

11281

Universidad Nacional Autónoma de México

2
Lej

Facultad de Medicina

División de Estudios de Postgrado

*Participación de las células cebadas en los
mecanismos de daño provocados por la toxina A
de Clostridium difficile.*

T E S I S

*Que para obtener el grado de Doctor en
Ciencias Biomédicas "Inmunología" presenta el
alumno.*

Gloria María Calderón Rodríguez.

Tutor. Dr. José A. Enciso Moreno.

México D. F.

2730041

1999



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

INDICE

	<i>Pag</i>
RESUMEN	<i>i</i>
SUMMARY	<i>ii</i>
I) INTRODUCCION	1
<i>I.1 Características generales</i>	<i>1</i>
<i>I.2 Fisiopatogenia</i>	<i>3</i>
<i>I.3 Respuesta inmune</i>	<i>5</i>
<i>I.4 Células cebadas</i>	<i>6</i>
<i>I.5 Mediadores liberados por las células cebadas</i>	<i>9</i>
<i>I.6 Células cebadas intestinales</i>	<i>11</i>
<i>I.7 Células cebadas y toxinas</i>	<i>13</i>
<i>I.8 Muerte celular por apoptosis</i>	<i>17</i>
II) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
III) JUSTIFICACION	23
IV) HIPOTESIS	23
V) OBJETIVO GENERAL	23
VI) OBJETIVOS PARTICULARES	24
VII) MATERIAL Y METODOS	25
<i>VII.1 Líneas celulares</i>	<i>25</i>
<i>VII.2 Células cebadas peritoneales (PMC)</i>	<i>25</i>

VII.3 Reactivos	26
VII.4 Ensayo para medir $TNF\alpha$	27
VII.5 Producción de óxido nítrico (NO)	27
VII.6 Ensayo de liberación de histamina	28
VII.7 Estudios de morfología celular	29
a) Ensayos de citotoxicidad	29
b) Preparación de "Cytospots"	29
c) Citoesqueleto	30
d) Microscopía electrónica	31
VII.8 Ensayos para evaluar la muerte celular por apoptosis	31
a) Análisis de fragmentación de DNA	31
b) Determinación del porcentaje de DNA fragmentado	32
c) Ensayo de TUNEL "Tdt-mediated dUTP Nick End Labelling"	33
VII.9 Análisis estadístico	34

VIII) RESULTADOS

35

VIII.1 Efectos citotóxicos de la toxina A en IEC18, PMCY HRMC	35
VIII.2 Efecto de la toxina A de <i>C. difficile</i> en la producción de $TNF\alpha$ y NO	36
VIII.3 Efecto de la toxina A en la liberación de histamina regulada por vías dependientes e independientes de IgE	36
VIII.4 Cambios morfológicos en PMC y HRMC inducidos por la toxina A de <i>C. difficile</i>	37
VIII.5 Microscopía Electrónica	37
VIII.6 Alteraciones del citoesqueleto asociados con la exposición a la toxina A en las células cebadas	38

RESUMEN

Las toxinas A y B producidas por *Clostridium difficile* son las principales mediadoras de la diarrea asociada a antibióticos y la colitis pseudomembranosa. En el modelo de asa ileal la toxina A induce acumulación de fluido, necrosis y una fuerte respuesta inflamatoria. Se ha sugerido que las células cebadas de la mucosa intestinal, participan en la colitis causada por *C. difficile* ya que son ricas en mediadores de la inflamación. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto *in vitro* de la toxina A en las células cebadas. Se evaluó en primer lugar la capacidad de la toxina A para estimular a las células cebadas. Se utilizaron células cebadas peritoneales provenientes de ratas sensibilizadas con el nématodo *Nippostrongylus brasiliensis* y células provenientes de ratas sin sensibilizar. Las células cebadas sin sensibilizar se estimularon con el ionóforo de calcio A23187 como un modelo de activación independiente de antígeno y las células cebadas sensibilizadas se estimularon con antígenos de *N. brasiliensis* en un modelo de activación dependiente de antígeno. Después de que estas células fueron incubadas con toxina A no se observó incremento en la liberación de histamina ni de óxido nítrico, en contraste se observó que 1 µg/ml de toxina inhibió la liberación de histamina en los dos modelos de activación. Por otro lado 10 ng/ml de toxina A indujeron la liberación de TNF α . Concentraciones de 1 µg/ml de toxina fueron capaces de producir daño celular al alterar a la actina y tubulina de citoesqueleto. La observación por microscopía electrónica mostró cambios morfológicos como retracción citoplásmica, condensación de la cromatina y formación de cuerpos apoptóticos. Se confirmó y cuantificó el proceso de apoptosis mediante electroforesis del DNA y se estableció el porcentaje de células en apoptosis mediante ensayos con citometría de flujo. Podemos concluir que *in vitro* la toxina A de *C. difficile*, altera a las células cebadas y las hace: 1) incapaces de liberar histamina, 2) productoras y liberadoras de TNF α , además de alterar predominantemente el citoesqueleto e inducir muerte celular por apoptosis.


Vo. Bo.

Dr. José Antonio Enciso M. Asesor.

SUMMARY

Toxins A and B from *Clostridium difficile* are the main cause of antibiotic-associated diarrhea and pseudomembranous colitis. They cause fluid accumulation, necrosis and a strong inflammatory response when inoculated in intestinal loops. Since mast cells are a rich source of inflammatory mediators, abundant in the gut, and known to be involved in *C. difficile*-induced enteritis, we studied the in vitro effect of toxin A on isolated mast cells. Normal rats or rats sensitized by infection with *Nippostrongylus brasiliensis*, were used to isolate peritoneal mast cells (PMC). PMC from naive rats were stimulated with calcium ionophore A23187 as a model of antigen independent activation and nitric oxide oxideC from sensitized rats were stimulated with *N. brasiliensis* antigens to study IgE-dependent mast cell activation. After 4 h, toxin A did not induce release of nitric oxide or histamine in naive PMC cells. However, 10 ng/ml of toxin caused a significant release of tumor necrosis factor alpha (TNF α). In contrast, 1 μ g/ml of toxin inhibited antigen or A23187-induced histamine release by PMC. Toxin A at 1 μ g/ml for 4 h caused disruption of actin, which aggregated in the cytoplasm and around the nucleus. After 24 h, chromatin condensation, cytoplasm blebbing, and apoptotic-like vesicles were observed; and DNA fragmentation was documented also. The apoptotic process was confirmed by flow cytometry. These results suggest that mast cells may participate in the initial inflammatory response to *C. difficile* infection by releasing TNF α upon interaction with toxin A. However, longer exposure to toxin A affects the release of inflammatory mediators, perhaps because of the alteration of the cytoskeleton and induction of apoptosis. The impaired functions and survival of mast cells by *C. difficile* toxin A could hamper the capacity of these cells to counteract the infection, thus prolonging the pathogenic effects of *C. difficile* toxins.

We conclude that the effects of toxin A on mast cells are: 1) decrease on histamine release, 2) an increase on TNF alpha release and production and cytoskeleton damage which leads to cell death by apoptosis.

Vo. Bo.



Dr. José Antonio Enciso M. Asesor

I) INTRODUCCION

I.1 Características generales.

Una de las características más importantes de ciertos microorganismos es su capacidad de producir moléculas que les ayudan a su supervivencia el medio ambiente, entre estas moléculas tenemos a las toxinas.

Clostridium difficile es un bacilo anaerobio gram positivo formador de esporas. Se cultiva en medios selectivos. Este bacilo puede ser subtipificado por electroforesis o por aglutinación con el antisuero específico. Este microorganismo se caracteriza por la producción de dos toxinas, la toxina A o enterotoxina y la toxina B o citotoxina, existiendo también cepas no productoras de toxinas (1-3). En adultos y niños mayores de un año la flora normal intestinal previene la colonización por esta bacteria. Normalmente, ***C. difficile*** es inocuo, pero en ocasiones puede colonizar el tracto digestivo humano. Esto ocurre por ejemplo cuando la flora intestinal es alterada por antibioticoterapia. Esta alteración en la homeostasis intestinal puede ser producida por la administración de antibióticos como la ampicilina, clindamicina, cefalosporinas y aminoglucósidos lo cual permite la proliferación de ***C. difficile***, posiblemente por la eliminación de especies de ***Bacteroides*** (1). Existen varios serogrupos de ***C. difficile***, el A es el más frecuentemente aislado en niños y adultos con diarrea, mientras los serogrupos B y D no son toxigénicos (2). También se ha reportado que hasta el 50% de recién nacidos presentan durante el primer año de vida colonización por ***C. difficile*** toxigénica sin desarrollar enfermedad, encontrándose anticuerpos específicos contra la bacteria hasta en el 60% de niños y adultos (4). Las investigaciones realizadas por Tedesco, Green y Hafiz en 1974 (5-7) y posteriormente las realizadas por Larson y Barlett (8,9), permitieron establecer el papel de ***C. difficile*** como uno de los agentes etiológicos de la colitis pseudomembranosa y la diarrea asociada al uso de antimicrobianos.

El daño inducido por *C. difficile* a nivel intestinal se debe principalmente a la acción de la toxina A o enterotoxina, ya que la toxina B carece de esta actividad (10-12). La toxina A de *C. difficile* (tox A), es una molécula termoestable y de alto peso molecular en su forma nativa (520 a 540 kD), el gen para la toxina ya ha sido clonado y codifica para una proteína de 2710 aminoácidos (13). Esta proteína tiene como características importantes una serie de 38 unidades repetitivas hacia su carboxilo terminal, un sitio de unión a nucleótidos y una región central hidrofóbica con cuatro cisteínas conservadas. Las unidades repetitivas son inmunodominantes y son las responsables de la unión a diferentes tipos de antígenos (carbohidratos) en el epitelio intestinal (13,14). Se ha observado que sus actividades biológicas están contenidas en una región de la molécula de aproximadamente 308 kD, que es además sensible a la digestión por quimiotripsina, papaína y proteinasa K. La acción de la toxina puede ser neutralizada por el antisuero policlonal anti-toxina A o por el anticuerpo monoclonal PCG-4 (15), que neutraliza la actividad enterotóxica pero no la citotóxica. Esta acción, se lleva a cabo mediante la unión del anticuerpo a la región de unidades repetitivas bloqueando por ende, los sitios de unión de la toxina A a su receptor.

I.2 Fisiopatogenia.

Los efectos de *C. difficile* se inician cuando se secretan sus toxinas. La toxina A se une a sus receptores en las células del epitelio intestinal. Los primeros estudios para la descripción de un receptor para la toxina A los realizaron Krivan y cols en 1986 (16), al utilizar membranas de células intestinales de hámster con borde de cepillo. Estos estudios demostraron que la toxina A se une a las células a través de receptores que presentan el trisacárido Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc β . Debido a que las células humanas normalmente no expresan este trisacárido en sus membranas, Tucker y Wilkins (17), reportaron la unión de la toxina A a tres oligosacáridos que forman parte de los grupos sanguíneos Le^x, Le^y, y de I (X,Y,I) y que se encuentran en las células del epitelio intestinal humano. Sin embargo, estudios posteriores (18) utilizando diversos glicos esfingolípidos demostraron que el receptor para la toxina A en humanos es posiblemente el GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer, el cual fue identificado en eritrocitos humanos y posteriormente en tumores gástricos y otros tejidos aunque no se ha aclarado si este es el receptor para la toxina A en las células blanco de intestino grueso. En este estudio se observó también, que la toxina era capaz de unirse a otros dos esfingolípidos artificiales derivados de fuentes naturales, el GalNAc α 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer y el GalNAc β 3Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4Glc β 1Cer. Estudios realizados por Pothoulakis y cols. (19), con células RBL y membranas con borde de cepillo demostraron además que el receptor para la toxina A está acoplado a una proteína G de membrana. Recientemente se reportó que una proteasa de serina de *Saccharomyces boulardii* presenta una acción enzimática capaz de inhibir la unión de la toxina A a su receptor y de digerir a la misma toxina (20).

El principal blanco de acción de la toxina A de *C. difficile* está localizado en el citoplasma y se ha observado que se necesita de un fenómeno de internalización y procesamiento para que la toxina pueda ejercer su acción. Una vez acoplada al receptor, la toxina es endocitada y se localiza en vacuolas citoplásmicas

(endosomas); posteriormente es probable que se lleve a cabo una fusión vesicular con el complejo de Golgi o con lisosomas para su procesamiento. Para la realización de estos eventos se requiere aparentemente de la activación de diversos procesos enzimáticos intracelulares dependientes de pH (21).

Entre los principales efectos inducidos por la toxina A se encuentran cambios morfológicos en diversos tipos celulares, que se presentan con diferente capacidad de respuesta y sensibilidad a la toxina (22). Estas alteraciones se caracterizan por su efecto sobre el citoesqueleto celular, produciendo redondeamiento y retracción celular (efecto citopatogénico), arborización (efecto actinomórfico) así como polarización del núcleo celular. Estos efectos se consideran dependientes de la dosis y del tiempo de exposición a la toxina y generalmente no se observan a tiempos menores de 30 min, el cual es probablemente el tiempo mínimo que la toxina necesita para su unión e internalización dentro de la célula (21,22). La acción de la toxina A sobre monocapas celulares induce la disrupción de éstas así como un aumento en la permeabilidad celular, seguidos de una importante inhibición de la proliferación celular (22,23). Las toxinas A y B producidas por *C. difficile* actúan sobre el citoesqueleto celular, específicamente produciendo una despolimerización de la actina F y un incremento de la actina G (24,25,26). Así mismo ambas toxinas modifican a las proteínas Rho mediante una UDP- glucosilación del residuo de treonina 37 en el dominio efector de RhoGTP que desorganiza los microfilamentos de actina (25,26,27). La importancia de la acción de la toxina sobre proteínas Rho radica en que estas son proteínas de unión a GTP, las cuales se encuentran clasificadas en dos grandes grupos: Las proteínas heterotriméricas de unión a GTP (Proteínas G) y las proteínas monoméricas de unión a GTP de bajo peso molecular, entre las que se encuentran las proteínas de la familia Rho (CDc42, Rac1, Rac2, RhoA, RhoB and RhoC) que tienen un papel importante en la regulación y polimerización del citoesqueleto de actina (28,29). Varios estudios con la toxina A de *C. difficile* (30,31,32), han demostrado que entre las alteraciones causadas a las proteínas Rho por esta toxina se encuentran

fenómenos de glucosilación que finalmente conducen a alteraciones en el citoesqueleto celular.

I.3 Respuesta Inmune.

