotoxinas bacterianas como la toxina por *B.pertussis* (Vistica y cols,1986) y la toxina que produce el síndrome del choque tóxico (Ikejima y cols,1984), han demostrado que éstas tienen un efecto estimulador en los macrófagos y monocitos, causando liberación de IL-1 a partir de su activación.

La toxina A de *C.difficile* podría ejercer un efecto inductor de secreción *in vivo* a bajas dosis en granulocitos y macrófagos, causando la liberación de mediadores inflamatorios. Sin embargo, el mecanismo molecular mediante el cual la toxina A provoca la liberación de mediadores a partir de células activadas del sistema inmune es desconocido (Fiorentini y Thelestan, 1991).

Por otro lado, en los sueros de pacientes con colitis inducida por *C.difficile*, se ha observado un incremento significativo en los anticuerpos de clase IgG (inmunoglobulina G) e IgM (inmunoglobulina M) contra las toxinas A y B en fase convalescente; dicha respuesta se ha correlacionado con la disminución en la severidad de la enfermedad y posibles recaídas (Torres y cols,1995). Sin embargo algunos autores han reportado que se carece de una correlación entre inmunidad y respuesta clínica (Leung y cols,1991). Por otra parte, se ha encontrado IgA secretora (inmunoglobulina A) en aspirados colónicos de un 50% de población adulta, este tipo de anticuerpos bloquea la unión de la toxina A a las membranas del dorde de cepillo en ileon de conejo (Kelly y cols,1992).

2.6. Biología de las células cebadas

Debido a que la respuesta inflamatoria a nivel intestinal es una de las principales características de la colitis pseudomembranosa causada por *C.difficile*, el análisis de la participación de mediadores de respuesta inflamatoria liberados por células del sistema inmune afectados por la toxina A de *C.difficile*, es un aspecto relevante en el estudio del proceso fisiopatológico causado por esta bacteria.

Así, algunas células del sistema inmune con un alto contenido de mediadores pueden ser afectados por la toxina A de *C.difficile*. Dada su amplia distribución en todo el organismo y su alto contenido de mediadores de la inflamación, las células cebadas son blanco de acción importante de la toxina A producida por *C.difficile*. Es por ello, que en esta sección se describen algunas de las características más importantes de las células cebadas.

Las células cebadas se derivan de precursores hematopoyéticos pluripotenciales presentes en la médula ósea y que en los humanos expresan el antígeno CD34 (Kirshenbaum y cols,1991).

Durante el desarrollo y bajo la influencia de la IL-3, FECC (factor estimulador precursor de diferenciación y crecimiento de células cebadas) y de la IgE (inmunoglobulina E), los precursores de las células cebadas llegan a comprometerse para formar el linaje de las células cebadas (Ashman y cols,1991).

Normalmente las células cebadas no se encuentran en la circulación. Los progenitores de las células cebadas migran a los vasos periféricos como células inmaduras y luego experimentan diferenciación *in situ* a través de la acción de sustancias presentes en el microambiente local (Abbas,1993).

En sitios tales como la cavidad peritoneal y el intestino, los niveles de células cebadas que existen en adultos se alcanzan hasta después de los 2-3 meses de edad (Watkins y cols, 1976; Woodbury y cols, 1978).

Las células cebadas maduras se encuentran por todo el cuerpo, principalmente localizadas cerca de los vasos sanguíneos, de los nervios o por debajo del epitelio, en las superficies de la piel, en el sistema respiratorio, en el tracto gastrointestinal y genitourinario, adyacentes a los vasos sanguíneos o linfáticos. Dado que estas células se encuentran en sitios como la piel o las superficies mucosas, es amplia la oportunidad de tener contacto con parásitos, bacterias u otros patógenos o con antígenos ambientales, siendo así como los componentes de todos éstos pueden en un momento dado activarlas (Bissonnette y cols, 1990; Bissonnette y Befus, 1993; Galli, 1993; Befus, 1994). Se han descrito dos subpoblaciones de células cebadas en el humano: aquellos que se encuentran en la cosa del tracto gastrointestinal (células cebadas de mucosa CCM), las cuales contienen sulfato de condroitina como el principal componente de los proteoglicanos, pero con poca cantidad de histamina. La otra subpoblación se encuentra asociada al tejido conectivo (pulmón y en las cavidades serosas del cuerpo) y se ha denominado células cebadas de tejido conectivo (CCTC). Estas últimas contienen gran cantidad de heparina como su principal proteoglicano y 15 a 20 veces más cantidad de histamina que las CCM. En los humanos los factores que regulan el crecimiento y desarrollo de las células cebadas están poco definidos. Al parecer, los factores involucrados para el desarrollo de CCM son producidos por células T, mientras que el desarrollo de las células cebadas de tejido conectivo es independiente de factores producidos por estos linfocitos y es más dependiente de factores producidos por fibroblastos (Abbas y cols, 1993).

2.6.1. Modulación de la función de las Células Cebadas en el Tracto Gastrointestinal.

Las respuestas inmunológicas e inflamatorias en el tracto gastrointestinal involucran una compleja red entre células nerviosas, células inmunes y mediadores inflamatorios.

Varios tipos de células inmunes, tales como los linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y células cebadas, están presentes en el tracto gastrointestinal y pueden liberar una gran cantidad de mediadores, los cuales pueden participar en la protección inmune o bajo condiciones de disregulación, provocar efectos fisiopatológicos (Bissonette y Befus, 1993). Dentro de los procesos fisiológicos y patológicos en los cuales las células cebadas activadas están implicadas tenemos a la inflamación, la fibrosis, las enfermedades infecciosas y las neoplasias (Lett-Brown y cols, 1988; Galli y cols, 1989 y Holgate y cols, 1988).

A nivel gastrointestinal, la estimulación de las células cebadas puede conducir a la liberación de varias citocinas tales como las interleucinas (IL-1, IL-3, IL-5 y IL-6), el interferon gamma (IFN- γ), el factor de necrosis tumoral (TNF- α) y el factor estimulador de colonias de macrófagos-granulocitos (GM-CSF) (Burd y cols, 1989), las cuales son moléculas que están implicadas en los procesos inflamatorios. Las células cebadas también son fuente de los metabolitos del ácido araquidónico (Befus, 1989), los cuales son importantes mediadores inflamatorios en la úlcera gástrica (Wallace, 1990), y el síndrome de inflamación intestinal (SII). Muchos estudios han demostrado la presencia de respuestas inmunológicas e inflamatorias en la SII, estando la hiperplasia de la células cebadas presente como una característica prominente en el tejido intestinal inflamado (Lauritsen y cols, 1989).

La capacidad de estas células para liberar una variedad de potentes mediadores de la inflamación, las hace partícipe de muchos estímulos en procesos patológicos.

La enfermedad de celíaca, la colitis ulcerativa y la enfermedad de Crohn están asociadas con la hiperplasia de las células cebadas y con su activación (Balazs y cols,1989; Dvorak y cols,1980 y Strobel y cols.,1983). La hiperplasia observada podría ser causada por una proliferación local y/o diferenciación, o por quimiotaxis de los progenitores de las células cebadas, a los sitios de inflamación. Un estudio a finales de los ochentas ha mostrado que las células cebadas exhiben quimiotaxis hacia la lámina propia inflamada. Esta quimiotaxis puede incrementarse cuando las células cebadas son estimuladas con moléculas antigénicas (Fox y cols,1987).

Interesantemente, los antígenos del epitelio intestinal pueden estimular la secreción de mediadores a partir de las células cebadas de pacientes con SII (Bissonnette y cols,1990). Muchas células que participan en los procesos inflamatorios y algunas citocinas están implicadas en el desarrollo de la SII. Por tanto, la interacción entre células epiteliales y células cebadas puede conducir a una activación regulada de estas últimas. Algunos factores adicionales que activan a las células cebadas han sido identificados en macrófagos, neutrófilos, linfocitos T y eosinófilos. Sin embargo, solo la IL-3 y el factor estimulador de colonias de macrófagos-granulocitos (GM-CSF) estimulan la liberación de histamina (Bissonnette y cols,1990 y Bissonnette y Befus,1993).

Castro A. G. (1993) proporcionó datos en 1993 que indican que los mediadores solubles liberados por células cebadas activadas estimuladas pueden afectar a la secreción del fluido intestinal aumentando los efectos neuroendócrinos sobre la función celular epitelial.

2.6.1.1. Implicaciones de las células cebadas en la diarrea inflamatoria

Se ha demostrado que los mediadores liberados por las células cebadas pueden también estimular la secreción epitelial ya que pueden ser importantes moduladores en el fluido intestinal y en la homeostasis electrolítica.

Las células cebadas contribuyen a la patogénesis de la diarrea inflamatoria, por su amplio potencial para interactuar a niveles moleculares y celulares. Por ejemplo, los efectos provocados por la activación de las células cebadas pueden ser amplificados por interacciones sinérgicas de sus mediadores liberados con células epiteliales. La comunicación establecida entre células cebadas, células nerviosas y elementos mesenquimales influyen en el transporte de iones y en el paso de antígenos dentro de la lámina propia. El resultado final de la activación de las células cebadas puede ser en teoría también modificado por efecto de los mediadores a nivel de órganos, teniendo acciones sobre la movilidad intestinal y el flujo sanguíneo (Barret, 1993).

La identificación de los mediadores específicos involucrados en las respuestas *in vivo*, podría servir de base para producir antagonistas capaces de unirse a su receptor, inhibiendo así la liberación de mediadores de respuesta inflamatoria que repercuten en aspectos fisiopatológicos, como puede observarse en el siguiente esquema (Barret, 1993).

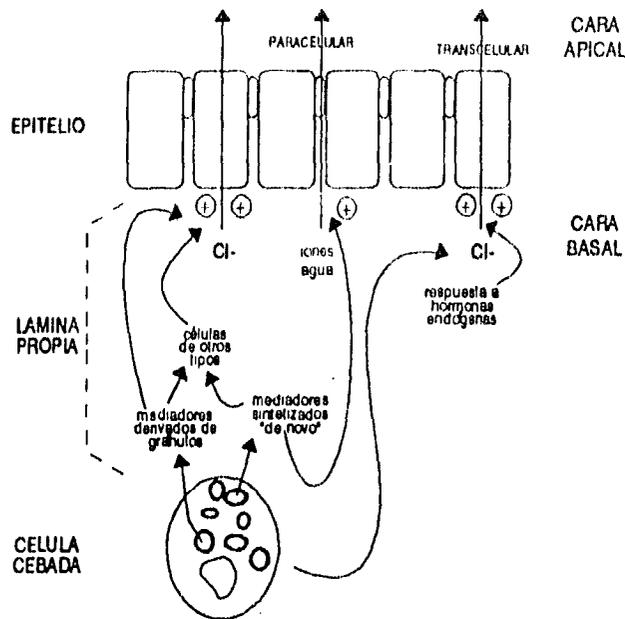


Figura 1. Aspectos fisiopatológicos de la liberación de mediadores de respuesta inflamatoria a partir de células cebadas. (Tomado del libro "Immunophysiology of the Gut", capítulo: Control of colonic Chloride secretion. Academic Press, Inc.:81,1993).

2.6.2. Mediadores liberados por las células cebadas

Los mediadores de las células cebadas pueden dividirse en dos categorías : los que están almacenados y los que se sintetizan de *novo*, posteriormente a la activación. Los mediadores que están almacenados se dividen a su vez en solubles, que son aquellos que se encuentran en la circulación después de su liberación y los que son insolubles (Abbas y cols, 1993).

La histamina, la serotonina, la proteasa II de las células cebadas de rata, triptasa (de humano), exoglicosidasas y factores quimiotácticos para los neutrófilos y eosinófilos son

factores altamente solubles. La heparina, el sulfato de condroitina, la proteasa I (de rata), la carboxipeptidasa, la peroxidasa y la superóxido dismutasa se encuentran en forma insoluble.

Los mediadores sintetizados de *novo* después de la activación incluyen: al factor activador de plaquetas (PAF), a los metabolitos del ácido araquidónico y al óxido nítrico (NO₃) (Bissonnette y Befus, 1993).

Las células de roedores y de humanos son una fuente prominente de TNF- α (Bissonnette y Befus, 1990; Gordon y Galli, 1991). Esta molécula se encuentra preformada en grandes cantidades y tiene efectos importantes en inflamación.

El número de las citocinas producidas por células cebadas es amplio y sus acciones y funciones son complejas. Se cree que alguna de ellas juegan un papel muy importante en la patogénesis de la síndrome inflamatorio intestinal (Bissonnette y Befus, 1993).

Las células cebadas de los humanos liberan mediadores que participan en las respuestas inflamatorias.

Junto con otros mediadores, las citocinas producidas por células cebadas pueden causar vasodilatación (como la histamina y el óxido nítrico); incrementar la permeabilidad vascular, provocar la activación sensorial de células nerviosas (histamina); incrementar la secreción de fluido y moco y causar la contracción del músculo liso (histamina, prostanglandina D2 (PGD₂), péptido sulfito, leucotirenos, triptasa y quimasa). Algunas moléculas como TNF- α , PAF y leucotrieno C4 (LTC₄) pueden también causar vasoconstricción; otras como leucotrieno B₄ (LTB₄), PAF y algunos factores quimiotácticos pueden reclutar y activar neutrófilos y eosinófilos o junto con histamina inhibir la síntesis de TNF- α a partir de los macrófagos (Vannier y cols, 1991).

Los blancos de los mediadores secretados por las células cebadas pueden incluir a casi cualquier tipo celular incluyendo células del tejido conectivo, endotelio, epitelio, células del sistema inmune y células del sistema nervioso así como del músculo liso.

Los mediadores de las células cebadas liberados en un proceso crónico durante la inflamación, pueden contribuir a síntomas diarreicos asociados con otros procesos regulatorios (Bissonette y cols, 1990).

La serotonina (5-HT), la histamina y las prostaglandinas pueden actuar sobre las células epiteliales. Alternativamente tanto la serotonina como la histamina pueden estimular vía nervios entéricos a las células epiteliales como se puede apreciar en el siguiente esquema (Castro, 1993).

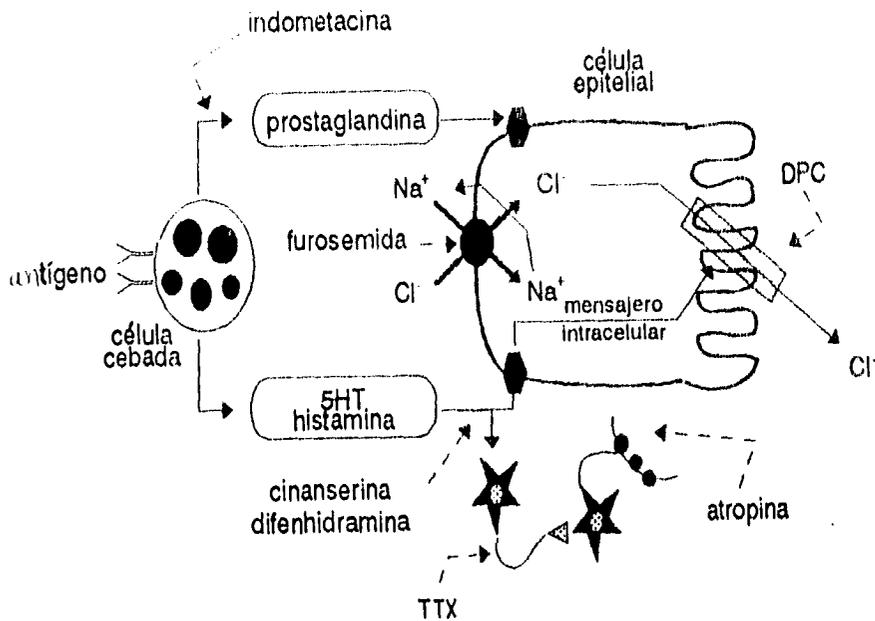


Figura 2. Participación de mediadores de respuesta inflamatoria a nivel intestinal. (Tomado del libro "Immunophysiology of the Gut", capítulo: Immunological Regulation of Epithelial Function. Academ Press, Inc.: 7,1993)

Lo anterior sugiere que el daño de células cebadas por efecto de la toxina A de *C.difficile* puede provocar una liberación acentuada de mediadores inflamatorios, los que pudieran contribuir al desarrollo de colitis pseudomembranosa, por lo que en este estudio se planteó el análisis de viabilidad celular en células cebadas tratadas con la toxina A de *C.difficile*.

A la fecha se desconoce el efecto de la toxina A sobre la activación de las células cebadas, aunque Potloulakis y cols. (1993), han sugerido que las células cebadas pueden activarse directamente por la toxina A de *C.difficile* y liberar así mediadores de respuesta inflamatoria (Castagliulo y cols, 1993).

2.7. Métodos usados para evaluar viabilidad celular.

Los ensayos de viabilidad celular utilizando compuestos fluorescentes pueden por su sensibilidad reemplazar a las pruebas citotóxicas en animales. Estos métodos además son más sensibles que los métodos colorimétricos usuales, tales como el método de exclusión por azul de tripano y son menos peligrosos que los ensayos radioactivos tal como el ensayo de liberación de ^{51}Cr (Haugland,1994).

Generalmente, los ensayos de exclusión de colorantes vitales dependen del procesamiento de un metabolito (midiendo así la actividad enzimática o potencial de la membrana celular), para identificar a una célula viable, empleando un tinte impermeable a la membrana nuclear para identificar células muertas o en proceso de destrucción. La mayoría de las pruebas fluorescentes o fluorogénicas usadas para evaluar viabilidad celular, utilizan sustratos que son modificados por enzimas activas dentro de células viables. Algunos otros son colorantes introducidos a través de canales iónicos en los cuales la fluorescencia varía por el bombeo activo de un ion que ocurre únicamente en las células vivas. Así también existen sustratos para la esterasa que pueden funcionar como colorantes metabólicos. Estos se usan como sondas que atraviesan pasivamente la membrana celular y son transformadas intracelularmente por las esterases, convirtiéndolas en productos fluorescentes polares, que son retenidos por las células que tienen sus membranas plasmáticas intactas, mientras que las células con sus membranas en proceso de destrucción dejan escapar rápidamente al colorante, aun cuando se encuentren residuos de esterasa activa en la célula (Haugland,1994).

Algunos ensayos cuantitativos que evalúan el escape de los productos fluorescentes se han usado para determinar la citotoxicidad mediada por anticuerpos (Lizak y Grunet,1980 y Talbot y cols,1987), la actividad citotóxica de células asesinas naturales (Kolber y cols,1988;Suzuki y cols,1991;McGinnies y

cols,1986 y Wierda y cols,1989), y los efectos tóxicos de drogas (Leeder y cols,1989) y de detergentes (Haugland,1994).

Algunas células como las células cebadas y las células epiteliales, secretan activamente productos polares (Neher y Almers,,1896 y Allen y cols,1990). Algunos ejemplos de estos colorantes son: el azul de calceína, el azul de carboalceína, el diacetato de fluoresceína, el diacetato de carboxifluoresceína, etc (Haugland,1994).

Otros ensayos de viabilidad se basan en la capacidad oxidativa de las células. Así por ejemplo, la dihidrorodamina 123 (DHR 123,D-632) puede ser oxidada a rodamina 123 por neutrófilos viables durante el estallido respiratorio (Kinsey y cols,1987 y Rothe y cols,1988) y se ha demostrado también que tiñe las mitocondrias de las células vivas en las plantas (Haugland,1994).

Existen también indicadores del bombeo iónico. El principio básico radica en que las células viables tienen la capacidad de bombeo de iones a través de sus canales iónicos, los cuales sirven para el mantenimiento de los niveles iónicos internos y para el potencial de membrana de las células. Una vez que las células mueren, la actividad en el bombeo y flujo de iones a través de los canales iónicos se detiene, generando con esto que las concentraciones de iones tanto en el interior como en el exterior de la célula se equilibren, retornando el potencial de membrana a cero. Así la pérdida de la actividad en el bombeo de los iones, acompañada de muerte celular sirve para evaluar la viabilidad celular. Esto puede realizarse usando una gran variedad de colorantes como la rodamina 123, que tiñe selectivamente mitocondrias de células vivas y que se ha utilizado para evaluar la viabilidad de linfocitos (Darzynkiewicz y Andreff,1981), fibroblastos humanos (Goldstein y Korczak,1981) y células humanas transformadas con el virus de Simio (Kliot-Fields y cols,1983); otros colorantes dependen del pH presente, como el rojo neutro y el naranja de acridina que se concentran en organelos ácidos. Estos

han sido también usados para evaluar viabilidad celular (Essig-Marcello y Buskirk, 1990 y Bank, 1988). Por ejemplo, el naranja de acridina es un colorante básico que se concentra en lisosomas de células de mamíferos, vacuolas de plantas (Doherty, 1988) y en gránulos secretores que contienen insulina (Haugland, 1994).

En algunos tipos celulares los tioles tienen una importante función en la biología celular, jugando un papel importante en la proliferación, transporte, movimiento celular y en la síntesis de DNA. En particular el tripéptido glutatión (g-L-glutamil-L-cisteinglicina) y un tiol no proteico presente en células vivas de mamíferos, juegan un papel central en la protección de las células contra el daño provocado por radicales libres, oxidantes y electrófilos. Todas estas propiedades se utilizan como medida de determinación de viabilidad celular ya que un proceso diferencial en estas moléculas indica muerte celular (Haugland, 1994). Por ejemplo, los niveles de glutatión son extremadamente heterogéneos en tumores sólidos, por tanto el glutatión y la glutatión S-transferasa (TSG) pueden jugar un papel importante en la resistencia a las drogas. Sin embargo existe evidencia de que los niveles de glutatión pueden correlacionarse con el progreso de la enfermedad en pacientes con SIDA (Eck y cols, 1989).

Dentro de los métodos convencionales, los métodos colorimétricos son ampliamente usados para evaluar la viabilidad celular. Dentro de los compuestos más usados está la sal de tetrazolio *MTT* (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-bromuro de difenil tetrazolio) la cual ha sido utilizada en ensayos de viabilidad en muchos modelos celulares (Ashman, 1986; Denizot y Lang, 1986; Hansen y cols, 1989; Ferrari y cols, 1990; Niks y Otto, 1990; Cedillo y cols, 1992; Petty-RD y cols, 1995; Ponce-Macotela y cols, 1995; etc.). El principio básico consiste en que únicamente las células vivas son capaces de reducir a dicha sal a través de enzimas mitocondriales succinato deshidrogenasas, hasta un compuesto azul oscuro o púrpura insoluble llamado formazán.

En 1983, Mosmann utilizó esta sal para determinar proliferación y viabilidad en células y desde entonces, el método ha sufrido varias modificaciones (Ashman,1986;Denizot y Lang,1986;Gillies y cols,1986;Neate y Boyle,1986 y Nix y Otto,1990). En los primeros ensayos, Mosmann encontró que la cantidad de formazán producido por las células vivas es proporcional al número de células presentes.

Por otro lado el mismo Mosmann (1983) y Gerlier y Thomasset (1986), han demostrado que el formazán generado depende del estado metabólico de la célula.

El método de MTT ha sido comparado con el ensayo de incorporación de timidina tritiada ($^3\text{H-TdR}$) (Denizot y Lang,1986;Dotsika y Sanderson,1987 y Ferrari y cols.1990). Los resultados han mostrado que la sal de MTT es más sensible para evaluar la capacidad citotóxica de los macrófagos activados (Ferrari y cols,1990). La utilización del MTT es una alternativa a los métodos radioactivos usados para determinar viabilidad celular o evaluar los niveles de citotoxicidad celular. Entre las principales ventajas que ofrece el método de la sal de MTT con respecto a otros métodos para medir viabilidad celular están: (1) sensibilidad y reproducibilidad; (2) no requiere de compuestos radioactivos; (3) el método es fácil de llevarse a cabo porque el formazán generado se cuantifica rápidamente; y (4) es de muy bajo costo siendo, más efectivo y exacto que otros ensayos colorimétricos convencionales (Ferrari y cols,1990).

En la figura siguiente se muestra el principio bioquímico en la cual se basa el método desarrollado por Mosmann con la sal de MTT.

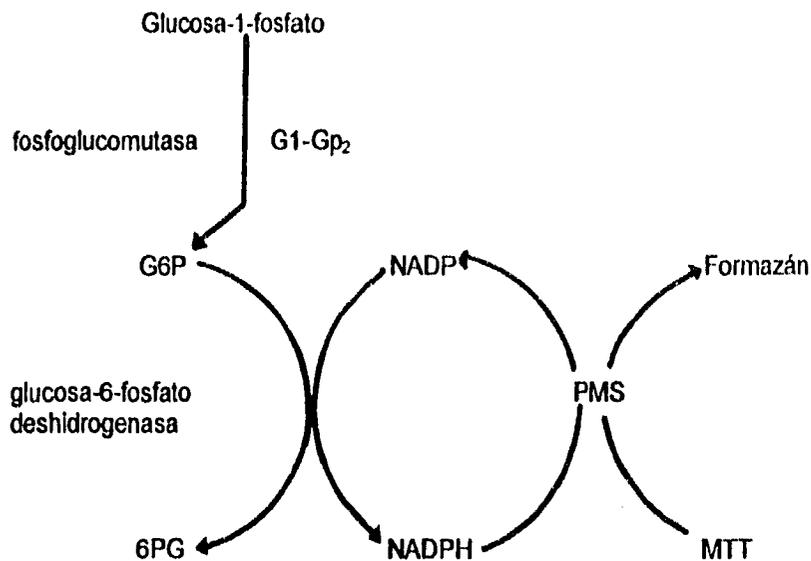


Figura 3. Interacción bioquímica entre la sal de MTT y el PMS. (Esquema modificado, basado en el método de Mosmann, 1983).

Se han descrito así también colorantes que pueden ser utilizados para determinar muerte celular.

Estos colorantes tienen como característica que son altamente impermeables a las membranas, por lo que tiñen únicamente a las células muertas o aquellas células que tienen su membrana dañada. La mayoría de estos colorantes impermeables que sirven para evaluar muerte celular se unen específicamente al DNA. Dentro de los colorantes más utilizados se encuentran: el *yoduro de propidio* (YP) y el *bromuro de etidio* (BE) (Haugland, 1994).

Tanto el YP y el BE han sido usados para detectar células en proceso de destrucción o células muertas. Estos colorantes han sido empleados para evaluar el daño inducido por electrofusión en las células de mamíferos (Kowalski y cols,1990), para determinar viabilidad de aislados de los islotes de Langerhans (Gray y Morris,1987 y London y cols,1989) y para la medición de apoptosis en timocitos (Nicoletti y cols,1991). Han sido también usados para el análisis de los cambios en la integridad de la membrana siguiendo a una aplicación de ATP extracelular (Arkhammar y cols,1990). El *homodimero-1 de etidio* también ha sido usado para estos fines (Haugland,1994). La *monocizida de etidio*, ha sido utilizada para el marcaje covalente del DNA en células muertas. Por ejemplo, ha sido de gran utilidad en la manipulación de organismos patogénicos vivos (Riedy y cols. 1991).