Los efectos de la toxina A sobre las células del sistema inmune han sido estudiados pero los mecanismos efectores son poco conocidos (1,22,33). Uno de los primeros estudios para valorar el efecto de *C. difficile* y sus toxinas en el sistema inmune fue realizada por Dailey y cols en 1987 (34), en el cual demostraron que la toxina A no tiene un efecto inhibitorio en la fagocitosis y en la viabilidad de las células polimorfonucleares, además de que la fagocitosis de *C. difficile* por éstas células depende de la opsonización de la bacteria por anticuerpos o por complemento, siendo las cepas toxigénicas las más susceptibles a la opsonización. Una característica en la colitis secundaria a infección por *C. difficile*, es la presencia de infiltrados de leucocitos polimorfonucleares en mucosa intestinal (22). Lima y cols. (35), demostraron que la inoculación de 0.1µg de *C. difficile* en asas intestinales de conejo inducen la formación de infiltrado linfocitario y neutrofílico en la lámina propia y en epitelio intestinal con daño en la mucosa.

Otra característica en la respuesta producida por la toxina A, es su capacidad para inducir inflamación aguda con activación de células inflamatorias como macrófagos y células cebadas así como la movilización de neutrófilos (1). La respuesta quimiotáctica de los neutrófilos tratados con toxina A de *C. difficile* ha sido bien documentada (1,36). Así, se ha observado que el proceso inflamatorio intestinal está marcado por el flujo de neutrófilos al segmento intestinal afectado, induciendo daño a la mucosa y con un acúmulo neutrófilos, monocitos y eritrocitos.

Los macrófagos también han sido señalados como células que participan en la orquestación de la respuesta inmune inducida por *C. difficile*. Däubener y cols. (37) demostraron que la proliferación de linfocitos T humanos en presencia de la toxina A es monocito-dependiente. La toxina en estas condiciones presenta un efecto inhibitorio en la proliferación de los linfocitos T aunque no se afecta cuando es mediada por citocinas (IL-2). Miller y cols en 1990 (38) establecieron que la toxina A, es capaz de ejercer un efecto proliferativo sobre los linfocitos de bazo en presencia de macrófagos activados o tratados con sobrenadantes con altos niveles de IL1. Estos resultados indican que la toxina A activa a los macrófagos con la consecuente liberación de IL1 o de otros factores, los cuales pueden estimular la proliferación de los linfocitos B. La producción de citocinas y otros mediadores por monocitos humanos y macrófagos tratados con las toxinas de *C. difficile* ha sido reportada (39, 33), observándose que tanto la toxina A como la B inducen en estas células, e indirectamente en los neutrófilos, la producción de IL1, factor de necrosis tumoral α (TNF α), IL-6 y leucotrienos, siendo más efectivas en la producción de IL1 β . Se observó además que la migración de neutrófilos y el subsecuente proceso inflamatorio inducidos por la toxina A, depende en parte de las citocinas producidas por los macrófagos (33). Se ha sugerido por lo tanto, debido a este incremento en la liberación de factores que median el proceso inflamatorio, que otras células del sistema inmune como las células cebadas y no solo los macrófagos se pueden activar en presencia de la toxina A y liberar mediadores que participan en el proceso inflamatorio inducido por las toxinas de *C. difficile*.

I.4 Células Cebadas.

Las células cebadas son células efectoras de la respuesta inmune que han sido predominantemente asociadas a fenómenos de hipersensibilidad inmediata y alergia. Sin embargo, debido a su amplia distribución en el organismo se considera que estas células participan activamente en la respuesta inflamatoria (40). La activación de las células cebadas se lleva a cabo mediante 2 tipos de

mecanismos: a) por activación antigénica dependiente de IgE, en donde los receptores de alta afinidad para IgE (FcεRI) en las células cebadas tienen un papel muy importante y b) y por mecanismos independientes de IgE los cuales activan vías peptidérgicas y se presentan más en células cebadas de "serosas", como peritoneo y piel (41).

Las células cebadas se originan de células hematopoyéticas pluripotenciales de médula ósea, donde se inicia su diferenciación para concluirla posteriormente en la circulación (42). En el caso de las células cebadas humanas, al parecer se originan a partir de células progenitoras CD34+. Es importante notar que la maduración de las células cebadas en tejidos periféricos está básicamente influenciada por factores microambientales (43,44,45). Las células progenitoras de células cebadas se localizan en médula ósea y tejidos periféricos, como sangre, mucosa intestinal, nódulos linfáticos y cavidad peritoneal y de ahí migran a los tejidos blanco. Los marcadores celulares para los progenitores jóvenes se han descrito como Thy-1^{lo} y c-kit^{hi} los cuales contienen proteasas de células cebadas pero carecen del FcεRI (46). En el humano, las células cebadas progenitoras que encontramos en circulación se han definido como c-kit⁺, cd34⁺, ly⁻, cd14⁻ y cd17⁻ (47). Los estadios de maduración finales de las células cebadas se concretan cuando ya son células residentes en tejido.

Muchos aspectos en el desarrollo y maduración de las células cebadas (incluyendo crecimiento, proliferación y maduración/diferenciación) están regulados por citocinas. Una molécula que participa en el desarrollo de las células cebadas es el c-kit (CD117), conocido como receptor del factor de crecimiento de células estaminales o stem cell factor (SCF), el cual se expresa en todas las células cebadas y sus progenitores (48). Este factor de crecimiento (SCF), promueve la proliferación de los progenitores de las células cebadas inmaduras o maduras, estimula la maduración de las células precursoras y altera el fenotipo de células cebadas así como el contenido de mediadores (48). Además de que este factor requiere de co-factores como la IL-3, IL-4 y la IL-10, para inducir el crecimiento y maduración de las células cebadas (49).

El desarrollo de las células cebadas está regulado por citocinas como las interleucinas 3, 4, 6, 9,10 y 11, interferon gamma (IFN- γ) y por factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), el factor estimulante de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y el factor de crecimiento nervioso (NGF); también participan la prostaglandina E2 y los agregados de IgE (50,51). La IL-3 es el más potente agonista derivado de linfocitos T capaz de estimular el desarrollo de las células cebadas, aunque también la IL-6 y la IL-11 en combinación con el factor precursor de células estaminales estimulan la generación de las células cebadas humanas a partir de células mononucleares del cordón (52). Sin embargo, otras citocinas como el GM-CSF, el TGF- β y el IFN γ disminuyen el desarrollo de las células cebadas (50,52). Por otra parte, es importante notar que los efectos de las citocinas en el desarrollo de las células cebadas depende el estado de diferenciación y de la subpoblación de las células cebadas.

Las células cebadas de humanos y roedores que se derivan de diferentes tejidos, pueden variar en fenotipo y función. Así diferentes subpoblaciones presentan distintas características histoquímicas, contenido de mediadores y respuesta a factores de crecimiento, sensibilidad a drogas y secretagogos (53,54). En roedores, las células cebadas se han dividido en: células cebadas de mucosa (IMMC) y en células cebadas de tejido conectivo (CTMC). En humanos encontramos células histoquímicamente análogas a las células cebadas de tejido conectivo de rata y que expresan tanto quimasa como triptasa (MC_{TC}), y células análogas a las células cebadas de mucosa de roedores y que expresan solo quimasa (MC_C) o solo triptasa (MC_T) (55,56). Esta expresión selectiva de las diferentes proteinasas de las células cebadas es comunmente utilizada para distinguir los fenotipos de células cebadas en ratas, ratones y humanos. Por ejemplo, en ratas las IMMC solo producen RMCPII en contraste con las CTMC que expresan dos quimasas: la RMCPI y la proteinasa-5, así como las metaloproteinasa, carboxipeptidasa A y triptasa. En el ratón, las proteinasas identificadas incluyen a 6 quimasas, a la metaloproteinasa y a la carboxipeptidasa

así como dos triptasas (57,58). Las IMMC producen a su vez prostaglandina D₂, leucotrieno B₄ y C₄ mientras que las CTMC producen prostaglandina D₂. Se ha observado también que las IMMC contienen menor concentración de histamina (1-3 pg/cel) que las CTMC (10-30 pg/cel) (57,59,60) además de que cada subpoblación puede tener una respuesta particular a citocinas, secretagogos y drogas antialérgicas (61).

I.5 Mediadores liberados por las células cebadas

Las células cebadas se pueden activar por el entrecruzamiento de sus receptores de superficie, que incluyen a FcεRI, c-kit y NGF entre otros; también se pueden activar por secretagogos como el ionóforo de calcio y el compuesto 48/80 (56). Los mediadores de células cebadas juegan un papel importante en las reacciones alérgicas e inflamatorias no solo por su acción directa sobre músculo liso, epitelios y endotelio, sino debido a que pueden activar y reclutar a otras células efectoras del sistema inmune, así como amplificar y regular las respuestas inflamatorias. Los mediadores de las células cebadas pueden dividirse en tres categorías: mediadores preformados, mediadores sintetizados de novo y citocinas (56).

Mediadores preformados. Estos mediadores son sintetizados constitutivamente, se almacenan en gránulos citoplásmicos y se liberan después de la estimulación. Entre estos tenemos a la histamina, que es un mediador sintetizado por descarboxilación de la histidina en el aparato de Golgi y que posteriormente se almacena en gránulos citoplásmicos. Una vez liberada, la histamina es rápidamente catabolizada por metilación y oxidación. La amplia distribución de los receptores para histamina (H₁, H₂ y H₃) en casi todos los tipos celulares, le confieren una amplia gama de efectos biológicos. Así se ha propuesto a la histamina como un mensajero intracelular que media funciones celulares por interacción con otros factores (62). Otros mediadores de las células cebadas, son diversas proteasas neutras que representan entre el 20 al 50% de las proteínas celulares. Los proteoglicanos como la heparina y el condroitín sulfato E los encontramos en células cebadas humanas MC_{TC} y MC_T. Los proteoglicanos se

unen a la histamina, a las proteinasas neutras así como a las hidrolasas ácidas dentro de los gránulos de las células cebadas y parecen facilitar el almacenamiento y regulación de los mediadores preformados. Así mismo, las hidrolasas ácidas como la β -hexosaminidasa, β -glucoronidasa, β -D-galactosidasa y la arilsulfatasa A, también son mediadores preformados que se liberan después de una estimulación (63).

Mediadores sintetizados de novo. Son mediadores derivados de lípidos que se dividen en dos clases: Los metabolitos del ácido araquidónico (AA) o eicosanoides y los 2-acetil fosfolípidos, los cuales están estructuralmente relacionados con el factor activador de plaquetas, PAF (60). Una vez accionado el receptor membranal $Fc\epsilon 1R$ de las células cebadas, se induce una fosforilación transitoria de la fosfolipasa citosólica $cPLA_2$, que ocurre paralelamente a la liberación de AA, el cual se incrementa después de una segunda estimulación. El AA liberado es posteriormente metabolizado por ciclo-oxigenasas y lipoxigenasas para liberar prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX), leucotrienos (LT) y el 5-,12-HETEs (ácidos hidroxi-eicosatetraenoicos) (60,63). Las células cebadas también producen toda una serie de radicales libres incluyendo el óxido nítrico (NO), el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo los cuales tienen diversos efectos sobre la función de las células cebadas (57,64).

Citocinas. Recientemente se ha descrito una amplia gama de citocinas producidas por las células cebadas tanto en humanos como en roedores. En humanos se han identificado tanto las proteínas y/o la expresión de RNA_m de SCF, el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$), IL-1 β , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, y las quimiocinas MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, I-309 y la MCP-1. En roedores encontramos $TNF\alpha$, GM-SCF, $TGF\beta_1$, NGF, $IFN\gamma$, LIF, IL-1 α , -1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2, RANTES, JE, TCA3 y linfotactina (56).

De las citocinas anteriormente citadas el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$) es una de las mejor conocidas en las células cebadas. Estas células son capaces de sintetizar constitutivamente y liberar concentraciones substanciales de $TNF\alpha$ sin

previa estimulación, a diferencia de lo que ocurre en otras células como macrófagos, linfocitos, etc (65). La producción de $TNF\alpha$ puede incrementarse por activación de los receptores $Fc\epsilon RI$ o $Fc\gamma RI II I$, por la sustancia P, el ionóforo de calcio y el forbol miristato acetato (PMA); por el contrario disminuye por $IFN\alpha/\beta$, $IFN\gamma$, $TGF\beta_1$, IL-10, algunas prostaglandinas (PGE_1 , PGE_2 y misoprostol), por agonistas β_2 adrenérgicos (salbutamol, salmeterol y el isoproterenol), así como otras drogas antialérgicas (61). Se ha reportado que la liberación del $TNF\alpha$ (66) es independiente de la liberación de otros mediadores como la histamina y la hexosaminidasa. Es importante mencionar que, aunque el $TNF\alpha$ es secretado por otros tipos celulares, el derivado de células cebadas tiene un papel importante en diversos procesos inflamatorios (67,68,69). La regulación de las funciones realizadas por las células cebadas está mediada de gran manera por citocinas como IL-3/IL-4, por el SCF y otros mediadores como la histamina, que influyen sobre las acciones bidireccionales entre las células cebadas y el microambiente. Se ha reportado (56,70) que por ejemplo el $TGF\beta_1$, IL-3, NGF, IL-10 e histamina producidas por las células cebadas regulan de forma autócrina las funciones de estas células.

Finalmente, la secreción de quimiocinas, también ha sido descrita en las células cebadas (56). Por ejemplo la línea celular HMC-1 de células cebadas humanas expresa RNA_m para las α y β quimiocinas como MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, I-3009 y MCP-1 (55). Líneas celulares de células cebadas murinas también expresan RNA_m para quimiocinas como MIP-1 α , MIP-1 β , TCA3, JE y linfotactina (56,71).

I.6 Células Cebadas Intestinales.

Las células cebadas están ampliamente distribuidas en el tracto gastrointestinal. En la lámina propia intestinal se ha calculado la existencia de aproximadamente 2×10^5 cel/mm³ (72) este número puede incrementarse en las enfermedades parasitarias y en procesos inflamatorios. Una vez que son activadas las células cebadas pueden liberar grandes cantidades de histamina, leucotrienos, factor activador de plaquetas (PAF), $TNF\alpha$, proteasas y otras citocinas capaces de

modular la ontogenia, diferenciación y función de células epiteliales, endoteliales, músculo liso, tejido conectivo, mieloide y neuronal (73). Es importante reconocer que en el tracto gastrointestinal podemos encontrar células cebadas de tejido conectivo y células cebadas de mucosa, que son la subpoblación más abundante, tanto en intestino grueso así como en lámina propia y muscular de intestino delgado (74,75).

Es muy importante distinguir la asociación en intestino, de las células cebadas de mucosa con los vasos sanguíneos y el sistema nervioso entérico ya que esto tiene implicaciones tanto morfológicas como funcionales. Así por ejemplo, se han demostrado asociaciones importantes entre células cebadas y células del sistema nervioso entérico en ileon, colon y recto normales así como en procesos patológicos como la colitis ulcerativa (76). Evidencias recientes (77), indican que la interacción entre células cebadas de mucosa y nervios entéricos es bidireccional, lo cual es importante en la regulación de funciones de transporte epitelial. Debido a que las células cebadas pueden secretar un gran número de factores neurotróficos, incluyendo el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor inhibitorio de leucemia (LIF o factor colinérgico de diferenciación neuronal) IL-3, IL-6, GM-CSF y óxido nítrico (NO), su papel como moduladores del crecimiento y actividad neuronal ha sido evidenciada, además de que estas moléculas pueden actuar como neurotransmisores. Siendo el NGF el mejor conocido y comunmente asociado con el sistema nervioso, ya que actúa sobre las células cebadas promoviendo tanto el crecimiento neuronal como el de las células cebadas (57). Se puede señalar además que proteinasas derivadas de las células cebadas pueden degradar numerosos neuropéptidos tales como el péptido vasoactivo intestinal (VIP) y la sustancia P (72). Por otro lado, es bien reconocido que el sistema nervioso tiene efectos significativos en el desarrollo de las células cebadas y su función (73). Se ha descrito también que algunos neuropéptidos como la sustancia P, pueden estimular la secreción de histamina. La exposición de células de la línea RBL (células de leucemia basofílica) a bradicinina, somatostatina y sustancia P induce activación por lo que se considera que tienen

efectos similares a los observados durante el contacto entre neuronas y células cebadas (77). Es importante notar que la acción *in vitro* de los neuropéptidos sobre la secreción de histamina es más marcada en las células cebadas de tejido conectivo que en las de mucosa. Es posible que varios neuropéptidos afecten a las células cebadas de mucosa y regulen la secreción de diversos mediadores. Por ejemplo, la sustancia P estimula la producción de RNA_m para TNF α , pero no afecta la expresión de otras citocinas (78). Desde otro punto de vista, la participación de las células cebadas en alteraciones intestinales ha sido reportada (79), observándose que las células cebadas juegan un papel protector en la integridad del tracto gastrointestinal, ya que ratones *W/W^v* deficientes en células cebadas, tienen una alta incidencia de úlceras gástricas comparados con ratones no deficientes (80). Se puede concluir por lo tanto, que las células cebadas no solo participan en las disfunciones del tracto gastrointestinal, sino que tienen un papel muy importante en mantener su integridad fisiológica.

1.7 Células Cebadas y Toxinas.

Aunque la participación de las células cebadas en la patogénesis de las infecciones bacterianas no ha sido muy estudiada, la producción de mediadores de la inflamación sugiere que estas células pueden tener un papel preponderante en la respuesta inflamatoria frente a agentes infecciosos.

Esta importante función de las células cebadas frente a diferentes bacterias y sus productos ha sido documentada (68,69,81,82). Así por ejemplo, se ha reportado que las células cebadas pueden unirse específicamente a las FimH de *E. coli* y otras enterobacterias (83), fagocitarlas y destruirlas en sus vacuolas acidificadas a través de la liberación de aniones superóxido. En experimentos con ratones WBB6F1-*W/W^v* (*W/W^v*) infectados con *Klebsiella pneumoniae*, Malaviya y cols (83), observaron que la liberación de TNF α por las células cebadas modula el flujo de neutrófilos para la supresión de la bacteria, eliminando la infección en base a una respuesta inmune innata, independiente de anticuerpos específicos.

En relación con las toxinas bacterianas se ha observado que células cebadas provenientes de médula ósea (BMMC) y dependientes de IL-3, aumentan su contenido de histamina en respuesta a la toxina del cólera (84). Las alteraciones en la degranulación y liberación de mediadores por las células cebadas, se han relacionado con el daño producido en mucosas, sobre todo en patologías agudas y crónicas. Estos eventos de disregulación pueden ser provocados por toxinas bacterianas. Así por ejemplo, Leal-Berumen y cols. (85,86) han demostrado que las células cebadas murinas en presencia de LPS y enterotoxina de *V. cholera*, inducen la producción de IL-6, sin alterar la liberación de histamina; sin embargo, en las células tratadas con la enterotoxina de *V. cholera*, ocurre una inhibición de la producción del TNF α . Por otro lado, en BMMC se observó que no existe relación, entre el tratamiento de estas células con la toxina de cólera y la liberación de histamina (87). Estudios realizados con la enterotoxina B del estafilococo para observar su efecto en células cebadas murinas y RBL-2H3, demostraron que se inducía liberación de serotonina después de su estimulación, sugiriendo por lo tanto que las células cebadas pueden tener un papel importante en la toxicosis producida por esta enterotoxina (88). Así mismo, la toxina de *Bordetella pertussis* no solo induce la producción de IL-4 en células de bazo y nódulos linfáticos de ratones sensibilizados, sino que también provoca la liberación de histamina por células cebadas de rata, actuando mediante una vía dependiente de IgE (41,89,90,91). La participación de las células cebadas en la patogénesis inducida por la toxina A de *C. difficile* ha sido estudiada recientemente. En 1988 Lauritsen y cols. (92) demostraron que en procesos inflamatorios intestinales como la colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn y colitis inducida por *C. difficile*, la liberación de metabolitos del ácido araquidónico como PGE₂, tromboxano B₂ y leucotrieno B₄ se incrementaba significativamente en pacientes con daño tisular importante y ulceraciones, no así en casos más benignos. También se ha propuesto a la histamina como un mediador activo que participa en el daño causado por la toxina A de *C. difficile*. Kurose y cols (93) en un modelo de enterocolitis por toxina A en rata, demostró que el aumento en la

adherencia y migración leucocitaria se acompañaba de la degranulación de las células cebadas. Al parecer, la liberación de histamina por éstas células media la agregación de leucocitos y plaquetas y aumenta la adhesión leucocitaria a las células endoteliales, vía los receptores H1, incrementándose además la expresión de P-selectina en estas células. Eliakim y cols (94) demostraron que en colitis inducidas experimentalmente con agentes químicos, el ketotifén (fármaco que actúa como estabilizador de las células cebadas) reduce significativamente el daño a la mucosa y la generación de factores inflamatorios como LTB4, LTC4 y TXB2, después de 48 horas de tratamiento. Debido a que la respuesta inflamatoria intestinal provocada por la toxina A de *C. difficile* involucra moléculas como PAF, prostaglandina E2, tromboxano B2, leucotrieno B4 y C4 y la proteasa RMCPII de células cebadas, Otros estudios (95) han demostrado también, que el ketotifén inhibe la enteritis inducida por la toxina A, posiblemente al inhibir la activación de las células cebadas y alterar la quimiotaxis de los neutrófilos, dando por resultado, una disminución en la secreción e inflamación.

El mecanismo mediante el cual se produce un proceso inflamatorio posterior a la exposición de la toxina A a su receptor, no ha sido completamente definido. Una posible explicación es que el tamaño de la toxina A (308 KD), no le permite su paso a través de la mucosa intestinal y por lo tanto no puede estimular directamente a las células de la lámina propia. De esta manera, sería más favorecida la activación de ciertas neuronas y circuitos neuronales del intestino por la toxina, lo cual influiría en la liberación de otros factores que podrían amplificar los efectos de la toxina hacia otras células como macrófagos, células cebadas, neutrófilos y células endoteliales (96). En la inervación del tracto digestivo tenemos evidencias de que existen neuronas sensitivas aferentes sensibles a la capsaicina, y que estas neuronas participan en la inhibición del reflejo somatovisceral de la motilidad gastrointestinal (97,98). Diversos estudios han demostrado que las fibras aferentes sensibles a la capsaicina contienen y liberan una gran variedad de péptidos como la sustancia P, neurokinina A, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina y el polipéptido intestinal

vasoactivo (VIP) (96). Existen además evidencias anatómicas de una cercana asociación entre fibras aferentes y las células cebadas en el tracto gastrointestinal (99,75). Otros estudios (100,101,102) han demostrado que utilizando diversos inhibidores neuronales como lidocaína, hexametonio y capsaicina, las toxinas de **C. difficile** y de **V. cholerae** pueden activar diversos mecanismos neuronales, que participan en los efectos producidos por estas dos enterotoxinas. Observándose además, que las neuronas sensitivas aferentes sensibles a la capsaicina, están involucradas en los mecanismos de daño inducido por la toxina A de **C. difficile**. Numerosas neuronas incluyendo neuronas primarias sensoriales se encuentran localizadas en el plexo intestinal submucoso y se proyectan a diversas células de las criptas y de las vellosidades formando complejas redes por debajo de la mucosa epitelial. Este tipo de neuronas liberan y reaccionan a la sustancia P (103), que es un neuroéptido de 11 aminoácidos que produce numerosos efectos proinflamatorios y que se ha implicado en algunas patologías como asma, artritis y enfermedad inflamatoria intestinal. Pothoulakis y cols. (102), demostraron que un antagonista de la sustancia P, denominada CP-96,345, inhibe en la rata la respuesta a la toxina A de **C. difficile**. Por otra parte, Mantyh y cols. (103) observaron un incremento en la expresión de receptores para la sustancia P en vasos sanguíneos y tejido linfoide en pacientes con enteritis fulminante por **C. difficile**. De esta forma, podemos considerar que la relación neuro-inmune en la fisiopatogenia de la enteritis y la colitis pseudomembranosa por **C. difficile** es determinante para la producción de la enfermedad, ya que puede presentarse un proceso de activación indirecta de las células cebadas por esta vía.

Otro punto de interés es la participación de las proteínas de unión a GTP, Ras, Rac y Rho en los procesos de exocitosis post-activación de las células cebadas. Las GTPasas Rac y Rho son reguladoras de diversos procesos celulares como: la organización del citoesqueleto, la proliferación y transformación celular así como la muerte celular por apoptosis (104,105,106). Como se mencionó anteriormente, las proteínas Rho son blanco de acción de la toxina A de **C. difficile**, además de

que existe la participación de estas proteínas en el desensamblaje de la F-actina posterior a la activación de células cebadas peritoneales por diversos agentes (107). Las proteínas Rho son las responsables de la polimerización de novo de la actina, mientras que las proteínas Rac son requeridas posteriormente, para orientar en forma centrípeta los filamentos de actina. Estudios con células mutantes de estas dos proteínas (V14 RhoA y V12Rac1), demostraron que la inhibición endógena de Rac y Rho reduce la respuesta secretoria de las células cebadas, teniendo por lo tanto un papel importante en la regulación de la exocitosis de estas células (108,109). Por otro lado se ha demostrado también que la toxina B de *C. difficile*, inhibe la activación de células cebadas peritoneales, sugiriendo que las proteínas Rho y otras proteínas relacionadas se encuentran involucradas en esta alteración (110).

Podemos sugerir por lo anterior, que existe una participación importante de las células cebadas en el proceso inflamatorio observado durante la colitis pseudomembranosa y y la diarrea asociada al uso de antimicrobianos y finalmente, algunas sustancias estabilizadoras de las células cebadas, puedan reducir el proceso inflamatorio y el daño observado en la colitis pseudomembranosa.

1.8 Muerte Celular por Apoptosis.

El fenómeno de homeostasis es reconocido como un principio fundamental en los seres vivos, ya que este proceso nos permite mantener constantes las condiciones de nuestro medio ambiente interno. Por ejemplo, en el ciclo celular el control de la proliferación celular para mantener homeostasis es regulado mediante el proceso de muerte celular programada también conocido como apoptosis. Kerr y cols. (111), desarrollaron por primera vez el concepto de que existen dos tipos de muerte celular: por necrosis y por apoptosis. La necrosis es un proceso marcado por un incremento temprano del volumen de los organelos celulares y del total de la célula, seguido por autólisis. Los cambios nucleares en

este caso, son eventos tardíos resultantes de la activación de las enzimas celulares hidrolíticas. La necrosis es vista como una catástrofe metabólica que afecta directamente a la célula y a células vecinas produciendo daño severo tanto molecular como estructural (112). Contrariamente, el proceso de apoptosis es un fenómeno de muerte activa, reconocido en la actualidad como un fenómeno fisiológico, cuyas alteraciones desestabilizan la homeostasis celular produciendo diversas patologías. Este fenómeno, que forma parte del proceso de muerte celular programada está determinado genéticamente y es importante para el control de la homeostasis celular y el desarrollo de los organismos.

El fenómeno de apoptosis involucra alteraciones morfológicas y metabólicas bien caracterizadas (111,112). Morfológicamente las células apoptóticas son más pequeñas, con cambios sustanciales en el núcleo pero no en los organelos citoplásmicos. En el núcleo, la cromatina se condensa lo que histológicamente se conoce como picnosis, posteriormente se desintegra en fragmentos (cariorraxis) y cada fragmento protruye con porciones de citoplasma rodeados de membrana celular conociéndose a este fenómeno como protrusión, gemación o "blebbing" (113,114). Al desprenderse, estos fragmentos forman los cuerpos apoptóticos que se presentan en los estadios tardíos de la apoptosis. El evento final en la cascada, es la fagocitosis por macrófagos vecinos u otras células fagocíticas; las cuales reciclan estos cuerpos apoptóticos (115,116). Contrario a lo que sucede en los procesos de muerte por necrosis, en la apoptosis no se produce un proceso inflamatorio ni se causa daño a las células vecinas. Así mismo, en la apoptosis las células experimentan cambios bioquímicos y metabólicos importantes, ya que procesos como la síntesis de proteínas y la activación y expresión de ciertos genes, juegan un papel prominente en este proceso (117,118,119). Proteínas como las ciclinas, nucleasas, proteínas cinasas, caspasas y proteasas son requeridas a diferentes niveles como activadores, ejecutores o reguladores del proceso de apoptosis (117,118,119,120,121). Los mecanismos de activación y control génico de la apoptosis han sido ampliamente estudiados (121,122,123).