La *lisina dawsil*, también es un colorante impermeable a la membrana celular, que ha sido utilizado para determinar el número de células de mamífero muertas (Fisher y cols,1986), incluyendo aquellas muertas por choque térmico (Rice y cols,1987).

De este grupo de colorantes que se unen al DNA, las bisbenzamidias *Hoechst 33258* y *33342* son colorantes que generan una fluorescencia que puede ser relacionada proporcionalmente con la viabilidad celular. El H33258 no es permeable a la membrana celular, por lo tanto aun en presencia de éste, si la célula esta viva no se generará fluorescencia. El H33342 si es permeable a la membrana celular y por lo tanto puede utilizarse en ensayos de permeabilidad celular. Ambos colorantes son considerados poco tóxicos, aunque se ha reportado que a bajas concentraciones, reducen la síntesis de DNA, producen efectos mutagénicos y alteran la cinética del ciclo celular (Durand y Olive,1982). Estos colorantes son altamente hidrofílicos, por lo que son solubles en agua (hasta en un 2%). Pueden ser excitados con líneas de luz UV de laser de argón y con otras fuentes convencionales usadas en fluorescencia. Al unirse al DNA de la célula, los colorantes H33258 y H33342 generan una

fluorescencia brillante la cual aumenta potencialmente cuando se une al par de bases contiguas A-T (adenina-timina). Estos colorantes se unen con suficiente fuerza con respecto a la secuencia de poli-(d(A-T)), aunque pueden desplazar a algunos otros intercaladores del DNA (Richards y cols,1985). La intensidad de fluorescencia y la afinidad de unión de los colorantes al DNA parece ser altamente dependiente de la secuencia y conformación de las bases del DNA (Muller y Gautier,1975). La fluorescencia del H33342 es opacada en sitios donde la 5-bromodeoxiridina (BrdU) es incorporada en el DNA (Richards y cols,1985).

La diferencia química entre los dos colorantes es el sustituyente que tienen; así el H33258 tiene un hidroxilo y el H33342 tiene un grupo etoxilo, el cual le permite penetrar a la membrana de las células vivas mientras que el H33258 no puede penetrar (Arndt-Jovin y Jovin,1977;Latt,1977 y Lydon y cols,1980). Al unirse al DNA, estos colorantes no muestran toxicidad para la célula (Arndt-Jovin y Jovin,1977), por lo que se consideran como colorantes vitales no tóxicos y afines al DNA (Richards y cols,1985). Se ha demostrado que las bisbenzamidas (H33258 y H33342) son altamente específicas para el DNA por varias razones; 1.- los estudios citoquímicos de las células tratadas con los colorantes, indican que las diferencias de fluorescencia entre el colorante libre y el unido al DNA en un rango de pH 7-8, corresponde únicamente al colorante unido al DNA. Más específicamente, la fluorescencia se limita solo a la cromatina y es más intensa en los centrómeros ricos en A-T. 2.- El 97% de la emisión de la fluorescencia registrada a partir de las células vivas es originada de los núcleos, por conteo de fotones (Arndt-Jovin y Jovin,1977). Aunque una parte de la fluorescencia extranuclear se debe a la fluorescencia del DNA mitocondrial, la baja cantidad de DNA mitocondrial (el cual representa en general menos del 1% del DNA total celular), no afecta los resultados en la medición de viabilidad hechos usando estos colorantes (Lehninger,1993) .3.- En una serie de polímeros

con composición del 0 al 68% de A-T, la fluorescencia se incrementa en relación al contenido de A-T; por lo que es importante considerar el contenido total de A-T en las células que sean evaluadas por estos colorantes. 4.- Se ha demostrado que un rearrreglo estructural en la hélice es necesaria para que exista alta afinidad de unión de estos colorantes al DNA (Muller y Gautier, 1975). Aunque las interacciones secundarias con el par de bases de G-C y con la doble cadena del RNA pueden ocurrir tales interacciones se suprimen en el ambiente isotónico presente en las células vivas (Latt y Wolffe, 1975 y Latt y Stetten, 1976). 5.- En los ensayos fluorométricos donde se utilizan las bisbenzamidas afines al DNA en tejidos homogéneos, la fluorescencia registrada es una función lineal que depende de la concentración del DNA (Richards y cols, 1985).

El H33342 se ha utilizado para una serie de ensayos en los que se ha comparado con otros fluorocromos como el H33258, diacetato de carboxifluoresceína, el MUII (4-metilumbeliferilheptanoato), DAPI, rodamina y otros colorantes como la sal de MTT (Blaheta y cols, 1991). También existen estudios comparativos con radioisótopos como la timidina tritiada.

Todos los resultados indican que el método de cuantificación de viabilidad celular con las bisbenzamidas, ofrece ventajas tales como: simplicidad, reproducibilidad para la estimación de proliferación celular, ya sea por medición directa de los cambios en la fluorescencia celular o por medición en los cambios encontrados en la incorporación normalizada de timidina tritiada en el DNA (Blaheta y cols, 1991). Existen estudios de largo término para medir la migración de linfocitos, que indican que no hay interferencia con las funciones fisiológicas (Brenan y Parish, 1984); además de que se puede utilizar en un sistema de selección celular (cell sorter) para diferenciar subpoblaciones de células marcadas (como linfocitos T y B), siendo importante en estos análisis que no se saturen los sitios de unión al DNA con este colorante, por lo que la concentración de colorante sugerida es menor

a (1mg/ml) (Blaheta y cols,1991). Potencialmente, el H33342 puede usarse para analizar la maduración linfocítica y los mecanismos de migración de las subpoblaciones celulares (Brenan y Parish,1984; Richards y col,1985; Loeffler y Ratner,1989; Blaheta y cols,1991 y Baltz-RC y cols,1995). Para la evaluación del número y proliferación celular resulta ser un método simple, como ha sido mostrado por estudios en la evaluación de la influencia de diferentes drogas inmunosupresivas sobre la activación celular.

Aunque el H33342 es considerado poco tóxico, con efectos significativos sobre la viabilidad celular, a concentraciones mayores de 20mM y por exposición mayor de 30 minutos, este colorante es capaz de inhibir la síntesis del DNA y producir cambios en el ciclo celular (Richards y cols,1985). Ambos fluorocromos H33258 y H33342, proporcionan una alternativa a los ensayos donde se utilizan radioisótopos como la (³H) timidina. La aplicación de estos colorantes a estudios en donde se evalúan los efectos de varios factores biológicos, incluyendo estimuladores, inhibidores y factores citotóxicos sobre la regulación del crecimiento celular, han mostrado ser muy eficientes (Richards y cols,1985).

La aplicación de estos colorantes a estudios en donde se evalúan los efectos de varios factores biológicos, incluyendo estimuladores, inhibidores y factores citotóxicos sobre la regulación del crecimiento celular, han mostrado ser muy eficientes (Richards y cols,1985).

3. MATERIAL Y METODOS:

3.1. Líneas Celulares:

Para la evaluación de la citotoxicidad de la toxina A de *C.difficile* se utilizaron dos líneas celulares: la línea celular IEC-18 de epitelio intestinal (Thomás y cols,1992) y la línea celular IIRMC, la cual es un híbrido de células cebadas con morfología de mucosa intestinal (Zheng y cols,1991), siendo ambas líneas obtenidas de rata.

CELULAS IEC-18.

Las células IEC-18 son una línea celular de epitelio de intestino delgado no transformadas, las cuales son permeables a moléculas hidrofílicas de varios tamaños.

Las células IEC-18 fueron inicialmente derivadas de las criptas de ileon de rata (Thomás y cols,1992). Mediante la observación microscópica se ha confirmado la presencia de uniones estrechas, de desmosomas y de desarrollo de las microvelosidades en la superficie apical entre las células IEC-18. El glicocáliz está ausente en su superficie y los espacios intercelulares tienden a ser pequeños. Quaroni y Isselbacher (1981) fueron los primeros investigadores que aislaron y caracterizaron a las células IEC-18. Las células IEC-18 conservan las propiedades de las células normales antes de ser transformadas. Esta línea celular presenta la mayoría de los marcadores inmunológicos que diferencian a las células de las microvelosidades intestinales, aunque expresan algunos antígenos epiteliales no específicos. La forma de las células IEC-18 es redonda cuando son inicialmente plaqueadas o sembradas, llegando a ser poligonales cuando alcanzan la confluencia (Thomás y cols,1992).

CELULAS HRMC.

Las células HRMC tienen características de mucosa intestinal aunque también poseen características de células cebadas de peritoneo de rata y de células leucémicas basofílicas de rata. Estas células presentan un contenido alto de histamina y de receptores Fcε R1 y Fcγ R2. La línea celular HRMC muestra sutiles diferencias entre los receptores de alta y baja afinidad Fc R1 y Fc R2 (Zheng y cols,1991).

3.2. Cultivo de líneas celulares:

El cultivo de las células IEC-18 y de las células HRMC se efectuó en botellas de 50 ml (25cm² Corning Inc.-USA); expandiendo los cultivos por crecimiento continuo en monocapas a confluencia.

En el caso de la línea IEC-18, se les retiró el medio de cultivo y se les dió un lavado con solución de PBS 1x (Dulbecco solución salina de fosfatos 10x SIGMA ChemicalCo.-St.LouisMO-USA cell culture), incubando las células por 2 minutos a temperatura ambiente.

Para desprender las células de la botella de cultivo, se utilizó una solución de tripsina-verseno al 0.05% (IN VITRO-D.F México), las células se incubaron por 20 segundos a temperatura ambiente. Posteriormente se retiró la solución de tripsina-verseno, resuspendiendo las células en 5-7 ml de medio RPMI 1640 (Gibco BRL.-USA) complementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (HyCloneIII Lab.Inc.-Logan Utah). Para medir la viabilidad celular, una alícuota de 20µl de estas células, fueron resuspendidas en un tubo cónico de 15 ml (Costar-Cambridge) agregando

20µl del colorante azul de tripano (Gibco BRL-L.T.-USA) y las células fueron contadas en una cámara de NEUBAUER 0.1 mm (Reichert-N.Y USA).

Una vez que se cuantificó el número de células viables, se plaquearon 50×10^3 células/pozo por duplicado en una microplaca de cultivo celular de 96 pozos (Nunclon, Nunc-Dinamarca), incubándolas a 37°C toda la noche en una atmósfera de CO₂ al 5%.

Para el caso de la línea celular HRMC, considerando la presencia de células viables no adherentes, se siguió el siguiente procedimiento: las células flotantes se colectaron en un tubo cónico, mientras que las células adheridas a la botella de cultivo de 50 ml se desprendieron con 5 ml de una solución de Puck 1x (EDTA 1mM-Sigma cell culture, KCl 1mM-Merck, NaCl 1mM-Merck, NaHCO₃ 1mM-Merck y H₂O), incubando por 5 minutos a temperatura ambiente.

Una vez desprendidas, las células se mezclaron y se centrifugaron a $296 \times g'$ por 4 minutos a temperatura ambiente y fueron resuspendidas finalmente en 5-7 ml de medio RPMI 1640 complementado con 10% de SFB. Para el conteo e incubación de las células plaqueadas se siguió el mismo procedimiento que para las células IEC-18. En este caso se plaquearon por duplicado 25×10^3 células/pozo.

Los medios de cultivo, PBS, tripsina y PUCK de las botellas de cultivo, se retiraron con una pipeta pasteur estéril conectada a una bomba de vacío (Enciso y cols, 1996).

3.3. Congelamiento y descongelamiento de líneas celulares:

Para efectuar el congelamiento de las células IEC-18 y HRMC se utilizó dimetil sulfoxido (DMSO) al 10% en SFB realizándose de la siguiente manera:

Para el congelamiento, una vez que obtuvo el botón celular (siguiendo el mismo procedimiento de cultivo de líneas celulares), las células se resuspendieron en DMSO al 10% en SFB para congelarlas inmediatamente en hielo seco y trasladarlas a un congelador a -70°C dejándolas toda la noche y colocándolas en nitrógeno líquido al día siguiente.

Para el descongelamiento, los crioviales conteniendo las células en DMSO al 10% y SFB se incubaron en un baño a 37°C y se mezclaron inmediatamente en un tubo cónico de 15 ml en 6 ml de medio RPMI al 10% de SFB. Las células se centrifugaron a $296 \times g'$ por 2 minutos. Posteriormente se absorbió casi todo el medio dejando solo una pequeña cantidad para resuspender el botón celular. Una vez realizado esto, se agregaron 6 ml de medio RPMI al 10% de SFB y se trasladaron a una botella de cultivo de 50 ml. Debido a que el DMSO es muy tóxico para las células, se trató en todo momento de mantenerlas congeladas una vez que las células se resuspendieron en esta solución (Enciso y cols, 1996).

3.4. EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD EN LINEAS CELULARES IEC-18 Y HRMC TRATADAS CON TOXINA A DE C.difficile.

El tratamiento de las líneas celulares IEC-18 y HRMC se realizó con diferentes concentraciones de toxina A de C.difficile, donada amablemente por el Dr. Javier Torres L.(UIMEIP H.P. C.M.N. siglo XXI IMSS). Para el análisis del redondeamiento (evaluación porcentual de células redondeadas) se siguió el siguiente procedimiento:

A partir de un solución concentrada de 400µg/ml de toxina A se prepararon las siguientes diluciones en RPMI 1640 complementado con SFB al 10%: 1 µg/ml, 0.5 µg/ml, 0.25 µg/ml, 0.125 µg/ml y 0.062 µg/ml.

En cada pozo de cultivo se agregaron 100 µl de c/u de las diluciones anteriores y las células se incubaron a 37°C por 4 horas.

Los análisis del porcentaje (%) de redondeamiento celular se realizaron cada 30 minutos en un microscopio óptico invertido (Leitz*Diavert-Germany), efectuando el conteo de células redondeadas en cada casa y obteniendo el valor total de las células por campo para obtener el porcentaje de redondeamiento. La viabilidad de las células intoxicadas se evaluó con azul de tripano a las 4 horas de incubación.

3.4.1. Evaluación de la viabilidad celular en líneas celulares IEC-18 y HRMC tratadas con toxina A de Clostridium difficile usando Hoechst 33258 y 33342.

La evaluación de viabilidad celular usando las bisbenzamidias 33258 y 33342 se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Blaheta y cols (1991). Los ensayos se realizaron utilizando el mismo procedimiento de cultivo y plaqueo de células descrito anteriormente para ambas líneas celulares. Las concentraciones finales de toxina utilizadas fueron 1 µg/ml, 0.5 µg/ml, 0.25 µg/ml, 0.125 µg/ml y 0.062 µg/ml, realizando las diluciones en RPMI 1640 sin suero. Las células se incubaron con la toxina A a 37°C por 4 horas.

Transcurrido este tiempo se agregaron en la misma placa los fluorocromos. El H33258 (Sigma Chemical Co.-USA) se adicionó a una concentración final de 1µg/ml, mientras que el H33342

(Sigma Chemical Co.-USA) se agregó a una concentración final de 5 µg/ml incubando a 37°C por 20 minutos. Las soluciones de trabajo se prepararon en agua desionizada estéril y las diluciones finales de bizbenzamidas se diluyeron en RPMI 1640 sin suero. Ambas soluciones fueron protegidas de la luz cubriendo con papel aluminio el contenedor donde se almacenaron.

Las lecturas iniciales se realizaron en un espectrofluorómetro (FLUOROSKAN II-LABSYSTEMS INC. Finlandia) utilizando un par de filtros de 355/460 nm (excitación/emisión). Posteriormente, las células se centrifugaron a 800 x g² por 4 minutos a temperatura ambiente (T.A).

Después de este tiempo, se retiró el sobrenadante de cada pozo con una micropipeta, usando una punta por muestra y el volumen inicial de 100 µl se restituyó con RPMI 1640 sin suero. Una segunda lectura se realizó para obtener la evaluación de viabilidad celular. Para cuantificar la viabilidad de las células tratadas con toxina A de *C. difficile*, a las 24 horas estas células fueron incubadas durante 24 horas a 37°C y lecturas a ese tiempo fueron también realizadas.

Para cada ensayo fue necesario establecer una curva patrón de valores conocidos de células totales plaqueadas por duplicado. Para la línea celular IEC-18 se plaquearon en duplicado 10,20,30,40,50 y 60 x 10³ células por pozo respectivamente. Por otro lado, para la línea celular HRMC se utilizaron duplicados de 5,15,25 y 35 x 10³ células por pozo. De esta forma, se evalúa de manera indirecta la cantidad de células vivas o muertas según sea el caso del colorante utilizado, considerando que la curva patrón sirve para interpolar los datos de densidad óptica obtenidos.

Los controles correspondientes para cada tratamiento fueron los siguientes: células con toxina-sin fluorocromo, células con fluorocromo-sin toxina, células sin fluorocromo y sin toxina.

solución de fluorocromo más toxina, solución de RPMI, solución con toxina y solución hipertónica.

Para la realización de las lecturas en cada ensayo, el aparato se calibró con una hilera de pozos conteniendo 60×10^3 células/pozo para IEC-18 y 35×10^3 células/pozo para HRMC, las cuales fueron colocadas en la segunda hilera #2 vertical de acuerdo al siguiente esquema:

Microplaca de cultivo

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	b	c	p									
B	l	é		o								
C	a	l	v		z							
D	n	u		a		o						
E	c	l			c		s					
F	o	a				i						
G (RP-		s					o					
H MI)								s				

Las células utilizadas para calibrar se incubaron de la misma forma que las células tratadas con toxina. El valor que se le dió a dicha calibración fue de 1000 unidades de densidad óptica, lo cual equivalió al valor de 60×10^3 células IEC-18 y 35×10^3 células HRMC.

Para los ensayos realizados con el fluorocromo H33258 (el cual no puede penetrar a la membrana celular intacta), se agregaron por cada pozo 100 μ l de solución hipertónica (Tris 10mM-Sigma, CaCl 5mM, MgCl 10mM y NaCl 40mM-Merck), incubándose en las mismas condiciones que las células tratadas con la toxina A.

3.4.2. Evaluación de la viabilidad celular en líneas celulares IEC-18 y HRMC tratadas con toxina A de *Clostridium difficile* usando MTT.

Para la evaluación de la viabilidad de las células IEC-18 y HRMC tratadas con toxina A de *C. difficile* usando la sal de MTT (Sigma Chemical Co.-USA) (Mosmann, 1983), se siguió el mismo procedimiento de cultivo y tratamiento descrito anteriormente.

Transcurridas las 4 horas de incubación con la toxina A, a los cultivos se les retiró el sobrenadante utilizando puntas estériles teniendo cuidado de no alterar la monocapa celular.

Inmediatamente se agregaron 50 μ l de la sal de MTT a una concentración final de 375 μ g/ml y posteriormente se adicionaron 50 μ l de una solución de PMS (metasulfato de fenacina-Sigma Chemical Co.-USA), a una concentración final de 1.25 mg/ml. Ambas soluciones se prepararon en agua desionizada estéril protegiéndose de la luz y almacenándose a 4°C por no más de un mes. Una vez preparadas las soluciones concentradas fueron almacenadas a -20°C.

Las células tratadas con toxina A de *C. difficile* se incubaron con estas soluciones por 2 horas a 37°C.

Una vez transcurrido este tiempo, la microplaca conteniendo las células se centrifugó a 800 x g' por 5 minutos a T.A. El sobrenadante de cada pozo se retiró como se mencionó

anteriormente y a cada pozo se le agregó entonces 200 μ l de isopropanol ácido (isopropanol conteniendo 0.04M final de HCl-Sigma Chemical Co. USA), resuspendiendo los cristales preprecipitados (formazán), hasta disolverlos completamente. Las placas se incubaron a 4°C por 3 horas.

La lectura se realizó posterior al período de incubación en un lector de ELISA (LABSYSTEMS iEMS INC.-Finlandia) a 570nm (λ_{570}).

Para cada ensayo fue necesario establecer una curva patrón de valores conocidos de células totales plaqueadas por duplicado. Para la línea celular IEC-18 se plaquearon en duplicado 10, 20, 30, 40, 50 y 60 x 10³ células por pozo respectivamente. Por otro lado, para la línea celular HRMC se utilizaron duplicados de 5, 15, 25 y 35 x 10³ células por pozo. De esta forma, se evalúa de manera indirecta la cantidad de células vivas, considerando que la curva patrón sirve para interpolar los datos de densidad óptica obtenidos.

Los valores experimentales fueron ajustados de acuerdo a los controles utilizados: toxina-sin MTT-PMS, células con MTT-PMS-sin toxina, con toxina-MTT-PMS, células con toxina-sin MTT-PMS, células con MTT-PMS-sin toxina.

Debido a que los fluorocromos como la sal de MTT y la solución de PMS son muy sensibles a la luz directa, se evitó en todo momento su exposición a la luz visible. Para evitar algún efecto de bacterias u hongos contaminantes sobre los valores de viabilidad, las células se mantuvieron todo el tiempo en condiciones de esterilidad.

3.4.3. Evaluación de la viabilidad celular in vitro de células IEC-18 tratadas con toxina A de Clostridium difficile en combinación con mediadores de respuesta inflamatoria.

Para realizar esta evaluación, se siguió el mismo procedimiento de cultivo y de tratamiento descrito anteriormente.

Las células tratadas con toxina A fueron expuestas por separado o en combinación con diferentes concentraciones de Histamina, PAF y TNF- α

El tratamiento con los mediadores se realizó de dos formas, la primera fue el tratamiento de las células con la toxina A y uno de los mediadores a la vez. En el otro caso las células fueron expuestas con toxina A y con mezclas de dos o hasta 3 de los mediadores antes mencionados a diferentes concentraciones.

Para realizar la evaluación del efecto combinado de la toxina A con un componente de respuesta inflamatoria (RI), se agregaron 50 μ l de toxina a una concentración final de 0.062 μ g/ml más 50 μ l por separado de cada uno de los compuestos de RI Histamina, PAF (Sigma Chemical Co.-USA) o TNF- α (Gibco BRL L.T.-USA), a concentraciones finales de 10,25,50,100,250,500 y 1000nM para Histamina y PAF y de 1, 5, 10, 20 y 50 pg/ml para TNF-alfa.

Para los casos en donde se mezclaron 2 o 3 mediadores con la toxina A, se agregaron 50 μ l de toxina (dos componentes) o 25 μ l de toxina. En el caso de 3 componentes, estos se mezclaron a una concentración final de toxina de 0.062 μ g/ml, utilizándose 25 μ l de cada mediador por pozo a concentraciones finales de 10nM para Histamina y PAF y de 1 pg/ml para TNF- α .

Para analizar el efecto de los mediadores en ausencia de toxina A de *C.difficile*, se agregaron 50 μ l de medio RPMI 1640 sin suero en cada caso.

Las diluciones realizadas para Histamina y PAF se prepararon en solución salina isotónica estéril (NaCl al 0.85%-Merck-Naucalpan México) y se almacenaron a -20°C. Para el caso de TNF- α , el concentrada se preparó en un buffer de azida de sodio al 0.05% y las diluciones se realizaron en solución salina isotónica y se almacenaron a -70°C. En cada caso se prepararon las alícuotas necesarias con el fin de evitar el congelamiento y descongelamiento repetido de las muestras. Debido a que los resultados más confiables se obtuvieron con el colorante H33258, los ensayos de viabilidad de células IEC-18 se hicieron en estos experimentos únicamente con este colorante.

3.5. Análisis Estadístico de los resultados.

Se utilizó el análisis de medidas de tendencia central o de posición y de dispersión, para el análisis de colorantes (bisbenzamidás y la sal de MTT). Para el análisis del efecto de mediadores más toxina se utilizó la prueba de mediana y rangos y la prueba de varianza no paramétrico para probar hipótesis con tres o más grupos independientes (ANOVA: Kruskal-Wallis), dado que la distribución de los datos fue diferente de la normal.

4. RESULTADOS:

4.1 Obtención de los porcentajes de redondeamiento de las células IEC-18 y HRMC tratadas con la toxina A de C.difficile.

Como un paso inicial para analizar el efecto de la toxina A de C.difficile en células epiteliales, se evaluó el redondeamiento celular de células IEC-18 y HRMC tratadas con diferentes concentraciones de toxina (1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.062, 0.031 $\mu\text{g/ml}$), con el fin de determinar en que rango de concentraciones y en que tiempo el efecto de la toxina A sobre las células IEC-18 y HRMC fue evidente microscópicamente.

Analizando las células por observación microscópica cada 30 minutos, se estableció el tiempo al cual la concentración más alta de toxina utilizada producía un redondeamiento del 100% en los diferentes tipos celulares. De las 6 concentraciones analizadas sólo se escogieron 4 para valorar el porcentaje de redondeamiento. El valor de las concentraciones se escogió en base al efecto observado microscópicamente y a los valores de viabilidad obtenidos en las células IEC-18, ya que el tiempo en que ocurrió el redondeamiento de las células HRMC, fue más breve.

Los resultados de porcentaje de redondeamiento y de viabilidad celular para las células IEC-18 y HRMC se muestran en las tablas 1 y 2.

Como se puede observar en la tabla 1, hay un claro efecto de redondeamiento que depende de la dosis de toxina A utilizada y del tiempo de incubación para ambas líneas celulares.

Aunque a la más alta concentración de toxina utilizada, las dos líneas celulares se redondean en un 100%, las células HRMC están casi en un 100% redondeadas a la dosis más baja de toxina.

Los valores de viabilidad observados en la tabla 2 indican que las células de ambas líneas celulares no muestran un deterioro en su viabilidad celular cuando son tratadas con dosis altas de toxina realizando una incubación de 4 horas.

En cuanto a los valores de viabilidad obtenidos a las 24 horas, los resultados indican que las células IEC-18 muestran una disminución considerable en su viabilidad celular aun a la concentración más baja de toxina utilizada.

Para el caso de las células HRMC, éstas permanecen en un 100% viables cuando se trataron con la más alta concentración de toxina.

TABLA I. Efecto de diferentes concentraciones de toxina A de *C. difficile* sobre células IEC-18 y HRMC.

Toxina A (µg/ml)	IEC-18 (%)	HRMC (%)
1	100	100
0,5	95-100	100
0,25	50-80	100
0,125	20-25	95-98

En la tabla se observan los porcentajes de redondeamiento celular de 6 experimentos obtenidos a las 4 horas de incubación con la toxina. Para la línea celular IEC-18 y HRMC existe un efecto de dosis-dependiente, ya que a la concentración más alta de toxina utilizada produce 100% de redondeamiento y muestra que a la más baja concentración, se redondearon sólo en un 25%.

TABLAS 2A Y 2B. Evaluación de viabilidad celular en células IEC-18 y HRMC tratadas con diferentes concentraciones de toxina A de C.difficile a las 4 horas y 24 horas utilizando azul de tripano.

4 horas de tratamiento con toxina A.