Los estudios para establecer que la muerte celular programada (MCP) era un fenómeno genéticamente determinado, se realizaron inicialmente en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*. Este modelo permitió establecer que un sistema de genes permiten la supervivencia o dirigen la muerte de las células en los primeros estadios de desarrollo del nemátodo. Se ha establecido que los genes ced-3, ced-4 y ced-9 son los componentes centrales y regulan la MCP (121,123). Se ha establecido que ced-9 en *C. elegans* es un gen inhibidor de la muerte celular y que el gen homólogo en el mamífero es el supresor Bcl-2, mientras que ced-3 es un gen efector de muerte y su homólogo en mamíferos es ICE conocido miembro de la familia de las caspasas. Para ced-4 que en conjunto con ced-3, es un efector de muerte celular no se ha encontrado aún un gen homólogo (117,119,121,123).

El proceso de apoptosis se puede presentar en casi todas las células del organismo. En el sistema inmune por ejemplo, la muerte celular programada es clave en los procesos de selección negativa que ocurren en el timo. Estos procesos también involucran diversas moléculas como a la familia del TNF y su receptor que incluye a Fas/APO-1/CD95 y a su ligando; estas moléculas entre las que tenemos a MORT1/ FADD, TRADD y RIP se caracterizan por presentar una secuencia de 70-80 a.a. en la porción citoplásmica, identificadas como “dominios de muerte” esenciales para iniciar diversas vías que conducen a la muerte celular (120,124,125,126,127). Entre otros genes involucrados también tenemos a los relacionados con ICE (gen de la enzima convertidora de IL-1 β) y otras 10 proteasas de cisteína ahora denominadas caspasas, la familia de bcl-2 incluyendo a bcl-x, bcl-xs, bcl-xl, bax, bak, oncogenes como c-myc, fos/jun, ELF, DP-1, SV40, E1B, p53, y genes relacionados como WAF1, RB y Reaper (121,126,127,128). No solo los timocitos sino otras células inmunes como neutrófilos, eosinófilos y células cebadas presentan el fenómeno (129,130,131).

En las células cebadas se ha establecido, que tanto la proliferación como la maduración involucran dos citocinas: la IL-3 y el ligando de c-kit (SCF). En 1993 Mekori y cols. (131), describieron por primera vez, que las células cebadas murinas podían presentar apoptosis por privación de IL-3, mientras que el SCF

era capaz de rescatarlas del fenómeno (132,133). Posteriormente, se demostró que el ligando del receptor de c-kit, SCF, regula tanto en el humano como en el ratón la supervivencia de las células cebadas, suprimiendo el proceso de apoptosis (133). Otras moléculas como el factor de crecimiento nervioso (NGF), actúa como el SCF, inhibiendo la apoptosis en células cebadas peritoneales murinas a través del receptor del proto-oncogen p140^{TRK} (134). Varios genes se han implicado en la regulación del fenómeno de apoptosis en células cebadas. Por ejemplo, se encontró que cuando las células cebadas presentan apoptosis por privación de IL-3 existe coincidentemente, un decremento endógeno del RNA_m de bcl-2 (135). De tal forma, que tanto el SCF como la IL3 son supresores de apoptosis en las células cebadas aunque actúan por diferentes mecanismos ya que bcl-2 no es activado por SCF. Otro fenómeno interesante es la privación de SCF que induce apoptosis siendo éste proceso parcialmente dependiente de p53 (136). Aunque el efecto del SCF para prevenir la apoptosis en estas células no se asocia con la inducción de bcl-2, ya que este gen no regula el rescate efectuado por el SCF en células cebadas, su sobreexpresión si prolonga la supervivencia de células cebadas transfectadas con el gen (135,136). Por otra parte, el SCF es capaz de inducir la expresión de otros genes como bax. Otros estudios (137,138), han demostrado que los mecanismos que regulan la proliferación de las células no actúan solamente a través de factores de crecimiento, sino también mediante mecanismos adicionales como el factor transcripcional murino codificado por el locus *mi* (MITF) que es un inductor y acelerador de apoptosis en células cebadas murinas con privación de IL-3. Otros mecanismos como la activación directa de Fas (CD95, APO-1) (137) que inducen el proceso de apoptosis en células cebadas y la expresión de la sintetasa de óxido nítrico (NOS) (139) que se expresa en la línea celular p815 proveniente de mastocitomas murinos que presentan apoptosis espontánea, demuestran que estos mecanismos pueden participar en la regulación de la proliferación y supervivencia de las células cebadas. Como se ha mencionado, el proceso de apoptosis es multifactorial y es un fenómeno regulado genéticamente, en el que se involucran agentes físicos,

químicos, agentes bacterianos y virus. El proceso de apoptosis mediado por agentes infecciosos ha sido descrito para una amplia gama de bacterias y sus productos. Así, microorganismos como: ***Shigella flexneri***, ***Bordetella pertussis***, ***Mycobacterium tuberculosis***, ***Legionella pneumophila***, ***Salmonella typhimurium*** y ***Helicobacter pylori*** y las toxinas bacterianas como: la toxina diftérica, las toxinas α y B del estafilococo, la toxina de pertussis, la verotoxina, la toxina A de ***C. difficile***, la toxina A de pseudomona y el lipopolisacárido (LPS) son capaces de inducir apoptosis en diferentes tipos celulares (140,141,142). Tanto la toxina A como la toxina B de ***C. difficile*** son inductoras de apoptosis (142,143,144). Estudios realizados por Mahida y cols. (142) demostraron que la toxina A de ***C. difficile*** tiene diversos efectos sobre las líneas celulares Caco, HT29, T84 y células epiteliales de colon humano, induciendo cambios morfológicos como redondeamiento y desprendimiento de la membrana basal, detectándose finalmente apoptosis. Reportes posteriores de estos mismos autores (144), han demostrado que posterior a la pérdida del epitelio intestinal, las células residentes de lámina propia se ven afectadas, observándose una pérdida temprana de los macrófagos y muerte por apoptosis de linfocitos T y eosinófilos, detectándose además liberación de $TNF\alpha$. Sin embargo, aunque no se sabe con precisión que vías metabólicas se activan o que genes controlan estos eventos, la toxina A de ***C. difficile*** es capaz de guiar a diferentes tipos de células a un proceso de apoptosis y específicamente a células inmunes, produciendo finalmente daño a nivel intestinal.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La diarrea asociada al uso de antimicrobianos y la colitis pseudomembranosa son dos problemas de salud pública muy importantes sobre todo en las etapas extremas de la vida. El conocimiento de la fisiopatogenia de estas entidades es muy importante para comprender los mecanismos que desarrollan la enfermedad, así como para encontrar un tratamiento efectivo. El principal agente etiológico de la diarrea asociada al uso de antimicrobianos y a la colitis pseudomembranosa es ***Clostridium difficile***, que actúa mediante sus toxinas A y B. Nosotros estudiamos las alteraciones inducidas por la toxina A o enterotoxina en células cebadas. Recientemente se han realizado numerosos estudios para poder entender los mecanismos que llevan al daño intestinal inducidos por la toxina A, un planteamiento interesante es la participación de células del sistema inmune, específicamente las células cebadas de mucosa que se encuentran ampliamente distribuidas en el tracto gastrointestinal. Estas células al ser activadas pueden liberar una gran cantidad de mediadores de la inflamación y por lo tanto participan en el daño observado a nivel intestinal inducido por la toxina A de ***C. difficile***. Hasta la fecha, no se ha definido si ocurre una activación directa de las células cebadas por la toxina A o indirecta, vía el sistema nervioso entérico. En este trabajo, se analizaron los efectos *in vitro* de la toxina A sobre las células cebadas, su activación por la toxina y la liberación de mediadores de respuesta inflamatoria, así como los efectos relacionados con la viabilidad de estas células. Como se ha postulado, las células cebadas pueden estar participando del daño inducido por la toxina A de ***C. difficile*** por lo tanto, si los efectos sobre estas células son controlados, se podría disminuir de forma muy importante el daño producido por la toxina.

III) JUSTIFICACION

Por las razones anteriormente mencionadas consideramos de gran importancia el estudio del efecto de la toxina A de *C. difficile* sobre células efectoras de la respuesta inmune como son las células cebadas. Debido a la gran cantidad de mediadores de la inflamación y citocinas liberados por estas células, su participación en procesos infecciosos es muy importante. A las células cebadas se les ha vinculado con problemas de inflamación aguda intestinal y colitis, por lo que es importante considerar su potencial como células efectoras e inductoras de la inflamación. Nosotros estudiamos los efectos directos de la toxina A de *C. difficile* sobre las células cebadas para determinar su participación en la fisiopatogenia de la colitis pseudomembranosa y la diarrea asociada al uso de antimicrobianos así como, para establecer un vínculo que nos demuestre la importancia de estas células en procesos inflamatorios e infecciosos. Estos estudios nos permiten llegar a un mejor entendimiento de los diversos mecanismos relacionados con las patologías inducidas por la toxina A.

IV) HIPOTESIS

La toxina A de *C. difficile* es capaz de activar a las células cebadas generando mediadores de la respuesta inflamatoria generando daño intestinal y muerte celular.

V) OBJETIVO GENERAL

Determinar los efectos de la toxina A de *C. difficile* en los mecanismos de activación, liberación de mediadores y sobrevivencia de las células cebadas.

III) JUSTIFICACION

Por las razones anteriormente mencionadas consideramos de gran importancia el estudio del efecto de la toxina A de *C. difficile* sobre células efectoras de la respuesta inmune como son las células cebadas. Debido a la gran cantidad de mediadores de la inflamación y citocinas liberados por estas células, su participación en procesos infecciosos es muy importante. A las células cebadas se les ha vinculado con problemas de inflamación aguda intestinal y colitis, por lo que es importante considerar su potencial como células efectoras e inductoras de la inflamación. Nosotros estudiamos los efectos directos de la toxina A de *C. difficile* sobre las células cebadas para determinar su participación en la fisiopatogenia de la colitis pseudomembranosa y la diarrea asociada al uso de antimicrobianos así como, para establecer un vínculo que nos demuestre la importancia de estas células en procesos inflamatorios e infecciosos. Estos estudios nos permiten llegar a un mejor entendimiento de los diversos mecanismos relacionados con las patologías inducidas por la toxina A.

IV) HIPOTESIS

La toxina A de *C. difficile* es capaz de activar a las células cebadas generando mediadores de la respuesta inflamatoria generando daño intestinal y muerte celular.

V) OBJETIVO GENERAL

Determinar los efectos de la toxina A de *C. difficile* en los mecanismos de activación, liberación de mediadores y sobrevivencia de las células cebadas.

III) JUSTIFICACION

Por las razones anteriormente mencionadas consideramos de gran importancia el estudio del efecto de la toxina A de *C. difficile* sobre células efectoras de la respuesta inmune como son las células cebadas. Debido a la gran cantidad de mediadores de la inflamación y citocinas liberados por estas células, su participación en procesos infecciosos es muy importante. A las células cebadas se les ha vinculado con problemas de inflamación aguda intestinal y colitis, por lo que es importante considerar su potencial como células efectoras e inductoras de la inflamación. Nosotros estudiamos los efectos directos de la toxina A de *C. difficile* sobre las células cebadas para determinar su participación en la fisiopatogenia de la colitis pseudomembranosa y la diarrea asociada al uso de antimicrobianos así como, para establecer un vínculo que nos demuestre la importancia de estas células en procesos inflamatorios e infecciosos. Estos estudios nos permiten llegar a un mejor entendimiento de los diversos mecanismos relacionados con las patologías inducidas por la toxina A.

IV) HIPOTESIS

La toxina A de *C. difficile* es capaz de activar a las células cebadas generando mediadores de la respuesta inflamatoria generando daño intestinal y muerte celular.

V) OBJETIVO GENERAL

Determinar los efectos de la toxina A de *C. difficile* en los mecanismos de activación, liberación de mediadores y sobrevivencia de las células cebadas.

VI) OBJETIVOS PARTICULARES.

- a) Investigar las alteraciones funcionales y morfológicas originadas por la toxina A de *C. difficile* en células cebadas.

- b) Determinar si las células cebadas tratadas con la toxina A de *C. difficile* son capaces de liberar mediadores como histamina, TNF α y óxido nítrico.

- c) Analizar como el daño inducido por la toxina A de *C. difficile* en células cebadas modifica su viabilidad y sobrevivencia.

VII) MATERIAL Y METODOS

VII.1 Líneas Celulares.

Se utilizó la línea de células cebadas HRMC (hibridoma celular que expresa un fenotipo de célula cebada de mucosa) donada por el Dr. Arnold Froese (145). Así mismo se utilizaron la línea celular IEC-18 proveniente de epitelio intestinal de rata y la WEHI 164.13 sensible a TNF- α y β de acuerdo a las especificaciones de la ATCC. Las células HRMC y WEHI 164.13 se cultivaron con medio RPMI 1640 conteniendo bicarbonato de sodio y suplementado con 10% de suero fetal bovino (FetalClone II, Hyclone, Logan, UT, USA.), 2mM de L-glutamina, Hepes 1M y penicilina-estreptomina (100X) (RPMI-SFB) en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C. Las células IEC-18 se cultivaron bajo las mismas condiciones agregando además 10 U de insulina (Humulin-R, Elli Lilly de México) en 100 ml de RPMI-SFB. Para obtener células en suspensión de las líneas IEC-18 y HRMC, las monocapas de células adherentes se sometieron a un tratamiento con tripsina-verseno (0.05-0.05%) (In vitro, México, México) por 5 min a 37° C y se lavaron posteriormente en PBS pH 7.4 mediante centrifugación a 300 X g a temperatura ambiente.

VII.2 Células cebadas peritoneales. (PMC).

Las células cebadas peritoneales se obtuvieron de ratas Sprague-Dawley, las cuales fueron mantenidas en el bioterio del CMN siglo XXI, IMSS y en los bioterios del Heritage Research Center, Edmonton, y de la Universidad de Calgary, Canadá, bajo condiciones estándar y alimentadas *ad libitum*. Las PMC se obtuvieron mediante un lavado de la cavidad peritoneal con 20 ml de solución amortiguadora Hepes-Tyrode conteniendo albúmina sérica bovina al 0.1%, Hepes 10 mM, NaCl 130 mM, D-glucosa 11 mM, KCl 4.75 mM, CaCl₂ 2.54 mM y NaH₂PO₄ 1 mM (HBTS); posteriormente las células se centrifugaron a 300 X g por 5 min a 4°C para obtener el botón celular, el cual se resuspendió en 5 ml de HBTS y se

colocó en un gradiente de percoll discontinuo (80/30%) (Pharmacia Ltd., Uppsala, Suecia). Este gradiente se centrifugó a 600 X g por 20 min a 4°C para obtener el botón celular conteniendo las PMC. Las células así obtenidas, se cultivaron en medio RPMI-SFB bajo las condiciones ya descritas, a una densidad de 2.5×10^5 células/ml. La homogeneidad de las células aisladas se verificó mediante la tinción de azul de toluidina (146) por microscopía de luz. En todos los experimentos la pureza de las PMC obtenidas fue entre 97-99% y la viabilidad analizada por ensayos de exclusión de azul tripán >96%. El protocolo utilizado para la obtención de células cebadas de ratas fue aprobado por el comité de ética del Instituto Mexicano del Seguro Social, México y de las Universidades de Alberta y Calgary, Canadá.