2A)

Línea celular	Toxina A (µg/ml)	% de células vivas (4 horas)
IEC-18	1	90
HRMC		100
IEC-18	0,5	90
HRMC		90
IEC-18	0,25	100
HRMC		100

24 horas de tratamiento con toxina A

2B)

Línea celular	Toxina A (µg/ml)	% de células vivas (24 horas)
IEC-18	1	10
HRMC		90
IEC-18	0,5	20
HRMC		100
IEC-18	0,25	30
HRMC		95

En ambas tablas se observan los porcentajes de células vivas de 6 experimentos obtenidos a las 4 horas y 24 horas de tratamiento con la toxina. En la tabla 2A se aprecia que el efecto de las diferentes concentraciones de toxina utilizada no afecto la viabilidad de ambas líneas celulares. Por el contrario, en la tabla 2B se observa que la viabilidad de las células IEC-18 disminuyó casi en un 90% y con un efecto de dosis-dependiente. El tiempo de incubación con las células HRMC no influyo en el porcentaje de viabilidad celular, dado que valores similares de viabilidad celular fueron observados.

4.2. Evaluación de la viabilidad celular en células IEC-18 y HRMC tratadas con la toxina A de C.difficile utilizando las bisbenzamidas H33258 y H33342.

Una vez determinado el rango de concentraciones de toxina A y el tiempo de incubación óptimo para observar un efecto citotóxico, se procedió a encontrar las condiciones en las cuales se podían obtener lecturas reproducibles para el ensayo fluorométrico con las bisbenzamidas H33258 y H33342. Las concentraciones de bisbenzamidas utilizadas fueron las reportadas en la bibliografía (H33258-1 µg/ml y H33342-5 µg/ml). El tratamiento de las células IEC-18 y HRMC con la toxina A se realizó a las 4 horas y a las 24 horas.

Como se observa en la tabla 3, existe un efecto dosis- dependiente, con un incremento de células muertas a la más alta concentración de toxina utilizada. También puede observarse que hay un 76% de células vivas a la más alta concentración de toxina utilizada detectada con el colorante H33258, mientras que un porcentaje de viabilidad del 95% se observa con el ensayo de viabilidad usando el colorante H33342 en la línea celular HRMC.

Aunque existe diferencia en los valores de viabilidad determinada para los dos colorantes, la desviación estándar es menor cuando se usa el colorante H33258.

En la tabla 4, se observan diferencias considerables en los valores de viabilidad cuando se usan diferentes bisbenzamidas, mientras que para el colorante H33258 hay una disminución en el número de células analizadas a las 24 horas, el colorante H33342 indica sin embargo, un aumento en el número de células viables, mayor aún a el número inicial utilizado.

TABLA 3 Evaluación de viabilidad celular en células HRMC tratadas con diferentes concentraciones de toxina A de *C. difficile* a las 4 horas de tratamiento utilizando las bisbenzamidias H33258 y H33342.

Colorante	Toxina A ($\mu\text{g/ml}$)	% de células vivas. (media \pm SD)
H33258	1	66.76 \pm 2.98
H33342	1	95 \pm 4.61
H33258	0,5	82.45 \pm 3.38
H33342	0,5	96.73 \pm 4.48
H33258	0,25	83.1 \pm 3.17
H33342	0,25	94.14 \pm 2.93
H33258	0,125	80.7 \pm 2.08
H33342	0,125	99.83 \pm 5.68

En la tabla 3 se observan los resultados porcentuales promedio de viabilidad celular de 6 experimentos, obtenidos a las 4 horas de tratamiento con la toxina. Los valores de viabilidad obtenidos con el colorante H33258 oscilan entre el 70 y 85 % de células HRMC vivas con diferentes concentraciones de toxina utilizada. Los valores de viabilidad obtenidos con el colorante H33342 oscilan entre el 95 y 100% de células vivas a las diferentes concentraciones de toxina utilizada.

TABLA 4 Evaluación de viabilidad en células HRMC tratadas con diferentes concentraciones de toxina A de *C.difficile* a las 24 horas post-tratamiento.

Colorante	Toxina A (µg/ml)	% de células vivas. (media ± SD)
H33258	1	28.5 ± 4.95
H33342	1	100 ± 4.6
H33258	0,5	49.1 ± 3.42
H33342	0,5	100 ± 4.33
H33258	0,25	41.1 ± 8.8
H33342	0,25	100 ± 3.32
H33258	0,125	48.71 ± 4.85
H33342	0,125	100 ± 3.06

En la tabla 4 se observa la comparación de los porcentajes de viabilidad celular de 3 experimentos obtenidos con los colorantes H33258 y H33342. Nótese que hay diferencias considerables entre los valores obtenidos con el colorante H33258 (que oscilan entre el 30 y 50 % de viabilidad celular) y el colorante H33342 (observándose en todos los casos un 100% de viabilidad celular).

4.3. Evaluación de la viabilidad celular en células IEC-18 y HRMC tratadas con toxina A de C.difficile, utilizando la sal de MTT.

Una vez realizada la evaluación de viabilidad de las células IEC-18 y HRMC utilizando los colorantes H33258 y H33342, se procedió a realizar la evaluación de viabilidad celular utilizando la sal de MTT como colorante, que evalúa la cantidad de células viables considerando una curva patron que sirve para interpolar los datos de densidad óptica.

Como se puede apreciar en la tabla 5, existe un efecto dosis- dependiente de las concentraciones de toxina utilizada, al igual que se mostró en las tablas 3 y 4. En este caso los datos correspondientes a las dos líneas celulares indican que la toxina A tiene un mayor efecto tóxico en las células IEC-18, con respecto a las células HRMC, para todas las concentraciones de toxina utilizada. Así también, los valores de desviación estándar usando el colorante H33258 fueron menos altos que los obtenidos con la sal de MTT. Los valores de viabilidad obtenidos para el caso de las células HRMC son similares a los obtenidos con el colorante H33342 (como se observa en la tabla 3).

TABLA 5. Evaluación de la viabilidad celular por el ensayo de MTT en células IEC-18 y HRMC tratadas con diferentes concentraciones de toxina A de *C.difficile*

Tipo celular	Toxina A (µg/ml)	% de células vivas. (media ± SD)
IEC-18	1	58.61 ± 4.2
HRMC	1	84.63 ± 6.04
IEC-18	0,5	82.72 ± 7.74
HRMC	0,5	89.82 ± 4.53
IEC-18	0,25	84.07 ± 4.39
HRMC	0,25	97.12 ± 3.02
IEC-18	0,125	83.07 ± 5.14
HRMC	0,125	100 ± 3.03

En la tabla 5 se observan los valores promedio de porcentajes de células vivas de 7 experimentos obtenidos a las 4 horas de tratamiento con la toxina.

Se observa que para la línea celular IEC-18 hay un ligero efecto dosis-dependiente con respecto al porcentaje de células vivas para cada una de las concentraciones de toxina utilizadas; estos valores de viabilidad oscilan entre el 60 y 85%.

Para el caso de la línea celular HRMC se observa poco efecto comparado con el caso anterior, osciando los valores de viabilidad entre un 85 % a un 100%.

4.4. Evaluación de la viabilidad celular en células IEC-18 tratadas con toxina A de *C.difficile* y diferentes mediadores de respuesta inflamatoria.

De la primera determinación realizada en este trabajo se seleccionó una concentración de toxina A que no dañara a las células IEC-18 (a las 4 horas de tratamiento), con el objeto de evaluar un efecto sinérgico entre la toxina A de *C.difficile* y tres mediadores de respuesta inflamatoria: Histamina, PAF y TNF- α .

Para efectuar esta evaluación se utilizó el H33258, y los resultados de la viabilidad celular mostraron un error estándar menor que los otros colorantes probados (H33258=1.18, H33342=2.55 y MTT=1.51 valores promedio).

Los valores de viabilidad observados en la tabla 6, indican que existe un efecto sinérgico de histamina cuando se combina con toxina A, para provocar daño en la línea celular IEC-18, concordando esta observación con el análisis estadístico realizado obteniéndose una p significativa (prueba de la mediana $p=0.0209$ y Kruskal-Wallis $p=0.050$).

En cuanto a las diferencias de los valores de viabilidad obtenidos para cada una de las concentraciones de histamina utilizadas, ligeras diferencias fueron observadas, por lo que no hay un efecto dosis-dependiente.

Los valores de viabilidad observados en la tabla 7 indican al igual que en la tabla 6, que existe un efecto mayor de daño en células IEC-18 cuando hay una combinación de la toxina A de *C.difficile* con PAF en relación al tratamiento únicamente con PAF, sin embargo con el análisis estadístico realizado se obtuvo una p no significativa.

Nuevamente, la concentración no tuvo un efecto estadísticamente significativo en los resultados de viabilidad celular obtenidos para cada una de las concentraciones de PAF utilizadas.

En la tabla 8, se observan los resultados con TNF- α y toxina A de *C.difficile*. Al igual que en los tratamientos anteriores, no existe un efecto dosis-dependiente en las concentraciones utilizadas de TNF- α . Se aprecian diferencias mínimas entre el tratamiento de toxina más TNF- α y solo TNF- α ; en este caso el análisis estadístico mostró una p significativa (prueba de la varianza $\mu= 0.004$ y Kruskal-Wallis $p= 0.0004$). Indicando que hay un mayor daño a las células IEC-18 por la combinación de TNF- α más toxina, ya que histamina y PAF sólo generaron pequeños cambios en los porcentajes de viabilidad celular.

En la tabla 9, se observa que hay un aumento en el número de células viables cuando las células IEC-18 son tratadas con la combinación de toxina A y los tres mediadores en conjunto; obteniéndose en el análisis estadístico una p no significativa.

TABLA 6. Evaluación de viabilidad celular de células IEC-18 tratadas con toxina A de *C. difficile* y con Histamina

Concentraciones de Histamina	Porcentaje de células vivas. Con toxina (media ± SD)	Porcentaje de células vivas. Sin toxina (media ± SD)
25nM	90.94 ± 2.1	94.04 ± 2.69
50nM	90.25 ± 2.65	92.49 ± 3.57
100nM	86.3 ± 3.54	90.08 ± 1.46
250nM	89.56 ± 2.98	91.8 ± 3.83
500nM	89.38 ± 2.78	92.15 ± 0.93
1µM	76.63 ± 4.44	88.35 ± 3.21

En esta tabla se observan los valores promedio de porcentaje de células vivas de 4 experimentos obtenidos a las 4 horas de incubación con toxina A (0.062µg/ml) y con diferentes concentraciones de histamina (25, 50, 100, 250, 500 nM y 1µM).

Los porcentajes de viabilidad celular oscilan entre un 80 a un 90% tanto, para las células tratadas con la combinación de toxina más histamina, como aquellas células tratadas sólo con histamina.

Valor de la $p=0.050$ para la prueba de Kruskal-Wallis y $p=0.0209$ para la prueba de la mediana.

TABLA 7. Evaluación de viabilidad celular de células IEC-18 tratadas con toxina A de *C.difficile* y con PAF

Concentraciones de PAF	Porcentaje de células vivas. Con toxina (media \pm SD)	Porcentaje de células vivas. Sin toxina. (media \pm SD)
25nM	82.28 \pm 6.63	88.73 \pm 8.08
50nM	82.5 \pm 7.84	88 \pm 8.1
100nM	81.55 \pm 6.83	87.01 \pm 7.35
250nM	82.09 \pm 6.71	89.36 \pm 8.91
500nM	81.36 \pm 6.56	86.33 \pm 6.06
1 μ M	70.36 \pm 5.72	83.59 \pm 7.73

En esta tabla se muestran los valores promedio de porcentaje de células vivas de 5 experimentos obtenidos a las 4 horas de incubación con toxina A (0.062 μ g/ml) y con diferentes concentraciones de PAF (25,100,250,500 nM y 1 μ M).

Obsérvese que los porcentajes de viabilidad oscilan entre un 75 a un 95% tanto para las células tratadas con la combinación de toxina más PAF como sólo las tratadas con PAF.

Valor de la $p=0.057$ para la prueba de Kruskal-Wallis y $p=0.60$ para la prueba de la mediana

TABLA 8. Evaluación de viabilidad celular de células IEC-18 tratadas con toxina A de *C.difficile* y con TNF-alfa

Concentraciones de TNF-alfa	Porcentaje de células vivas. Con toxina. (media ± SD)	Porcentaje de células vivas. Sin toxina. (media ± SD)
5pg/ml	60.98 ± 4.19	73.45 ± 4.25
10pg/ml	65.57 ± 5.95	74.74 ± 2.46
20pg/ml	61.14 ± 4.15	73.41 ± 2.52
50pg/ml	54.65 ± 3.14	67.66 ± 2.74

Los valores promedio de porcentaje de células vivas de 4 experimentos obtenidos a las 4 horas de incubación con toxina A (0.062µg/ml) y con diferentes concentraciones de TNF-alfa (5,10,20 y 50pg) se muestran en la tabla anterior.

Los porcentajes de viabilidad oscilan entre un 60 a un 75% tanto para las células tratadas con la combinación de toxina más TNF-alfa, como para células IEC-18 tratadas únicamente con TNF-alfa.

Valor de la $\mu=0.0004$ para la prueba de Kruskal-Wallis y $p=0.004$ para la prueba de la mediana.

TABLA 9. Evaluación de viabilidad celular en células IEC-18 tratadas con toxina A de *C.difficile* y con diferentes mediadores de respuesta inflamatoria.