VII.3 Reactivos

Los siguientes reactivos fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA): 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT), sulfanilamida, o-ptaldialdehido, acetaldehido, difenilamina, tritón X-100, Hepes -(N-2-hidroxi-etil)piperazina N'-(2-ácido etanilsulfónico), ionóforo de calcio A23187 (Calon), 2-mercaptoetanol, parafenilendiamina, L-glutamina, penicilina-estreptomina 100X, anticuerpos monoclonales anti-tubulina y el kit E-toxate (Limulus amoebocyte lysate) para detección de endotoxina. El NaOH, el NaCl, el KCl, el CaCl₂, la D-glucosa, el NaH₂PO₄, el ácido tricloroacético (TCA), el ácido acético glacial, el H₂SO₄ y el glutaraldehido se obtuvieron de Merck de México, (México). La toxina A de *C. difficile* fué purificada de acuerdo al método de Torres y Lonroth (147) y probada con el kit E-toxate para comprobar que fuese libre de endotoxina. El antígeno de *Nippostrongylus brasiliensis* (NbAg) fué obtenido de acuerdo al procedimiento descrito por White y Pearce (148). El medio RPMI-1640, el fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y la solución salina balanceada de Hanks (HBSS) fueron de Gibco BRL (Gibco Co. Gaithersburg MD, USA). Los anticuerpos monoclonales anti-actina, fueron producidos y purificados como

previamente se ha descrito (149). Los anticuerpos policlonales anti-toxina A fueron producidos en conejo de acuerdo al método descrito por Torres y cols (150).

VII.4 Ensayo para medir TNF- α .

Se utilizaron 2.5×10^4 PMC de ratas sanas, las cuales fueron incubadas en RPMI-SFB y tratadas con diferentes concentraciones de toxina A (0.001, 0.01, 0.1 y $1 \mu\text{g/ml}$) por 4 h a 37°C en una atmósfera de CO_2 al 5%. A continuación, las células se lavaron y centrifugaron para retirar la toxina sobrante y se incubaron por 6 h más en RPMI-SFB, de acuerdo a las condiciones ya referidas. Posteriormente los sobrenadantes se obtuvieron por centrifugación ($900 \times g$) y se probaron en la línea celular WEHI 164.13 sensible a TNF- α mediante un ensayo de citotoxicidad utilizando MTT (151). Para estos ensayos, los sobrenadantes obtenidos ($50 \mu\text{l}$) de células tratadas y sin tratar con la toxina A así como la curva control estándar de TNF- α recombinante de ratón de 0.8 a $100 \mu\text{g/ml}$ (Genzyme Co., Cambridge, MA, USA), se incubaron en placas de 96 pozos (Costar Co. Cambridge, MA, USA) con 1×10^5 células WEHI 164.13/ml en RPMI-SFB por 20 h a 37°C en 5% de CO_2 . Posteriormente, la viabilidad celular se evaluó en presencia de MTT (5mg/ml en PBS) incubándose las muestras por 3 h a 37°C en 5% de CO_2 . Para disolver los cristales de formazán presentes, se adicionó isopropanol-HCl (0.04N en HCl) y se procedió a leer la placa a 570 nm en un espectrofotómetro Vmax kinetic reader (Molecular Devices Co. Menlo Park, CA, USA). En todos los casos se añadió suero policlonal anti-toxina A en una dilución de 1:50, suficiente para neutralizar la actividad de $1 \mu\text{g/ml}$ de toxina.

VII.5 Producción de óxido nítrico (NO).

Para estos ensayos se utilizaron 1×10^5 PMC de ratas sanas, las cuales se incubaron por 4 h con diferentes concentraciones de la toxina A (0.001, 0.01, 0.1 y $1 \mu\text{g/ml}$) en RPMI-SFB sin rojo de fenol. Posteriormente a las células se les retiró la toxina A por centrifugación ($300 \times g$ por 5 min) y se incubaron a 37°C en CO_2 al

5% por 72 h más. Se procedió a obtener el sobrenadante que se mezcló con un volumen igual de reactivo de Griess (1% de sulfanilamina en 2.5% de H₃PO₄ y 0.1% de N-(1-naftil)-etilen diamino dihidroclorado en 2.5% de H₃PO₄) y se incubó por 10 min a temperatura ambiente (152). La concentración de NO₂⁻ se determinó utilizando diferentes concentraciones de NaNO₂ (de 1.25 nM a 250 nM). Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro Vmax kinetic reader (Molecular Devices Co. Menlo Park, CA, USA) a una absorbancia de 540 nm.

VII.6 Ensayo de liberación de histamina.

Para estudiar la activación dependiente de IgE inducida por la toxina A en PMC, se infectaron ratas sanas (5 ó 6 semanas antes del aislamiento de las PMC) con 3000 gusanos del tercer estadio del nemátodo *Nippostrongylus brasiliensis* (**Nb**) (153). Para evaluar tanto la activación independiente de IgE, así como la acción directa de la toxina A de *C.difficile*, se utilizaron ratas no infectadas. De las ratas infectadas con **Nb**, se utilizaron 2.5X10⁴ PMC, las cuales se incubaron en 100 µl de HTBS en presencia o ausencia de toxina A (0.001, 0.01, 0.1 y 1µg/ml) por 30 min ó 4 h a 37°C en CO₂ al 5%. Después de la incubación, las células se lavaron y centrifugaron a 300 X g por 5 min a 4°C. Las PMC se resuspendieron en HBTS y se expusieron por 20 min a 37°C a una concentración de antígeno de **Nb** equivalente a 10 gusanos/ml. Las células aisladas de ratas no infectadas también fueron incubadas con las diferentes dosis de toxina A bajo las condiciones ya referidas y posteriormente con Ionóforo de Calcio A23187 (2.5 µM), por 20 min o solo con RPMI-SFB. Los niveles de histamina se cuantificaron según el método de Siraganian (154). Los sobrenadantes y botones celulares se separaron por centrifugación a 900 X g por 5 min a 4°C. Ambas muestras se sometieron a ebullición por 10 min y se precipitaron en TCA al 25% por 10 min. Las proteínas precipitadas se retiraron mediante centrifugación a 1200 X g por 10 min y todas las muestras se transfirieron a fluoro placas (Fluoro Nunc Maxisorp, USA). Para activar la reacción se adicionaron NaOH 4N y o-ptaldialdehido

(1.3mg/ml de metanol). Finalmente, la reacción se estabilizó adicionando HCl 3N. Las muestras se leyeron utilizando un fluoroscan Cytofluor 2350 (Millipore Co. MA, USA) con un filtro de excitación de 345 y de emisión de 455. El porcentaje de liberación de histamina de las PMC se calculó tomando las lecturas obtenidas de los sobrenadantes y botones mediante la siguiente fórmula: $(\text{Lectura del SN} / \text{Lectura del SN} + \text{Botón}) \times 100$. La liberación espontánea de histamina en ausencia de la toxina A, de Ionóforo de calcio o de NbAg, fue sustraído para estimar el porcentaje de la liberación específica de histamina.

VII.7 Estudios de morfología celular.

a) Ensayos de citotoxicidad

Se incubaron 2.5×10^4 células HRMC y 5×10^4 células IEC-18 y PMC en RPMI-SFB a 37° en 5% de CO₂ por 4 h con diferentes concentraciones (0.001, 0.01, 0.1 y 1µg/ml) de toxina A. Posteriormente, las células se centrifugaron a 300 X g con PBS pH 7.4 para retirar la toxina y se incubaron bajo las condiciones ya referidas en RPMI-SFB a tiempos adicionales de 4, 20, 44 y 68 h. El efecto citotóxico se valoró por microscopía de luz mediante la observación de la morfología de las células tratadas con la toxina A. Para lo cual se utilizaron los siguientes criterios: que en las células IEC18 se presentara redondeo celular y pérdida de sus uniones y para las células HRMC que se presentara redondeo total. Se observaron por lo menos cinco diferentes campos visuales del cultivo celular, contándose en cada uno de ellos 100 células. Se evaluó además la viabilidad celular a cada tiempo y concentración mediante ensayos de exclusión de azul tripán.

b) Preparación de "Cytospots".

Se incubaron 2×10^5 HRMC con 1µg/ml de toxina A en medio RPMI-SFB y células control sin toxina por 4 h bajo las condiciones ya descritas. Posteriormente se retiró la toxina y se incubaron las células en medio RPMI-SFB por 20 h adicionales. Las células se suspendieron en PBS con 0.15 M EDTA y 5% de BSA

y se centrifugaron a 200 X g por 5 min en un Cytospin (Shandon Southern Instruments, Sewickley, PA, USA). Las muestras se secaron de 6 a 12 h a temperatura ambiente y se tiñeron con una modificación de la tinción de Giemsa, utilizando el reactivo de Diff Qwik (American Scientific Products, McGam Park, IL, USA) observándose por lo menos cinco diferentes campos mediante microscopía de luz.

c) Citoesqueleto.

Para el análisis de los efectos de la toxina A de *C. difficile* sobre citoesqueleto, se utilizaron 2.5×10^4 PMC o HRMC, las cuales se incubaron con 1 µg/ml de toxina A o únicamente medio RPMI-SFB por 4 h, bajo las condiciones ya mencionadas. Las células tratadas con la toxina A se incubaron por 20 h adicionales en RPMI-SFB a 37° en 5% de CO₂ y finalmente se lavaron con PBS pH 7.4. Posteriormente, las células se fijaron en paraformaldehído (Fisher scientific, USA) al 3.7% en PBS por 30 min y en seguida, las muestras se lavaron en tres ocasiones con el mismo solución amortiguadora y se permeabilizaron con tritón X-100 al 0.1% en PBS por 10 min; a las muestras de actina se les dió un tratamiento extra con SDS al 0.5% por 10 min. Posteriormente, se les adicionaron 30 µl de anticuerpo monoclonal anti-actina(1:30) o anti-tubulina y se incubaron por 1 h a temperatura ambiente (146). Las muestras así tratadas, se lavaron con PBS y se incubaron con un anticuerpo policlonal anti-IgGs de ratón conjugado con fluoresceína (1:30) (Boehringer-Mannheim, Germany) por 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se lavaron con PBS y H₂O bidestilada y se montaron en cubreobjetos preparados con parafenilendiamina en gelvatol (Monsanto Birchman Bend Plant, MA, USA), observándose diferentes campos en un microscopio de fluorescencia Olympus BH-2 (Olympus Co. Japan) y en un microscopio confocal (BioRad Lab, CA, USA modelo MRC 600).

d) Microscopía Electrónica.

Las células tratadas y no tratadas con toxina A se prepararon para su observación mediante microscopía electrónica. Para ello, se incubaron 1×10^6 PMC con $1 \mu\text{g/ml}$ de toxina o con medio RPMI-SFB por 4 h bajo las condiciones ya descritas. Posteriormente, se retiró la toxina de las células y se suspendieron en RPMI-SFB, incubándose por 20 h adicionales a 37°C en 5% de CO_2 . Las células entonces se fijaron con glutaraldehído (Merck de México) al 2.5% por 1 hora, y se realizó una post-fijación con OsO_2 en solución amortiguadora de cacodilatos 0.3 M pH 7.2. Una vez realizado lo anterior se procedió a realizar una deshidratación gradual en etanol (70,90 y 100%) y finalmente se embebieron en epon (155). Las muestras se seccionaron por microtomo y se observaron mediante microscopía electrónica de transmisión en un microscopio Jeol-X100 SX (Jeol Co. Tokio, Japan). Para su observación por microscopía de barrido, después de la deshidratación gradual en etanol, las muestras se secaron a punto crítico con CO_2 y se cubrieron de oro, observándose en un microscopio Jeol 35C (Jeol Co. Tokio, Japan).

VII.8 Ensayos para evaluar la muerte celular por Apoptosis.

a) Análisis de fragmentación de DNA.

Una suspensión de 2×10^6 PMC de ratas no infectadas o de HRMC se incubaron por 4 h en presencia o ausencia de $1 \mu\text{g/ml}$ de toxina A, bajo las condiciones ya referidas. Posteriormente, las células se centrifugaron a $300 \times g$ durante 5 min con PBS pH 7.4 y se suspendieron en solución amortiguadora de lisis (10mM de EDTA, 50 mM de tris-HCl pH8 y SDS al 0.5%), con proteinasa K (500 $\mu\text{g/ml}$) y RNAsa A (50 $\mu\text{g/ml}$) y se incubaron a 50°C por 2 h. En seguida, las muestras se centrifugaron a $16000 \times g$ por 15 min a 4°C . Para la extracción del DNA se recuperaron los sobrenadantes y se trataron dos veces con un volumen igual de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y una vez con cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). El DNA obtenido en la fracción acuosa se precipitó toda la noche a -20°C en un 0.1 volumen de acetato de sodio 3M y 2.5 volúmenes de etanol al

100%. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 16000 X g por 10min 4°C y se lavaron 2 veces con etanol al 70% centrifugando a 16000 X g por 5 min a 4°C. El botón de DNA obtenido se suspendió en 20 µl de solución amortiguadora TE (40 mM trisHCl y 1 mM de EDTA) y se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1%, tiñéndose por 30 min para su observación con una solución de sybr green (dil:1:10000) (Molecular probes. Eugene, OR, USA) de acuerdo a las intrucciones del proveedor.

b) Determinación del porcentaje de DNA fragmentado.