Tipo de mediador	Porcentaje de células vivas. Con toxina. (media \pm SD)	Porcentaje de células vivas. Sin toxina. (media \pm SD)
Histamina-PAF	100 \pm 0	82.24 \pm 6.47
Histamina-TNF-alfa	92.85 \pm 3.02	87.26 \pm 5.61
PAF-TNF-alfa	98.67 \pm 1.32	91.45 \pm 4.12
Histamina-PAF-TNF-alfa	95.11 \pm 2.82	93.4 \pm 3.01

En la tabla 9 se observan los valores promedio de los porcentajes de células vivas de 4 experimentos obtenidos a las 4 horas de tratamiento con toxina A (0.062 μ g/ml) y con diferentes mediadores de respuesta inflamatoria (Histamina y PAF 10nM y TNF-alfa 1pg/ml). El porcentaje de células vivas para todos los casos oscila entre 85 y 100%. A diferencia de los experimentos anteriores, aquí se observa que hay más células vivas cuando se trataron con toxina A más mediadores.

También se observa que cuando se realizó el tratamiento donde se combinó PAF y otro mediador más toxina, hay más células vivas que en los otros tratamientos.

Valor de $p=0.1573$ para la prueba de Kruskal-Wallis y $p=0.067$ para la prueba de la mediana.

5. DISCUSION

Los ensayos de viabilidad celular son ampliamente usados para evaluar el efecto de drogas quimioterapéuticas (Haugland, 1992-1994) y otros agentes tóxicos, incluyendo el efecto de algunas toxinas bacterianas (Yui-J y cols, 1994; Tan-ZL y cols, 1994 y Garza-Ocasas-L y cols, 1994; Petty y cols, 1994 y Frankfurt, y cols 1993).

El propósito de este trabajo fue establecer, comparar y probar la eficacia de tres colorantes vitales para determinar el efecto de la toxina A de *Clostridium difficile* sobre las líneas celulares IEC-18 y HRMC.

Así también se investigó el daño provocado por la toxina A de *Clostridium difficile* en presencia de compuestos de respuesta inflamatoria.

Las bisbenzamidas H33258, H33342 y el colorante MTT fueron los compuestos que se utilizaron para determinar la viabilidad celular.

Los colorantes H33258 y H33342 se unen al DNA presente en el núcleo de las células teniendo gran afinidad por el par de bases Adenina-Timina. Se han utilizado en la mayoría de las veces para determinar cualquier anomalía en el DNA (Loeffler y Ratner, 1989), también se han utilizado para medir la proliferación de linfocitos (Ricards y cols, 1985; Blaheta y cols, 1991) y muy pocas veces para determinar viabilidad celular (Blaheta y cols, 1991).

Sin embargo, dada la sensibilidad y la simplicidad del método, el uso de las bisbenzamidas para evaluar la viabilidad de células tratadas con compuestos tóxicos resulta ser muy útil.

La diferencia entre uno y otro colorante radica en que el Hoechst 33258 no puede penetrar a la membrana celular por tener un hidroxilo como sustituyente, siendo necesario hacer un pretatamiento a

la membrana celular (Blaheta y cols,1991). En cambio, el Hoechst 33342 al tener un sustituyente etoxilo, penetra libremente a la membrana celular (Blaheta y cols,1991).

Las concentraciones de estos colorantes usadas en este trabajo, fueron similares a las reportadas en otros trabajos que midieron la proliferación y/o viabilidad celular (H33258 1 mg/ml y H33342 5 mg/ml) (Blaheta y cols,1991).

La forma en que se realizaron los ensayos con las bisbenzamidas se basó principalmente en los experimentos de Blaheta y cols. (1989). Las modificaciones hechas en este trabajo se realizaron en base a la obtención de las condiciones óptimas para evaluar la viabilidad de las células tratadas con la toxina A.

En los resultados no se muestran los datos correspondientes a la determinación de la viabilidad celular usando las bisbenzamidas de las células IEC-18 porque la toxina A produce un efecto de necrosis celular aún a bajas concentraciones, por lo que los valores de densidad óptica fueron siempre muy altos y no cuantificables. La toxina A daña más a las células IEC-18 que a las células HRMC y por tanto al retirar el sobrenadante donde se encontraba la toxina se desprendían una gran cantidad de estas células, aún cuando la microplaca fue centrifugada. Por otro lado, y dado que la toxina A permanece adherida a la membrana celular de las células IEC-18 tratadas (Fiorentini y cols. 1991), y debido a que esta toxina reacciona con ambos colorantes, se obtuvieron lecturas mayores a los valores obtenidos en la curva estándar. La razón de por qué sucedió esto con las células IEC-18 y no con las células HRMC no está clara, pero probablemente se deba a la forma diferente con que se efectúa el procesamiento de la toxina en ambas células y por lo tanto, el efecto citotóxico observado por determinaciones de viabilidad indican que la toxina provoca necrosis en las células IEC-18, mientras que esto no ocurre en las células HRMC.

Por lo tanto, para evaluar el daño de la toxina A en las células IEC-18 y para comparar la eficacia, sensibilidad y reproducibilidad de los resultados obtenidos con los tres colorantes en las células HRMC, se procedió a utilizar el método de MTT diseñado por Mosmann (1983).

Dicho bioensayo colorimétrico ha sido el más usado para determinar viabilidad celular en una amplia gama de experimentos en donde se evalúa citotoxicidad de compuestos químicos sobre líneas celulares (Ashman, 1986); especialmente debido a su facilidad de aplicación, sensibilidad, reproducibilidad y sobre todo su bajo costo y su baja toxicidad (Richards y cols, 1985).

La concentración de MTT utilizada en este trabajo para los ensayos de viabilidad, ésta por debajo de la reportada por Mosmann, y por la mayoría de trabajos que han utilizado la sal de MTT para determinar viabilidad celular (Cedillo y cols, 1992; Ferrari y cols, 1990; Ponce-Macotela y cols, 1994 y Yuri-J y cols, 1994).

Esta concentración (350 mg/ml), se utilizó para evitar falsos positivos, ya que como se mencionó antes, las bisbenzamidas reaccionaron con la toxina A de *C. difficile* remanente sobre la superficie de células IEC-18 después de la incubación.

Basándose en el trabajo que realizaron Cedillo y cols. utilizando metasulfato de fanacina (PMS), que es un acarreador de electrones, se utilizó este compuesto con el fin de acelerar la reducción del MTT, reduciendo el tiempo de incubación de 4 horas a 1 hora.

El PMS actúa entre las enzimas y el MTT (Cedillo y cols, 1992). La concentración usada de PMS en este trabajo fue de 2.5 mg/ml (Cedillo y cols, 1992). La incubación con MTT/PMS en células tratadas con toxina A fue de 2 horas a 37° C, tiempo que es usado normalmente en estos ensayos, aun en ausencia del PMS (Ashman y cols, 1986 y Berg y Hausen, 1989).

La incubación por 3 horas a -4° C del formazán producido facilitó la lectura y solubilización de los cristales, de manera similar a lo reportado por Cedillo y cols (1992).

Haciendo una comparación entre los resultados de porcentajes de redondeamiento con los valores correspondientes de viabilidad celular en células HRMC utilizando los tres colorantes y en el caso de IEC-18-MTT, encontramos que el grado de redondeamiento celular provocado por la toxina A en las células IEC-18, va relacionado con el grado de muerte celular, ya que a la concentración más baja de toxina utilizada (0.125 mg/ml) se obtuvo un 20% de letalidad cuando se evaluó con la sal de MTT.

Para el caso de las células HRMC, los valores de viabilidad determinados con los fluorocromos y la sal de MTT, indican que no hay daño considerable en esta células, aún usando la concentración más alta de toxina A (1 mg/ml).

Si se observan los datos de viabilidad obtenidos a las 4 horas y a las 24 horas con el colorante H33258 y se relacionan con los valores de redondeamiento celular, se puede observar que la toxina A daña a las células HRMC, pero este daño es mucho menor al observado en las células IEC-18.

En los resultados no se muestran los datos correspondientes de la determinación de la viabilidad celular a las 24 horas de tratamiento con la toxina A usando la sal de MTT de las células IEC-18 y HRMC; como se mencionó anteriormente, el procesamiento de la toxina A por las células IEC-18 probablemente afectó la determinación de viabilidad celular cuando se utilizaron las bisbenzanidas ocurriendo lo mismo con la sal de MTT. En el caso de las células HRMC pudo haber ocurrido lo mismo que con las células IEC-18.

Comparando la eficiencia de cada colorante para medir viabilidad, encontramos que el colorante H33258 resultó ser más adecuado, ya que al no penetrar a la membrana celular de células intactas el fondo inespecífico disminuye y las lecturas registradas sólo correspondieron a la fluorescencia emitida

por las células dañadas o muertas después de haberlas tratado con la toxina A de *C.difficile*, las cuales exponen su DNA directamente para el enlace del colorante a los pares de bases A-T del DNA.

La valoración estadística de los tres colorantes utilizados, demostró además que los valores de viabilidad obtenidos con el Hoechst 33258 tienen un valor de error estándar menor al mostrado por los otros colorantes usados (H33258=1.18, H33342=2.55 y MTT=1.51 valores promedio), indicando nuevamente que las evaluaciones de viabilidad con este colorante son adecuadas y significativas para medir el porcentaje de células tratadas y no tratadas con toxina.

Considerando que el colorante H33258 fue el mejor indicador de viabilidad celular, se utilizó para medir el sinergismo de diferentes mediadores de respuesta inflamatoria con toxina A de *C.difficile*.

Los resultados obtenidos por el tratamiento combinado de toxina A con diferentes mediadores de respuesta inflamatoria, mostraron que TNF- α produce mayor un daño a las células IEC-18, implicando que la liberación de este compuesto por células cebadas activadas o dañadas, puede contribuir *in situ* al daño de células epiteliales. Esto se considera debido a que las células cebadas poseen una gran cantidad de TNF- α preformado que se libera bajo activación (Befus, 1994); Flegel y cols. (1991) han encontrado además que la toxina A de *C.difficile* es un potente inductor de citocinas (IL-1, TNF- α y IL-6) en monocitos, y muy probablemente el nivel de TNF- α se incrementa en las células cebadas tratadas con toxina A de *C.difficile*.

Los ensayos en los que se midió el efecto combinado de toxina con mediadores de respuesta inflamatoria, mostraron que, tanto la histamina (aunque en menor grado) como el TNF- α mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de viabilidad en células tratadas con toxina A, y diferentes mediadores con respecto a células tratadas únicamente con mediadores (tablas 7 y 9 de resultados). Sin embargo, con el PAF no ocurrió lo mismo.

Los resultados obtenidos en la tabla 9, no mostraron estadísticamente diferencias significativas, apesar de observarse mayor número de células vivas cuando se combinó la toxina A con dos o tres mediadores que cuando no se realizó dicha combinación.

Por lo tanto, no se puede descartar que exista un ligero sinérgismo entre toxina A de C.difficile y mediadores de respuesta inflamatoria, ya que en todos los casos, la combinación de toxina A y mediadores produjo un mayor número de células muertas; esto sugiere que probablemente los mediadores de respuesta inflamatoria colaboran para acentuar el daño citotóxico de la toxina A a nivel intestinal como se ha mencionado en algunos trabajos (Flegel y cols,1991), en donde, la toxina A de C.difficile es un promotor de la liberación de histamina en leucocitos (Asako y cols.1992) y es el principal mediador inflamatorio en enterocolitis causada en animales experimentales (Potkoulakis y cols, (1993). Con esto se refuerzan los estudios realizados con neutrófilos, los cuales indican que la toxina A de C.difficile es una enterotoxina pro-inflamatoria cuyos efectos tóxicos dependen de la activación y reclutamiento de células inmunes a nivel intestinal (Joshi y cols. 1992).

La utilización de estos tres colorantes fue de gran utilidad para evaluar el efecto citotóxico de la toxina A en las líneas celulares aquí probadas; siendo el colorante H33258 el que mejor funcionó para medir viabilidad celular por sus características ya antes mencionadas. El uso de estos métodos nos puede permitir entender mejor el efecto de la toxina A a nivel intestinal en ausencia o presencia de mediadores de respuesta inflamatoria.

6. CONCLUSIONES

1) El colorante H33258 fue el más efectivo de los tres colorantes utilizados en este trabajo para medir viabilidad celular de células IEC-18 y HRMC tratadas con la toxina A de *Clostridium difficile*, por la reproducibilidad, sensibilidad, bajo costo, rapidez y facilidad de sus ensayos.

2) El efecto citotóxico de la toxina A de *Clostridium difficile* es mayor en la línea celular IEC-18 y no en la línea celular HRMC, lo cual sugiere una probable especificidad citotóxica de esta toxina a células epiteliales intestinales y no a células cebadas.

3) La Histamina y el TNF- α son capaces de actuar en combinación con la toxina A de *Clostridium difficile* para dañar a las células IEC-18.

7. BIBLIOGRAFÍA

Abbas, K.A., Lichtman, H.A. y Pober, S.J. (1993) Cellular and molecular immunology. W.B. Saunders Company. Hancourt Brace Jovanovich, Inc., USA.

Allen, N.C., Harpur, S.E., Gray, B.J.T., Simmons, L.N. y Hirst, H.B. (1990) Effect of bis-carboxyethyl-carboxyfluorescein (BCECF) by novel ATP-dependent transport mechanism in epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*,172:262.

Arksmmar, P., Hallberg, A., Kindmark, H., Nilsson, T., Rorsman, P. y Berggren, P.O. (1990) Extracellular ATP increases cytoplasmic free Ca concentration in clonal insulin-producing Rinn5F cells. *Biochem. J.*,265:203.

Asako, H., Kelly, C.P., Pothoulakis, C., LaMont, J.T. y Granger, D.N. (1992) *Clostridium difficile* toxin A promotes leukocyte rolling and increases vascular permeability in rat mesenteric venules. (abstr) *Gastroenterology*,102:A235.

Ashman, R.B. (1986) A colorimetric method for measuring the candidacidal activity of leucocytes. *J. Immunol Methods*,94:209.