Para evaluar el porcentaje de DNA fragmentado se realizaron ensayos con difenilamina (DPA) (156,157). Para éstos, se utilizaron 1×10^6 PMC o células HRMC, las cuales fueron incubadas con 1µg/ml de toxina A o medio RPMI-SFB por 4 h, de acuerdo a las condiciones ya mencionadas. A continuación las células se lavaron por centrifugación a 300 X g por 5 min a temperatura ambiente para retirar la toxina excedente y se incubaron a 37° en 5% de CO₂ en RPMI-SFB a tiempos adicionales para finalmente lograr tiempos de incubación 0, 4, 8, 12, 18 y 24 h para PMC y de 0, 4, 24, 48 y 72 h para HRMC. Posteriormente, las muestras se lavaron con PBS pH 7.4 obteniéndose los botones celulares que se suspendieron en solución amortiguadora HiTE (100mM de Tris-HCl, 40 mM de EDTA). Inmediatamente, se les adicionaron 400 µl de solución de lisis no iónica, (10mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA con 0.5 % v/v de Tritón X-100) y se colocaron en agitación por 30 min. Las muestras así tratadas se centrifugaron a 16 000 X g por 15 min, obteniéndose los sobrenadantes (DNA de bajo peso molecular) así como los botones (DNA de alto peso molecular). En seguida, se realizó una precipitación con TCA al 25% toda la noche, y posteriormente una segunda precipitación con TCA al 5% seguido de una hidrólisis a 90°C. Finalmente, a las muestras se les adicionó el reactivo de DPA [difenilamina 15 mg/ml en ácido acético glacial al 98% con 1.5% (v/v) de H₂SO₄, y acetaldehido al 0.5% (v/v)], incubándose por 15 a 18 h a 30° C. Para la lectura se tomó un volumen de 200 µl

y se transfirió a una microplaca de 96 pozos (Nunclon, Nunc Co. Denmark), procediéndose a leer las muestras con una absorbancia de 620 nm en un lector Bio-Tek Instruments (Winooski, VT, USA). El porcentaje de fragmentación del DNA se calculó mediante la siguiente fórmula: % fragmentación del DNA = (DNA de bajo peso molecular / DNA de bajo peso molecular + DNA de alto peso molecular) X100. Los valores fueron reportados como el porcentaje de fragmentación del DNA.

c) Ensayo de TUNEL "Tdt-mediated dUTP Nick End Labelling"

Para evaluar por citometría de flujo la apoptosis de células cebadas tratadas con la toxina A de *C. difficile*, se utilizaron 1×10^6 células HRMC o PMC tratadas y sin tratar con toxina A en una concentración de $1 \mu\text{g/ml}$ por 4 h, de acuerdo a las condiciones ya establecidas. Las células se lavaron y centrifugaron para retirar la toxina y se incubaron por 20 h adicionales. Posteriormente las células, se lavaron dos veces con PBS pH 7.4 centrifugando a 300 X g por 5 min y los sobrenadantes se retiraron mientras que los botones conteniendo las células, se transfirieron a placas de 96 pozos (Falcon 3072, Becton Dickinson, NJ, USA) y se fijaron con paraformaldehído al 2% por 20 min a temperatura ambiente. Después las muestras fijadas se lavaron con PBS pH 7.4 por centrifugación a 300 X g por 5 min y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.1 % diluído en citrato de sodio al 0.1% por 2 min a 4°C lavándose posteriormente en 2 ocasiones con PBS pH 7.4 por centrifugación a 300 X g por 5 min. Las muestras ya permeabilizadas se incubaron en un volumen final de 50 μl conteniendo TdT buffer 5X, dATP 3nmol , FITC-12-dUTP 0.3 nmol y TdT 30.8 U/mL por 12h a 37°C en 5% de CO₂. La reacción se detuvo adicionando EDTA 0.5 M a cada muestra y se lavaron posteriormente por centrifugación a 300 X g por 5 min con PBS pH 7.4. Finalmente, la incorporación de dUTP fluoresceinado correspondió al porcentaje de fluorescencia emitido por las células en apoptosis y fué medido en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson Co. Mountain View, CA, USA), el cual se

calibró de manera automática y se leyó de acuerdo a los siguientes parámetros: 575 en FL1, 597 en FL2 y 412 en FL3, utilizándose el programa de CellQuest (Becton Dickinson, USA) para su lectura y posterior análisis.

VII.9 Análisis estadístico.

Para la evaluación de los ensayos de liberación de $\text{TNF}\alpha$ y NO se utilizó la prueba T de Student de dos colas pareadas. Los resultados se consideraron con diferencias significativas para una $P < 0.05$. Para valorar los ensayos de histamina y difenilamina se utilizó un análisis de varianza con interacción de tres vías. Los resultados se consideraron con diferencias significativas en los ensayos de histamina para una $P < 0.01$ y de difenilamina para una $P < 0.05$.

VIII) RESULTADOS.

VIII.1 Efectos citotóxicos de la toxina A en PMC, HRMC y IEC-18.

Las alteraciones morfológicas inducidas por la toxina A de *C. difficile* se valoraron en células IEC-18, HRMC y PMC mediante microscopía de luz a diferentes tiempos (fig 1). Las células HRMC y IEC-18 tratadas con 1µg/ml de toxina A presentaron a las 4 h de exposición a la toxina pérdida de su morfología observándose principalmente redondeamiento (fig 1B y D) y en las células IEC-18 pérdida de las uniones intercelulares. Este fenómeno no se observó en las PMC debido a que estas células no mostraron cambios importantes en su morfología (fig 1F). Las células control se muestran en las figuras 1A, C y E. Durante las siguientes 24 h (fig 2), después de iniciada la exposición a la toxina, las células PMC y HRMC conservaron en su gran mayoría (80-90%) integridad de la membrana citoplásmica con ligero aumento de tamaño en las HRMC (fig 2A) y aumento en la granularidad en las PMC (fig 2C) con respecto a las células control (2B). Por el contrario, las células IEC-18 mostraron alteraciones en su membrana citoplásmica con pérdida del material citoplásmico, características de un fenómeno de necrosis (fig 2D y E). A tiempos de incubación más largos (48, 72 y 96 h) las HRMC mostraron vacuolización intensa y formación de células arborescentes y gigantes, con aparente inclusión de material celular fagocitado (fig 3C y D). Las células PMC mostraron únicamente reducción en su tamaño con ligera degranulación (fig 3A y B). Otro parámetro para valorar la citotoxicidad celular fue evaluar la viabilidad celular mediante ensayos de exclusión con azul tripán, antes y después de la exposición a la toxina A (fig 4). La viabilidad de las células IEC-18 no decreció en las primeras 4 h de exposición a la toxina. Sin embargo, el porcentaje de células viables disminuyó hasta en un 90% en las siguientes 20 h. En el caso de las PMC, la viabilidad no se afectó por la exposición a concentraciones de 0.001 a 1µg/ml de toxina A en las primeras 4 h, sin embargo la exposición a 1µg/ml de toxina A por períodos más largos de tiempo (24,48 y 72 h), si tuvo efecto en la viabilidad de estas células en un 17, 30 y 60% respectivamente. En las células HRMC, la viabilidad se afectó con

concentraciones de 1µg/ml de toxina después de 24 h de iniciada la exposición a ésta. Observándose una reducción de la viabilidad menor al 10% a las 4 h y de hasta un 50% a las 72 h de exposición. Debido a que concentraciones mayores (10µg/ml) de toxina A por 4 y 24 h afectaron la viabilidad tanto en PMC como en HRMC, no se utilizaron en el curso de los siguientes experimentos.

VIII.2 Efecto de la toxina A de *C. difficile* en la producción de TNF α y NO.

Para determinar los efectos de la toxina A en la producción de TNF α , las PMC de ratas no infectadas se incubaron con diferentes concentraciones de toxina A por 4 h (fig 5 A). Los sobrenadantes obtenidos conteniendo TNF α se probaron en un ensayo de citotoxicidad utilizando la línea celular WEHI 164.13. El tratamiento de PMC con 0.01 o 0.1 µg/ml de toxina A estimuló significativamente (*p<0.05) la liberación de TNF α de 14.4 pg/10⁶ a 36.5 y 46 pg/10⁶ células respectivamente, sin embargo el tratamiento con 1µg/ml de toxina no mostró un incremento mayor que el obtenido con 0.1 µg/ml de toxina.

Para investigar los efectos de la toxina A en la producción de NO por las células cebadas obtenidas de ratas no infectadas, éstas se expusieron a diferentes concentraciones de toxina A. Los resultados obtenidos se muestran en la (fig 5 B). Como se observa, ninguna de las concentraciones de toxina A utilizadas incrementaron la producción de NO por las PMC. Sin embargo, se debe notar que la producción constitutiva de NO por estas células en presencia de la toxina A no se vio afectada.

VIII.3 Efecto de la toxina A en la liberación de histamina regulada por vías dependientes e independientes de IgE.

Para investigar los efectos de la toxina A en la liberación de histamina por ambas vías, se incubaron PMC provenientes de ratas infectadas y no infectadas con *N. brasiliensis*, utilizando diferentes concentraciones de toxina A por 30 min o por 4 h. Los resultados se observan en la fig 6. La acción directa de la toxina A no incrementó la liberación espontánea de histamina (2.6% \pm 0.5) a ninguno de los tiempos probados. Sin embargo, la exposición de las PMC de ratas infectadas con

1 µg/ml de toxina A por 4 h y posteriormente estimuladas con el antígeno de *N. brasiliensis* (fig 6A), inhibió significativamente la liberación de histamina en un 77%, ($p < 0.01$). Para analizar el efecto inhibitorio de la toxina A en la liberación de histamina por una vía independiente de IgE, las PMC de ratas no infectadas se incubaron con toxina A y posteriormente se trataron con 2.5 µM de ionóforo de calcio A23187 por 20 min; los resultados obtenidos indican que existe una inhibición significativa de la liberación de histamina (41%, $p < 0.01$), cuando las PMC se trataron con 1 µg/ml de toxina A por 4 h. Es de notar que el tratamiento de las PMC, con las diferentes concentraciones de toxina A por 30 min, no inhibió la liberación de histamina por ninguno de los mecanismos descritos (fig 6B).

VIII.4 Cambios morfológicos en PMC y HRMC inducidos por la toxina A de *C. difficile*.

Los ensayos realizados con la técnica de "cytospot" (fig 7), nos permitieron observar a las células HRMC en varios estadios apoptóticos. Las células HRMC sin tratamiento con la toxina A mostraron una morfología característica de células viables (fig 7 A), con su membrana citoplásmica íntegra y abundante granulación citoplásmica ligeramente basófila, además de núcleos grandes pleomórficos con cromatina bien distribuída y ligeramente acidófila. En contraste, se observó que las células tratadas con 1 µg/ml toxina A después de 24 h de iniciado su tratamiento (fig 7B), conservaron su membrana citoplásmica íntegra, aunque presentaban degranulación y retracción citoplásmica, así como núcleos condensados y basofílicos, notándose además la aparición de células gigantes multinucleadas (fig 7C) probablemente por fractura del núcleo o por fagocitosis de cuerpos apoptóticos provenientes de otras células.

VIII.5 Microscopía Electrónica.

Las alteraciones morfológicas presentadas por las células HRMC y PMC tratadas con 1 µg/ml de toxina A por 4 h se analizaron por microscopía electrónica de transmisión (TEM) y de barrido (SEM) (fig 8 y 9). Las células HRMC y PMC sin tratamiento (fig 8 A y B, fig 9 B y C) mostraron una distribución regular de su

contenido granular así como de la cromatina en el núcleo, la membrana plasmática se observa normal y el contenido granular es claramente visible. En las PMC tratadas con toxina A (fig 8 C y D) así como en las HRMC (fig 9 A y D), se observó un decremento en el número de microvellosidades de la membrana y cambios en los gránulos electrodensos del citoplasma y núcleos picnóticos con condensación de la cromatina. Además, en éstas últimas se observó también vacuolización intensa con formación de cuerpos apoptóticos (fig 9 A y D). Los cambios morfológicos observados sugieren el desarrollo de un proceso de apoptosis.

VIII.6 Alteraciones del citoesqueleto asociados con la exposición a la toxina A en las células cebadas.

Los cambios inducidos en el citoesqueleto de las PMC y HRMC después de la incubación con 1 µg/ml de toxina por 4 h se presentan en las fig 10 y 11. Las células PMC control mostraron una distribución normal de los filamentos de actina y tubulina (fig 10A y C) así como las células HRMC (fig 11A y C). En contraste, tanto las PMC y HRMC tratadas con 1µg/ml de toxina A por 4 h mostraron retracción citoplásmica y rearrreglos en el citoesqueleto de actina (fig10B y 11B), con formación de depósitos densos en el citoplasma. El citoesqueleto de tubulina en las HRMC y PMC expuestas a la toxina también mostró alteraciones como pérdida de su distribución normal, formación de gránulos y depósitos densos principalmente perinucleares (fig 10D y11D). Así mismo, cuando se sometió a las células epiteliales IEC-18 a tratamiento con la toxina A (1µg/ml por 4 h), observamos un desarreglo importante en el citoesqueleto de actina, sin la formación de depósitos como los observados en las células cebadas (fig 12 A y B).

VIII.7 Fragmentación del DNA en gel de agarosa.

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa con el DNA obtenido tanto de PMC como de HRMC tratadas con 1 µg/ml de toxina A (fig 13 y 14). Tanto el DNA de las células PMC como HRMC tratadas con toxina A mostró el patrón característico de escalera carril (fig 13 y 14 carril C). Por el contrario no se encontró fragmentación

del DNA en las células control sin tratamiento con la toxina A carril (fig 13 y 14 carril B) .

VIII.8 Porcentaje de DNA fragmentado en células cebadas expuestas a la toxina A.

Se obtuvo el porcentaje de DNA fragmentado de las PMC y HRMC tratadas con 1 $\mu\text{g/ml}$ de toxina A mediante un ensayo colorimétrico en presencia de difenilamina (fig 15). Las células PMC (fig 15 A) mostraron un incremento importante del aproximadamente 20% de fragmentación después de 24 horas de iniciado el tratamiento con la toxina A, siendo este incremento significativo ($p < 0.01$) con respecto al control inicial y de ($p < 0.05$) con respecto a las células control a las 24 horas. Las células HRMC (fig 15 B) mostraron un incremento significativo ($p < 0.05$) en el porcentaje de DNA fragmentado, el cual se observó a partir de las 24 horas de tratamiento con la toxina A, alcanzando su máximo entre las 72 y 96 horas.

VIII.9 Porcentaje de células cebadas en apoptosis expuestas a la toxina A.

Para determinar el porcentaje de células HRMC y PMC que presentaron apoptosis en presencia de de toxina A se evaluó la incorporaron dUTPs fluoresceinados al DNA fragmentado mediante citometría de flujo. Los resultados mostrados en las figuras 16 (A y B) y 17 indican que las células que incorporaron los dUTPs fluoresceinados son aquellas que presentan un mayor grado de DNA fragmentado, ya que entre mayor es la concentración de fluoresceína incorporada, mayor es la fragmentación de DNA. En la fig 16 A observamos a las células HRMC tratadas por 4 h con 1 $\mu\text{g/ml}$ de toxina A y las células control. De las células tratadas con la toxina, el 4.1% muestra incorporación de dUTPs fluoresceinados y solo el 1.75% de las células control. En la figura 16 B, observamos las HRMC tratadas con diferentes dosis de toxina A después de 24 horas de iniciado el tratamiento con la toxina. En las células tratadas con 0.1 y 1 $\mu\text{g/ml}$ observamos una incorporación entre un 73 y un 79% de dUTPs fluoresceinados, mientras que en las células control observamos solamente un 2.07% de incorporación. Este efecto de la toxina A fue completamente neutralizado, con una concentración de

anticuerpo policlonal anti-toxina A (1:50), indicando que el fenómeno de fragmentación de DNA es específicamente inducido por la toxina A. En la fig 17 observamos células PMC tratadas con 1 µg/ml de toxina A a diferentes tiempos de iniciado el tratamiento. El 22.5% de las células, mostraron inicialmente una incorporación de dUTPs fluoresceinados la cual se incrementó a las 24 horas post-tratamiento con la toxina A hasta un 65%, notándose un aumento del 23% con respecto de las células control (42.45%). Estas diferencias sin embargo, no se hicieron evidentes a tiempos posteriores (36 y 48 horas) aunque si se observó un incremento de 73.3 y 82.2% en la incorporación en células tratadas y del 77.5 y 90.1% en células no tratadas.

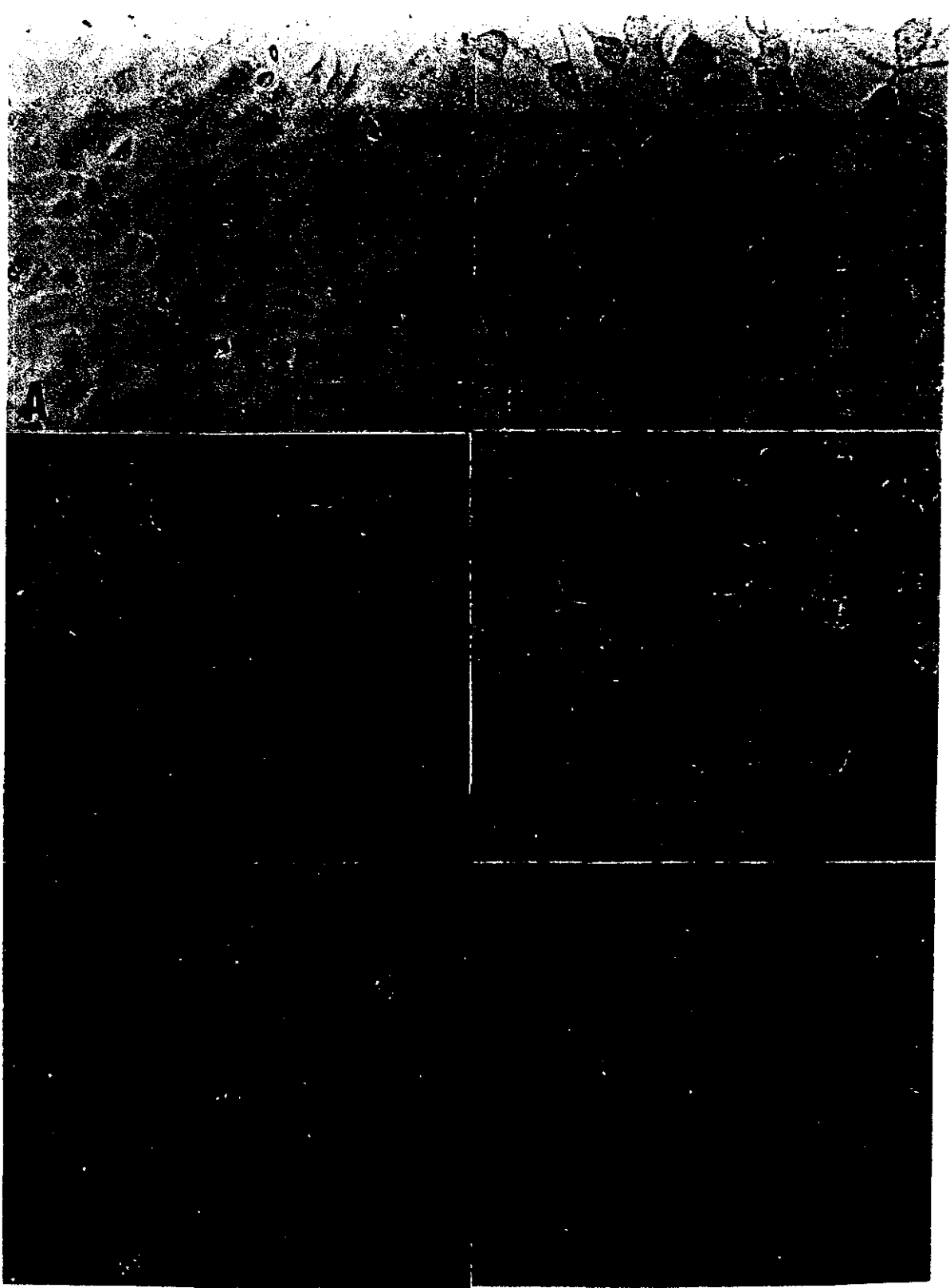


Fig 1. Morfología normal de las células IEC-18 (A), HRMC (C), y PMC (E) por microscopía de luz (20X). En las figuras B, D y F se observan tanto las PMC como las HRMC tratadas con 1 µg/ml de toxina A por 4 horas. Las células IEC-18 (B) mostraron pérdida de sus uniones, retracción citoplásmica así como redondeamiento en más del 95%, observándose esto último también en las HRMC (D), no observamos cambios morfológicos de importancia en las PMC (F).

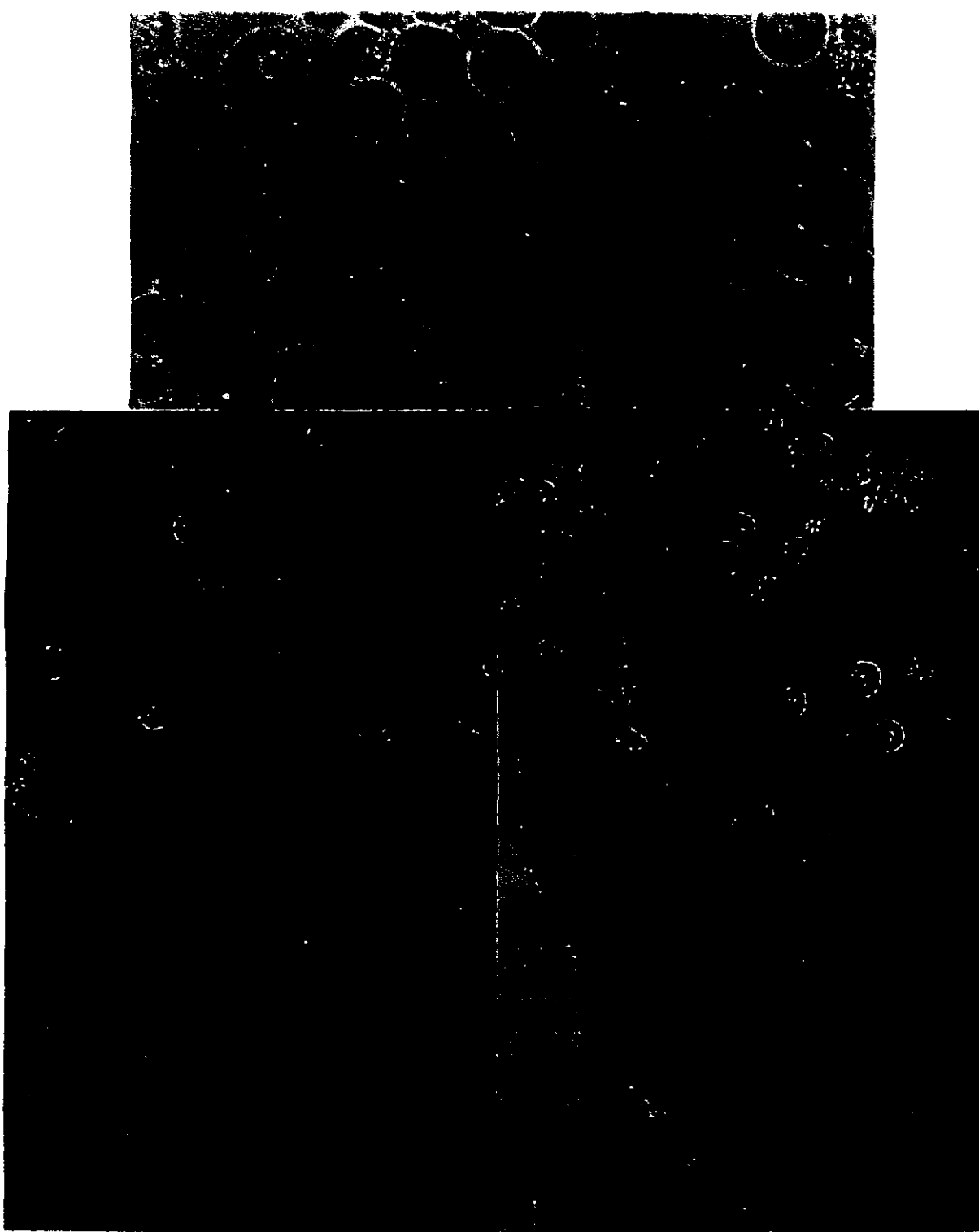


Fig 2. Morfología de las células IEC18, HRMC y PMC por microscopía de luz (20X) después de 24 horas de exposición a $1\mu\text{g/ml}$ de toxina A. En (A) se observan las células HRMC con ligero aumento de tamaño e inicio de vacuolización. En (B) observamos células PMC control con escasa degranulación y en (C) observamos PMC tratadas con la toxina, notándose un incremento en la granulación y conservación de su morfología normal. En (D) y (E) se observan las células IEC18 después de 12 y 24 horas de exposición a la toxina A notándose daño importante en la membrana celular sugestivo de un fenómeno de necrosis, con pérdida total de su morfología.

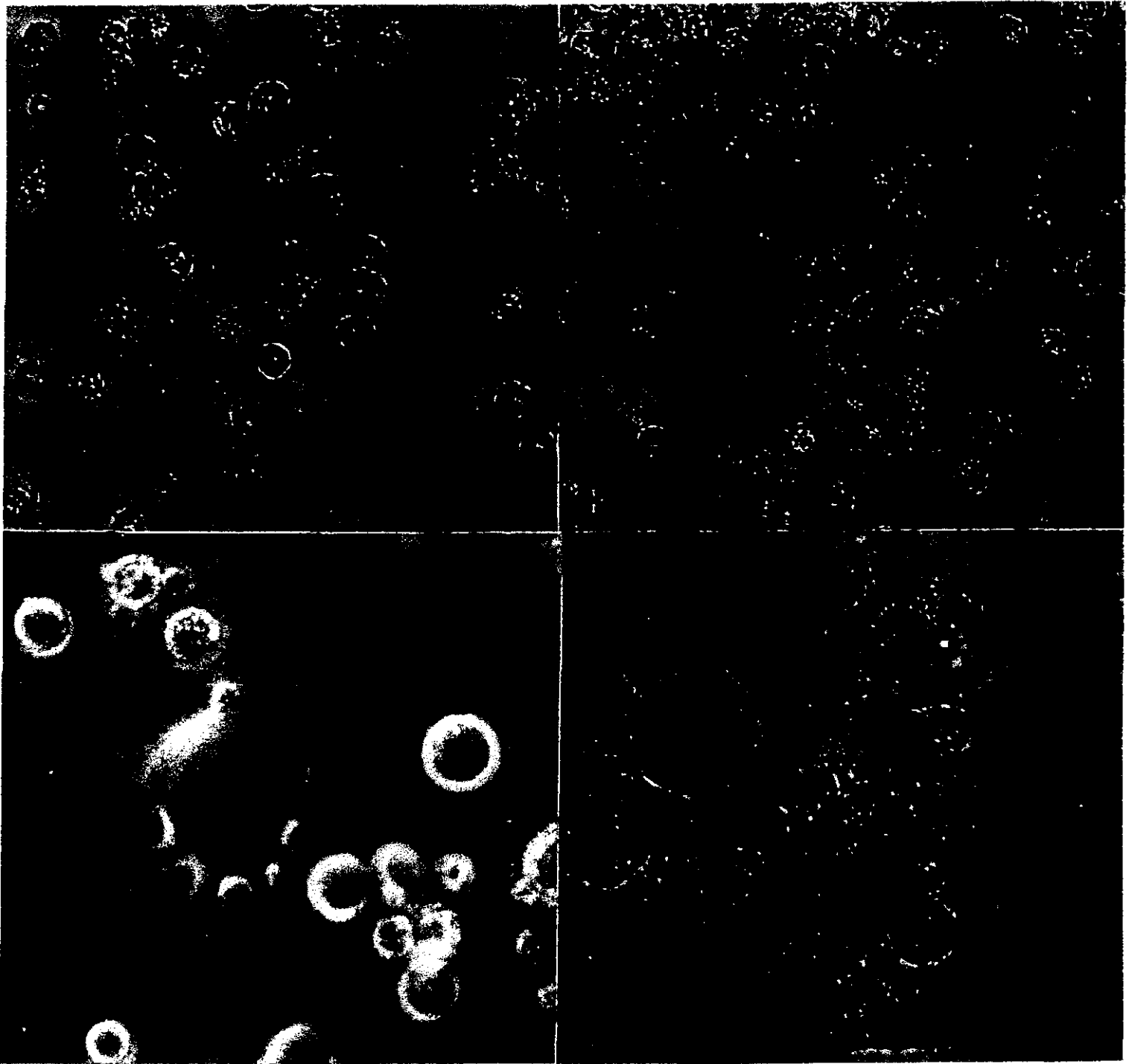


Fig 3. Células PMC y HRMC (20X) después de 48h de tratamiento con 1µg/ml de toxina A. En (A) observamos PMC control después de 48 horas de cultivo y en (B) PMC tratadas con la toxina, observándose disminución en su tamaño y aumento de la granularidad. En (C) y (D) se observan células HRMC tratadas con la toxina mostrando importante aumento de tamaño, arborescencias, vacuolas e inicio de procesos de fagocitosis.