Ashman, R.I., Jarhoe, D.L., Conrad, D.H. y Huff, T.E. (1991) The mast cell-committed progenitor. In vitro generation of committed progenitors from bone marrow. *J. Immunol.*,146:211.

Arndt-Jovin, D.J. y Jovin, T.M. (1977) Analysis and sorting of living cells according to deoxyribonucleic acid content. *J. Histochem Cytochem*,25:585.

Balazs, M., Illges, G. y Vadasz, G. (1989) Mast cells in ulcerative colitis. Quantitative and ultrastructural studies. *Virchows Arch. Cell Pathol.*,51:353.

Bank, L.H. (1988) Rapid assessment of islet viability with acridine orange and propidium iodide. *In Vitro Cell and Devel. Biol.*,24:266.

Bartlett, G. John (1990) *Clostridium difficile*: Clinical Considerations. *Reviews of Infect. Diseases*, vol. 12, supplement 2, Jan-Feb: s243-s251.

Barret, E. Kim (1993) "Control of colonic chloride secretion". *Immunophysiology of the Gut*; Academic Press, Inc.:81.

Befus, D.A. (1994) "Handbook of Mucosal Immunology". *Inflammation: Mast Cell*. Academic Press, Inc. p.p.307-314.

Bissonnette, E.Y. y Befus, A. (1990) Inhibition of mast cell-mediated cytotoxicity by interferons alpha/beta and gamma. *J. Immunol.*,145:3385.

Bissonnette, E.Y. y Befus D. A. (1993) "Immunopharmacology of the Gastrointestinal System". Modulation of Mast Cell function in the gastrointestinal tract. Academic Press, Inc. p.p.96-103.

Blaheta, R.A., Franz, M., Auth, M.K.M., Wenisch, H.J.C. y Markus, B.H. (1991) A rapid non-radioactive fluorescence assay for the measurement of both cell number and proliferation. *J. of Immunol.Methods.* 142:199.

Borriello, P.S., Davies, H.A., Barclay y F.E. (1988) Detection of fimbriae amongst strains of *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiol. Lett.*,49:65.

Borriello, P.S., Davies, A.H., Kamiya, S., Reede, J.P y Seddon, S. (1990) Virulence factors of *Clostridium difficile*. *Reviews of Infect. Diseases*,vol.12,supplement 2,Jan-Feb:s185-s191.

Brenan, M. y Parish C.R. (1988) Intracellular fluorescent labelling of cell for analysis of lymphocyte migration. *J.Immunol.Methods.*74:31.

Brock, D.T., Smith, W.D. y Madigan, T.M. (1993) *Microbiologia. De.* Prentice-Hall Hispanoamericana, S.A.

Burd, P.R., Roger H.W. y Gordon J.R. (1989) Interleukin 3-dependent and independent mast cell stimulated with IgE and antigen express multiple cytokines. *J. Exp. Med.*,170:245.

Castagliuolo, J., Leutoumeau, R., Kelly, C.P., Theoharides, T.C., LaMont, J.T. y Polihoulakis, C. (1993) Mucosal mast cell degranulation is an early event in *Clostridium difficile* enteritis in rat ileum (abstr). *Gastroenterology*,104:A677.

Castro, A. Gilbert (1993) "Immunological regulation of epithelial function". Immunophysiology of the Gut. Academic Press, Inc.:7.

Cedillo, R. R., Ramirez, A. y Muñoz, O. (1992) A rapid colorimetric assay with the tetrazolium salt MTT and phenazine methosulfate (PMS) for viability of *Entamoeba histolytica*. *Archives of Medical Research*.vol.23,no.2:59.

Darzynkiewicz, Z. y Andreeff, O. (1981) Multiparameter flow cytometry.Pat1:Application in analysis of the cell cycle. *Clin.Bull.*,47.

Däubener, W., Leiser, E., von Eichel-Streiber, C y Hadding, U. (1988) *Clostridium difficile* toxins A and B inhibit human immune response in vitro. *Infect. Immun.*,56:1107.

Denizot, F. y Lan, Rita. (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. *J. Immunol Methods*,89:271.

Doherty, P., Mann, A.D. y Walsh, S.F. (1988) Comparison of the effects of NGF, activators of protein kinase C, and a calcium ionophore on the expression of Thy-1 and N-CAM in PC12 cell cultures. *J. Cell Biol.*,107:333.

Dotsika, N.E. y Sanderson, J.C. (1987) A fluorometric assay for determining cell growth in lymphocyte proliferation and lymphokine assays. *J. Immunol Methods*,105:55.

Dove, C.H., Wang, S.Z., Price, S.B., Phelps, C. J., Lyerly, D.M., Wilkins, T.D. y Johnson, J.L. (1990) Molecular Characterization of the *Clostridium difficile* Toxin A Gene. *Inf. Immunol.*,58:480.

Dvorak, A.M., Monahan, R.A., Osage, J.E. y Dickersin, G.R. (1980) Crohn's disease: transmission electron microscopic studies II. Immunologic inflammatory response. Alterations of mast cell, basophils, eosinophils and the microvasculature. *Hum. Pathol.*,11:606.

Durand, R.E. y Olive, O.L. (1992) Cytotoxicity, mutagenicity and DNA damage by Hoechst 33343. *J. Histochem Cytochem*,30:111.

Eck, H-P., GMünder, H., Hartmann, M., Petzoldt, D., Daniel, V. y Dröge, W. (1989) Low concentrations of acid-soluble thiol (cysteine) in the blood plasma of HIV-1-infected patients. *Biol. Chem. Hoppe Seyler*,370:101.

Enciso, J. A., Blissonette, E. Y. y Befus, A.D. (1996) Regulation of mRNA levels of TNF- α and the alpha chain of the high affinity receptor for IgE in mast cells by IFN- γ and alpha/beta. *International Archive of Allergy and Immunology*. En Prensa.

Essig-Marcello, S.J. y Van Buskirk, R.G. (1990) A double-label in situ cytotoxicity assay using the fluorescent probes neutral red and BCEF-AM. *In Vitro Toxicol*,3:219.

Ferrari, M., Fomasiero, M.Ch. y Isetta, A.M. (1990) MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *J. Immunol. Methods*,31:165.

Fisher, G., Rice C.G. y Hahn M.G. (1986) Dansyl Lysine, a new probe for assaying heat-induced cell killing and thermotolerance in vitro and in vivo. *Cancer Res.*,46:506-1.

Finney, J.M.T. (1893) Gastro-enterostomy for cicatrizing ulcer of the pylorus. *Bull Johns Hopkins Hosp*,4:53.

Fiorentini, C., Arancha, G., Paradisi, S., Donelli, G., Giuliano, M., Piemonte, F. y Mastrantonio, P. (1989a) Effects of *Clostridium difficile* toxins A and B on cytoskeleton organization in HEp-2 cells: a comparative morphological study. *Toxicon*,27:1209.

Fiorentini, C. y Thelestam, M. (1991) *Clostridium difficile* toxin A and its effects on cells. Review Article. *Toxicon*, vol.29, No.6:543.

Flegel, W.A., Muller, F., Daubener, W., Fisher, H.G., Hadding, U. y Northoff, H. (1991) Cytokine response by human monocytes to *Clostridium difficile* toxin A and B. *Infect. Immun.*,59:3659.

Fox, C.C., Roche, J.K. y Lichtenstein, L.M. (1987) Immediate hypersensitivity responses in idiopathic inflammatory bowel disease (IBD). histamine release from human intestinal mast cell in response to gut epithelial antigens (abstr) *Gastroenterology*,92:1394.

Frankfurt, O.S. (1983) Increased uptake of vital dye Hoechst 33342 during S-phase in synchronized HeLa S3 cell. *Cytometry*,4:216.

Galli, J. Stephen (1993) "New Concepts About the Mast Cell". *Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital.*, Boston. vol.328, No.4:257.

Garza-Ocanas, J., Jiang, T., Acosta, D. y Torres, A.O. (1994) Comparison of the hepatotoxicity of toxin T-514 of *Karynskia humboldtiana* and diastereoisomer in primary liver cell cultures. *Toxicol.*,32(10):1287.

Gilbert, R.J., Triadafilopoulos, G., Pothoulakis, C., Gianpaolo, C. y LaMont, J.T. (1989) Effect of purified *Clostridium difficile* toxins on intestinal smooth muscle. I. Toxin A. *Am. J. Physiol.*,256:G759-G766.

Gillies, R.J., Didier, N. y Denton, M. (1986) Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal. Biochem.*,159:109.

Goldstein, S. y Korczak, L.B. (1981) Status of mitochondria in living human fibroblast during growth and senescence in vitro: use of the laser dye rhodamine 123. *J. Cell Biol.*,91:392.

Gray, R.W.D. y Morris J.P. (1987) The use of fluorescein diacetate and ethidium bromide as a viability stain for isolated islets of Langerhans. *Stain Technol.*,62:373.

Gunerlock, H.P., Tang, J.Y., Weiss, B.J. y Silva jr., J. (1993) Specific detection of toxigenic strains of *Clostridium difficile* in stool specimens. *J. Clin. Microbiol.*,31:507.

Hafiz, S. (1974) *Clostridium difficile* and its toxins. Leeds: University of Leeds. (Tesis de doctorado).

Hall, I.C.O'Tuole, E. (1935) Intestinal flora in new-born infants: with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficile*. *Am. J. Dis. Child.*,49:390.

Haugland, P. Richard. "Fluorescent Dyes for Assessing Vital Cell Functions". *Cent Probes and Research Chemicals 1992-1994 of Molecular Probes*, p.p. 172-180.

Hansen, B.M., Nielsen, E.S. y Berg, K. (1989) Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol Methods*,199:203.

Hecht, G., Pothoulakis, C., LaMont, J.T. y Madara, J.L. (1988) *Clostridium difficile* toxin A perturbs cytoskeletal structure and tight junction permeability of cultured human intestinal epithelial monolayers. *J. Clin. Invest.*,82:1516.

Henriques, B., Florin, I. y Thelestam, M. (1987) Cellular internalization of *Clostridium difficile* toxin A. *Microb. Pathogen.* 2:455.

Holgate, S.T., Ribinson, C. y Cherch M.K (1988) Mediators of immediate hypersensitivity. In: Middleton E. jr., Reed C.E., Ellis E.F., Adkinson N.F. jr. Yumminger J.W. eds., *Allergy: principles and practice* 3rd de. St. Louis: C.V. Mosby:135.

Ikejima, T., Diarello, C.A., Gill, D.M. y Wolff, S.M. (1984) Induction of human interleukin-1 by a product of *Staphylococcus aureus* associated with toxic shock syndrome. *J.Clin. Invest.*,73:1312.

Jennings, B.R. y Ridler, P.J. (1983) Interaction of chromosomal stains with DNA: An electrofluorescence study. *Biophys. Struct. Mech.*,10:71.

Joshi, M.A., Linevski, J.K., O'Keane, C.J., Pothoulakis, C., LaMont, J.T. y Kelly, C.P. (1992) Neutrophil recruitment is required for *Clostridium difficile* toxin A enterotoxicity in vivo (abstr). *Gastroenterology*,102:A928.

Kamiyaga, S., Reed, P.J. y Borriello, S.P. (1989) Purification and characterization of *Clostridium difficile* toxin A by bovine thyroglobulin affinity chromatography an dissociation indenaturing conditions with or without reduction. *J.Med.Microbiol*,30:69.

Kapuscinsky, J. y Skoczylas, B. (1977) Simple and rapid fluorometric method for DNA microassay. *Anal. Biochem*,83:252.

Kaslow, H.R., Groppi, V.E., Abood, M.E. y Boume, H.R. (1981) Cholera toxin can catalyze ADP-Ribosylation of cytoskeletal proteins. *J. Cell Biol.*,91:410.

Katoh, T., Higak, M., Hond, T. y Miwaatan, T. (1986) Cytotoxic effect of *Clostridium difficile* enterotoxin on chinese hamster ovary cell. *FEMS Microbiol. Lett.*,34:241.

Kelly, C. P., Pothoulakis, J. Orellana y J. T. LaMont (1992) Human colonic aspirates containing immunoglobulin antibody to *Clostridium difficile* toxin A inhibit toxinA-receptor binding. *Gastroenterology* 102:32.

Kelly, P. Ciaran, Pothoulakis, C. y LaMont, T.J. (1994) *Clostridium difficile* colitis. *Current Concepts-Kelly et al.*,257.

Kinsey, B.M. (1987) Synthesis and Biological studies of iodinated (127/125I) Derivatives of rhodamine. *J.Med.Chem.*,30:1757.

- Kirshenbaum, A.S., Kessler, S.W., Golf, J.P. y Metcalfe, D.D. (1991) Demonstration of the origin of human mast cells from CD34+ bone marrow progenitor cells. *J. Immunol.*, 146:1410.
- Kliot-Fields, T., Finney, D.A. y Wiseman, A. (1983) Purification of hybrids by fluorescence-activated cell sorting. *Somatic Cell Genetics*, 9:375.
- Kolber, M.A. (1988) Measurement of cytotoxicity by target cell release and retention of fluorescent dye Bis-carboxyethyl-carboxyfluorescein (BCECF). *J. Immunol.*, 108:255.
- Kowalski, M., Haming, K., Klöck, G., Gessner, P., Zimmerman, U., Neil, A.G. y Sammons, W.B. (1990) Electrofused mammalian cells analyzed by free-flow electrophoresis. *BioTechniques*, 9:332.
- Krivan, H.C. y Wilkins, T.D. (1997) Purification of *Clostridium difficile* toxin A by affinity chromatography on immobilized thyroglobulin. *Infect. Immun.*, 55:1873.
- Larson, H.E. y Price B.A. (1977) Pseudomembranous colitis: presence of clostridial toxin. *Lancet*, 11:1312.
- Latt, S.A. y Stetten, G. (1976) Spectral studies on 33258 Hoechst and related bisbenzimidazole dyes useful for fluorescent detection of deoxyribonucleic acid synthesis. *J. Histochem. Cytochem.*, 24:24.
- Latt, S.A. (1977) Fluorometric detection of deoxyribonucleic acid synthesis; possibilities for interfacing bromodeoxyuridine dye techniques with flow fluorometry. *J. Histochem Cytochem.*, 25:913.
- Lauritsen, K., Laurset, L.S. Bukhave, K. y Rask-Madsen, J. (1989) Inflammatory intermediaries in inflammatory bowel disease. *Intest. J. Colorectal Dis.*, 4:75.
- Leeder, S.J. (1989) Fluorescence-Based viability assay for studies of reactive drug intermediates. *Anal. Biochem.*, 174:364.
- Lehninger, Nelson y Cox (1993) Principles of Biochemistry. Second edition Worth Publishers. USA.
- Lennette/Balows/Hausler/Shadomy. (1993) Manual de Microbiología Clínica. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Lett-Brown, M.A., Alam, R. y Grant, J.A. (1989) In "The year in immunology 1988. Immunoregulatory cytokines and cell growth" (eds J.M. Cruse and R.E. Lewis jr.) :195-204, Karger, Basel, Switzerland.
- Leung, D. Y. M., Kelly, C. P., Boguniewicz, M., Pothoulakis, LaMont, J.T. y Flores, A. (1991) Treatment with intravenously administered gamma globulin of chronic relapsing colitis induced by *Clostridium difficile* toxin. *J. Pediatr.* 118:633.

Lima, A.A.M., Lyerly, D.M., Wilkins, T.D., Innes, D.J. y 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*. *Infect. Immun.*,56:582.

Lin, L.K., Sekura, R.D. y Kaslow, H.R. (1985) Adenin nucleotides directly stimulate pertussis toxin. *J. Biol. Chem.*,260:2585.

Lizak, E.G. y Gnumet, C.F. (1980) A new micromethod for *in vitro* detection of antiplatelet Antibodies. C-FDA thromboeyte toxicity. *Human. Immunol.*,11:87.

Loeffler, D. y Ratner, S. (1989) *In vivo* localization of lymphocytes labelled with low concentrations of Hoechst 33342. *J. Immunol Methods*,119:95.

London, M.J.N., et al (1989) A microfluorometric viability assay for isolated human and rat islets of Langerhans. *Diabetes Res.*,12:141.

Lytton, M.J., Keeler, K.D. y Thomas, D.B. (1980) Vital DNA staining and cell sorting by flow microfluorometry. *J. Cell Physiol.*102:175.

MacFadin,(1995) Pruebas Bioquímicas para la identificación de Bacterias. Ed. Médica Panamericana. México D.F.

McCaffrey, T.A., Agarwal, L.A. y Weksler, B.B. (1988) A rapid fluorometric DNA assay for the measurement of cell density and proliferation *in vitro*. *In Vitro*,1:247.

McGinnies, K., Chapman, R., Marks, R. y Penny, R. (1986) A fluorescence NK assay using flow cytometry. *J. Immunol.*,86:7.

Miller, P.D., Pothoulakis, C., Backer, T. R., LaMont, J.T. y Rothstein, T.L. (1990) Macrophage-dependent stimulation of T-cell-depleted spleen cells by *Clostridium difficile* toxin A and calcium ionophore. *Cell Immunol.*,126:153.

Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods* 65:55.

Muller, W. y Gautier, F.(1975) Interactions of heteroaromatic compounds with nucleic acids. *Eur J. Biochem.*,54:385.

Neate, E.V. y Boyle, W. (1986) A rapid colorimetric assay for measuring mixed lymphocyte reactions. *Transpl. Proc.*,18:340.

Neher, E. y Almers, W. (1986) Fast calcium transients in rat peritoneal mast cell are not sufficient to trigger exocytosis. *EMBO J.*,5:51.

- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, C.M., Grignani, F. y Ricardi, C. (1991) A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Meth.*,139:271.
- Niks, M. y Otto.M. (1990) Towards an optimized MTT assay. Letter to the editors. *J. Immunol. Methods*,130:149.
- Petty, R.D., Sutherland, I.A., Hunter, E.M. y Cree, I.A. (1995) Comparison de MTT and ATP-based assays for the measurement of viable cell number. *J. Biolumin-Chemilumin*,10(1):29-34.
- Ponce-Mancotela, M., Navarro, A.I., Martinez, G.MN y Alvarez-Chacón. (1994) Efecto antiangiásico *in vitro* de 14 extractos de plantas. *Rev. Invest. Clin.*,46(5):343.
- Poppof, M.R., Rubin, F.J., Gill, D.M. y Boquet, P. (1988) Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain. *Infect. Immun*,56:2299.
- Pothoulakis, C., Sullivan, R., Melnick, D.A., Triadafilopoulos, G., Gadenne, A.S., Meshulam, T. y LaMont, J.T. (1988) *Clostridium difficile* toxin A stimulates intracellular calcium release and chemotactic response in human granulocytes. *J. Clin. Invest.*,81:1741.
- Pothoulakis, C., Karmely, F., Kelly, P.C., Eliakim, R., Joshi, A.M., O'Keane, J., Castagliuolo, I., LaMont, T.J. y Rachmilewitz, D. (1993) Ketotifen inhibits *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis in rat ileum. *Gastroenterology*,105:701.
- Price, A.B. y Davies D.R. (1977) Pseudomembranous colitis. *J. Clin Pathol.*30:1-12.
- Quaroni, A. y Isselbacher J.K. (1981) Cytotoxic effects and metabolism of benzop(a)pyrene and 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in duodenal and ileal epithelial cell cultures. *JNCI*,67:1353.
- Richards, W.L., Song, M.K., Krutzsch, Evans, R.P., Marsden, E. y Thorgeirsson S.S. (1985) Measurement of cell proliferation in microculture using Hoechst 33342 for chromatin DNA. *Exp.Cell Research*,159:235.
- Rice, G.C. (1987) Correlation of mammalian cell killing by heat shock to intramembranous particle aggregation and lateral phase separation using fluorescence-activated cell sorting. *Radiation res.*112:351.
- Rittler, P.J. y Jennings, B.R. (1980) Polarized fluorescence studies of electrically oriented DNA-dye solutions. *Int. J. Biol. Macromol.*2:313.
- Riedy, M.C. . (1991) Use of photolabeling technique to identify nonviable cells infixed homologous or heterologous cell populations. *Cytometry*,133.

- Rothe, G., Oser, A. y Valet, G. (1988) Dihydrorhodamine 123: a new flow cytometric indicator for respiratory burst activity. *Naturwissenschaften*, 75:354.
- Rothman, S.W., Brown, J.E., Diecidue, A. y Foret, D.A. (1984) Differential cytotoxic effects of toxins A and B isolated from *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.* 46:324.
- Shahrabadi, M.S., Bryan, L.E. y Lee, P.W.K. (1984) Interaction of *Clostridium difficile* toxin A with L cells in culture. *Can. J. Microbiol.* 30:874.
- Sharpe, A.H., Chen, L.B., Murphy, J.R. y Fields, B.N. (1980) Specific disruption of vinculin filament organization in monkey kidney CV-1 cells by diphtheria toxin, exotoxin A and cyclohexamide. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 77:7267.
- Strobel, S., Busutil, A. y Ferguson, A. (1983) Human intestinal mucosal mast cell: expanded population in untreated coeliac disease. *Gut*, 24:222.
- Sullivan, N.M., Pellett, S. y Wilkins, T.D. (1982) Purification and characterization of toxins A and B of *Clostridium difficile*. *Infect. Immun.* 35:1036.
- Suzuki, Y., Yoshikawa, T. y Yokochi, J. (1991) A new sensitive and rapid automated fluorometric assay for detection of natural killer activity using carboxyfluorescein diacetate. *J. Immunassay* 12:145.
- Talbot, D. (1987) A rapid, objective method for the detection of lymphocytotoxic antibodies using flow cytometry. *J. Immunol.* 99:137.
- Tan, Z.L., Nagaraja, T.G., Chengappa, M.M. y Staats, J.J. (1994) Purification and quantification of *Fusobacterium necrophorum* leukotoxin by using monoclonal antibodies. *Vet. Microbiol.* 42(2-3):121.
- Tomás, Y. Ma. y Hollander, Daniel (1992) IEC-18, a nontransformed small intestinal cell line for studying epithelial permeability. *J. Lab. Clin. Med.*, 120(2):329.
- Torres, J.F. y Lonrath, I. (1988) Comparison of methods for the production and purification of toxin A from *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiol. Lett.* 52:41.
- Torres, J.F., Lyerly, M. D., Hill, E. J. y Monath, T. (1995) Evaluation of formalin-inactivated *Clostridium difficile* vaccines administered by parental and mucosal routes of immunization in hamsters. *Infect. Immun.* 63 (12):4619.
- Triadafilopoulos, G., Pothoulakis, C., O'Brien, M. y LaMont, J.T. (1987) Differential effects of *Clostridium difficile* toxins A and B on rabbit ileum. *Gastroenterology* 93:275.
- Vistica, B.P., McAllister, C.G., Sekura, R.D., Ihle, J.N. y Gery, I. (1986) Dual effects of pertussis toxin on lymphoid cells in culture. *Cell. Immunol.* 101:232.

- Wallace, J.L. (1990) Lipid mediator of inflammation in gastric ulcer. *Am. J. Physiol.*,258,G1-G11.
- Watkins, S.G., Dearin, J.L., Yong, L.C. y Wilhem, D.L. (1976) Association of mástoporesis with haemopoietic tissues in neonatal rat. *Experientia*,32:1339.
- Wierla, W.G., Mehr, D.S. y Kim Y.B. (1989) Comparison of Fluorochrome-labeled and 51-Cr labeled targets for natural killer cytotoxicity assay. *J. Immunol. Meth.*, 122:15
- Wilson, L. (1975) Action of drugs on microtubules. *Life Sci.*,17:303.
- Woodbury, R.G. y Nenrath, H. (1978). Purification an atipical mást cell protease and ist levels in developing rats. *Biochemistry*,7:4298.
- Yui, J., García, L.M., Wegmann, T.G. y Guilbert, L.J. (1994) Cytotoxicity of tumour necrosis factor- α and ganuma-interferon against primary human placental trophoblasts. *Placenta*,15(8):819.
- Zheng, Yanli y Chan, M.C. Bosco (1991) Establishment and Characterization of Hybrid Rat Mast Cells. *Exp. Cell. Research*, 194:3

8. APENDICE

Preparación de soluciones.

"Hepes 1M"

Hepes	23.83g
H ₂ O desionizada	100ml

Ajustar pH=7.4 con NaOH

Esterilizar en autoclave y guardar en refrigeración.

"L-Glutamina"

L-Glutamina	2.9g
H ₂ O desionizada	100ml

Esterilizar por filtración usando una membrana de 0.22 μ ; guardar en refrigeración.

"Soluciones concentradas de H33258 y H33342"

Pesar de ambas soluciones 1 mg (usar guantes y tapabocas). Las soluciones se disuelven en agua desionizada; esterilizar por filtración usando una membrana de 0.22µ. Ambas soluciones se guardan en refrigeración, protegiéndolas de la luz.

"solución concentrada de la sal de MTT"

Sal de MTT	150mg
PBS	200ml

Esterilizar por filtración usando una membrana de 0.22µ. Guardar la solución concentrada en refrigeración protegiéndola de la luz. (Usar guantes y tapabocas para pesar la sal de MTT)

"Solución concentrada de la solución de PMS"

PMS	5.0mg
PBS	10ml

Se siguen las mismas indicaciones que en el caso anterior.

Ambas soluciones no deberán almacenarse por más de un mes.

"Medio RPMI 1640 al 10"

RPMI 1640 1X	100ml
Suero fetal bovino inactivado (incubar 30 minutos a 56° C)	20ml
Bicarbonato de sodio al 4.5%	2ml
Hepes 2M	2ml
a.a. esenciales 50X	1ml
a.a. no esenciales 100X	2ml
Insulina 10,000 U.I.	0.2ml
Antibiótico antibacteriano-antimicótico	2ml
L-glutamina 20mM	2ml

Se mezclan todos los ingredientes (excepto la glutamina y el antibiótico) aforando con agua desionizada esteril a 200ml. Se esteriliza por filtración usando una membrana de 0.22µ. Se incuba el medio de 24 a 48 horas. a 37° C. Transcurrido este tiempo y una vez que no se observa turbidez y que el medio conserva su color original, se agregan la glutamina y el antibiótico, dejando el medio a T.A. de 24 a horas a 48 horas. Una vez transcurrido el tiempo se realizan las mismas observaciones hechas anteriormente. Si la prueba de esterilidad fue positiva (el medio no deberá presentar turbidez), el medio se guarda en refrigeración.

"PBS 20X"

NaCl	10g		
KCl	400mg		
KH ₂ PO ₄	400mg		
NaHPO ₄ ·H ₂ O	2.8g	o	Na ₂ HPO ₄ 2.2g
H ₂ O	100ml		

Esterilizar por autoclave y guardar en refrigeración.

"Puck 1mM"

KCl	160mg
NaCl	3.2g
NaHCO ₃	140mg
EDTA	28.8g
H ₂ O desionizada	400ml

Esterilizar por autoclave y guardar a 37° C.