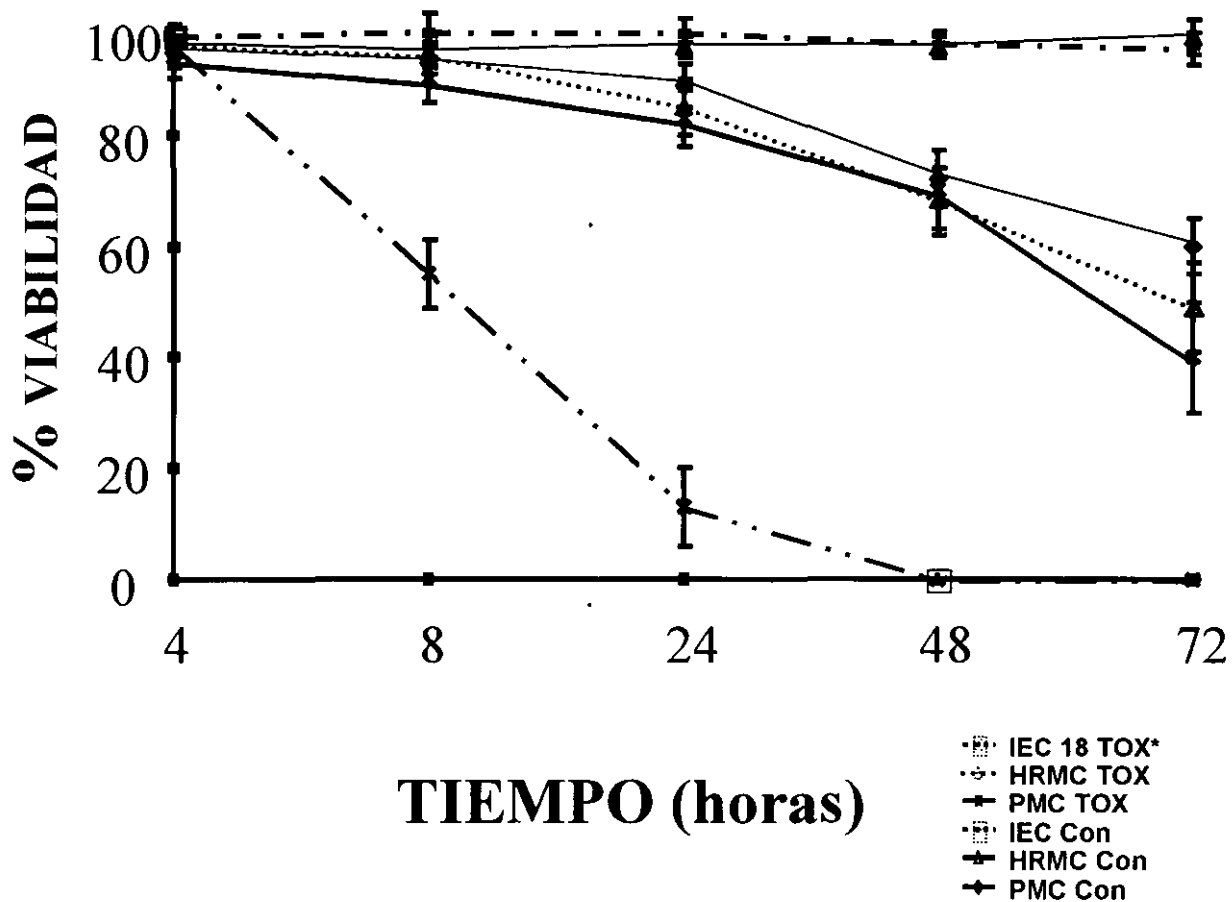


Fig.4 Porcentaje de viabilidad celular. Ensayos en células PMC, IEC18 y HRMC tratadas con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de toxina A por 4 horas. Las células control de las líneas celulares IEC18 y HRMC mantienen una viabilidad > al 95%. Las células IEC18 tratadas con la toxina A después de 24 h mostraron una viabilidad <20%, a diferencia de las HRMC tratadas que presentaron una viabilidad \approx del 50% a las 72 h post-exposición. En las PMC existe un decremento en la viabilidad tanto de las células control (65%) como en células expuestas a la toxina (40%).

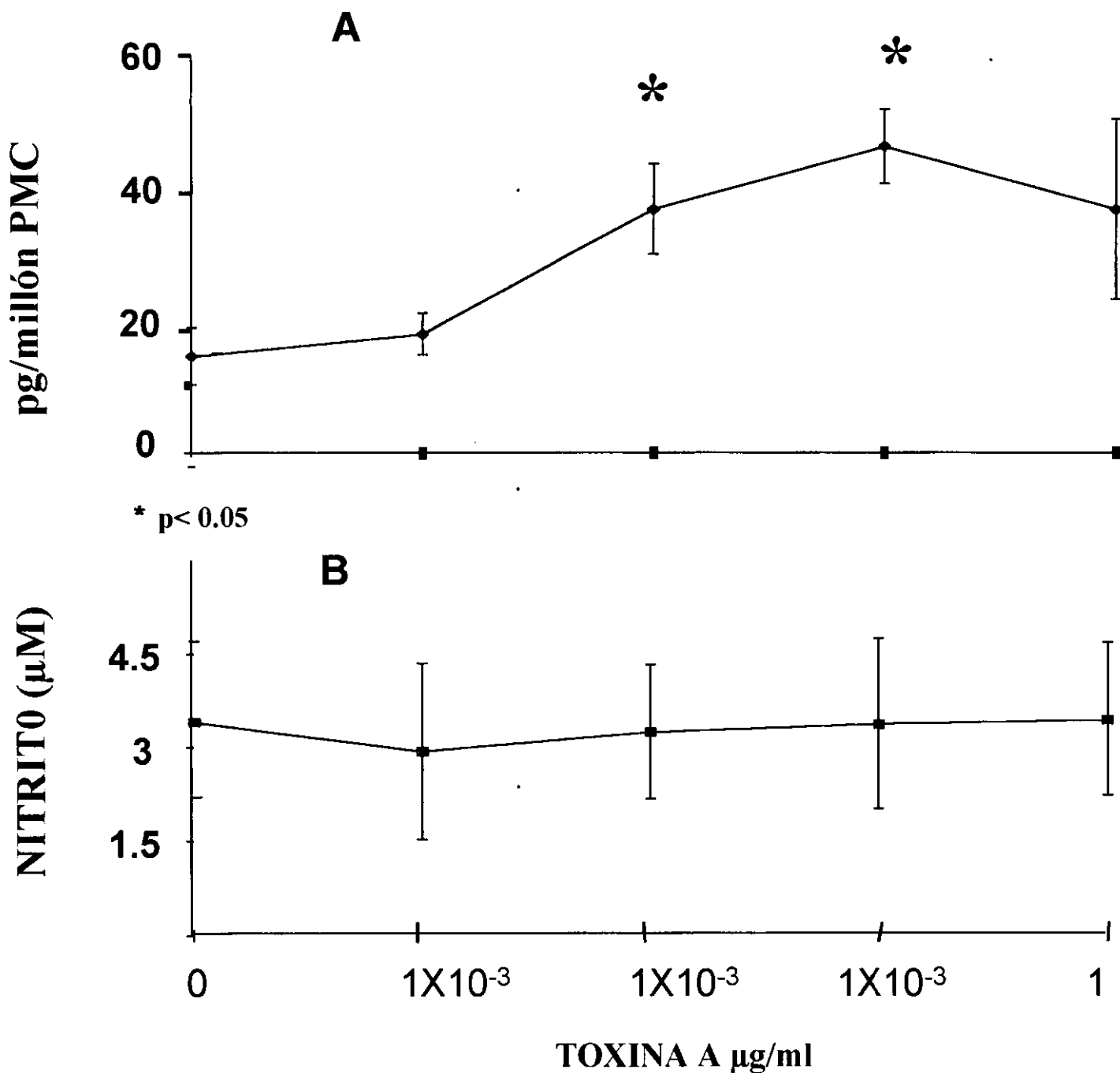


Fig. 5 Efectos de la toxina A de *C. difficile* en la producción de TNF α y NO por PMC. (A) Efectos en la liberación de TNF α en 2.5×10^4 PMC tratadas con diferentes concentraciones de toxina A por 4 h. Se observó, un incremento estadísticamente significativos $P < 0.05$, en la liberación de TNF con 0.01 y $0.1 \mu\text{g/ml}$ de toxina A. (B) Los ensayos para valorar el efecto de la toxina A en la producción de NO por las PMC no mostraron efecto $P > 0.05$ en la liberación de NO en presencia de la toxina. Los resultados mostrados son el promedio \pm SE de cinco experimentos.

% LIBERACION DE HISTAMINA

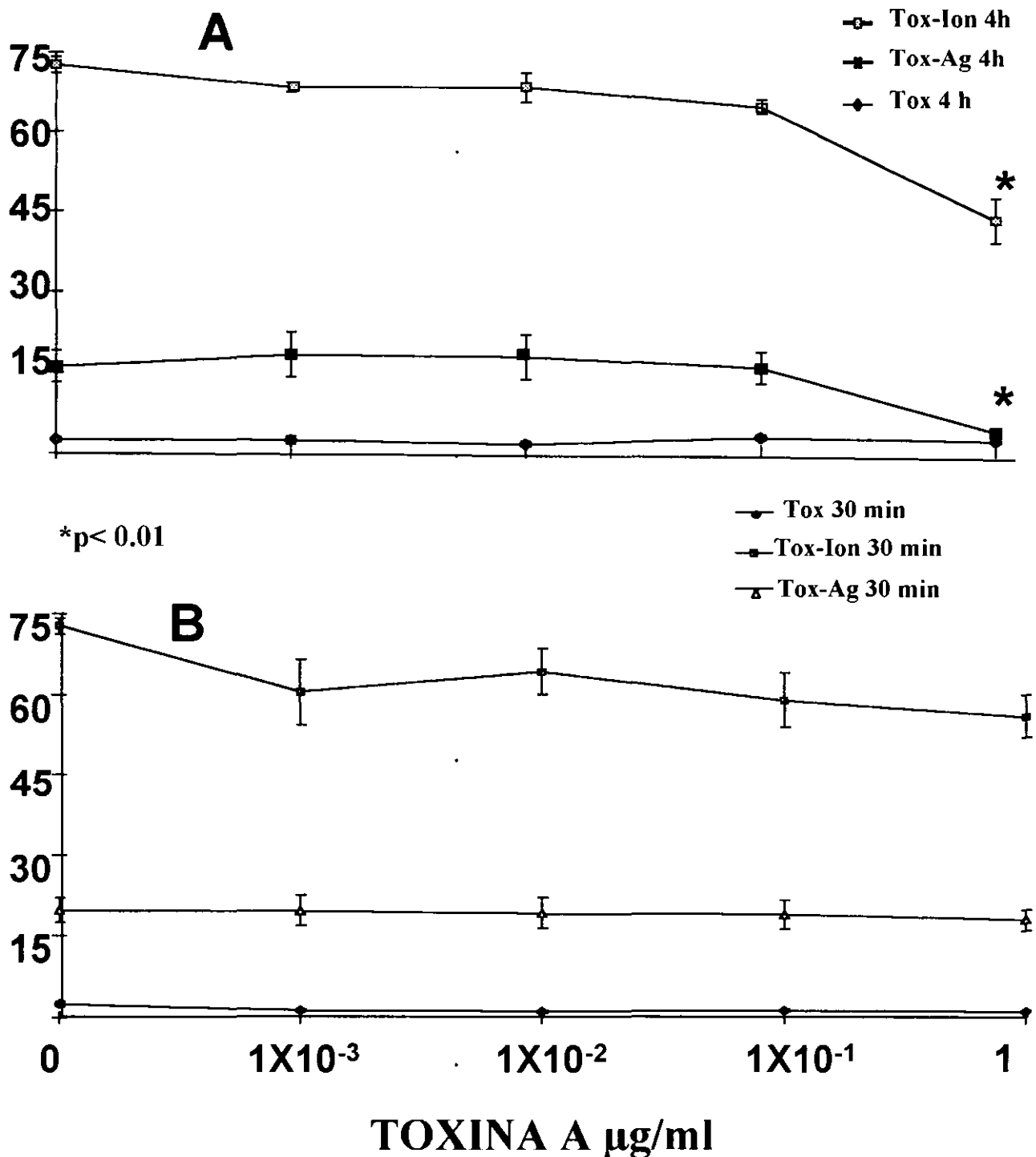
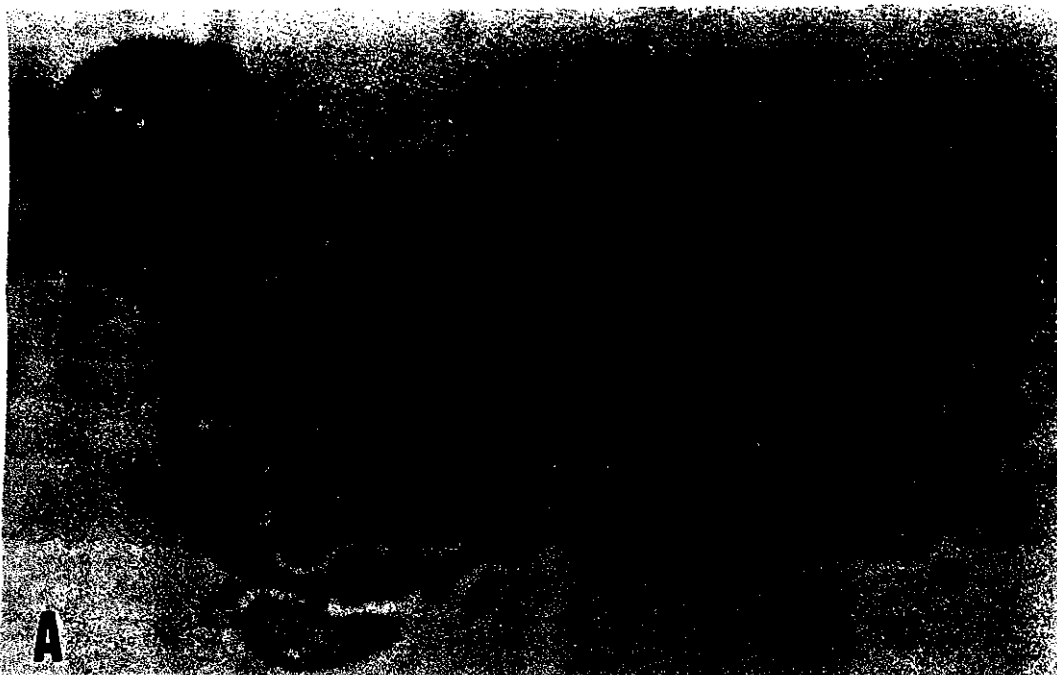
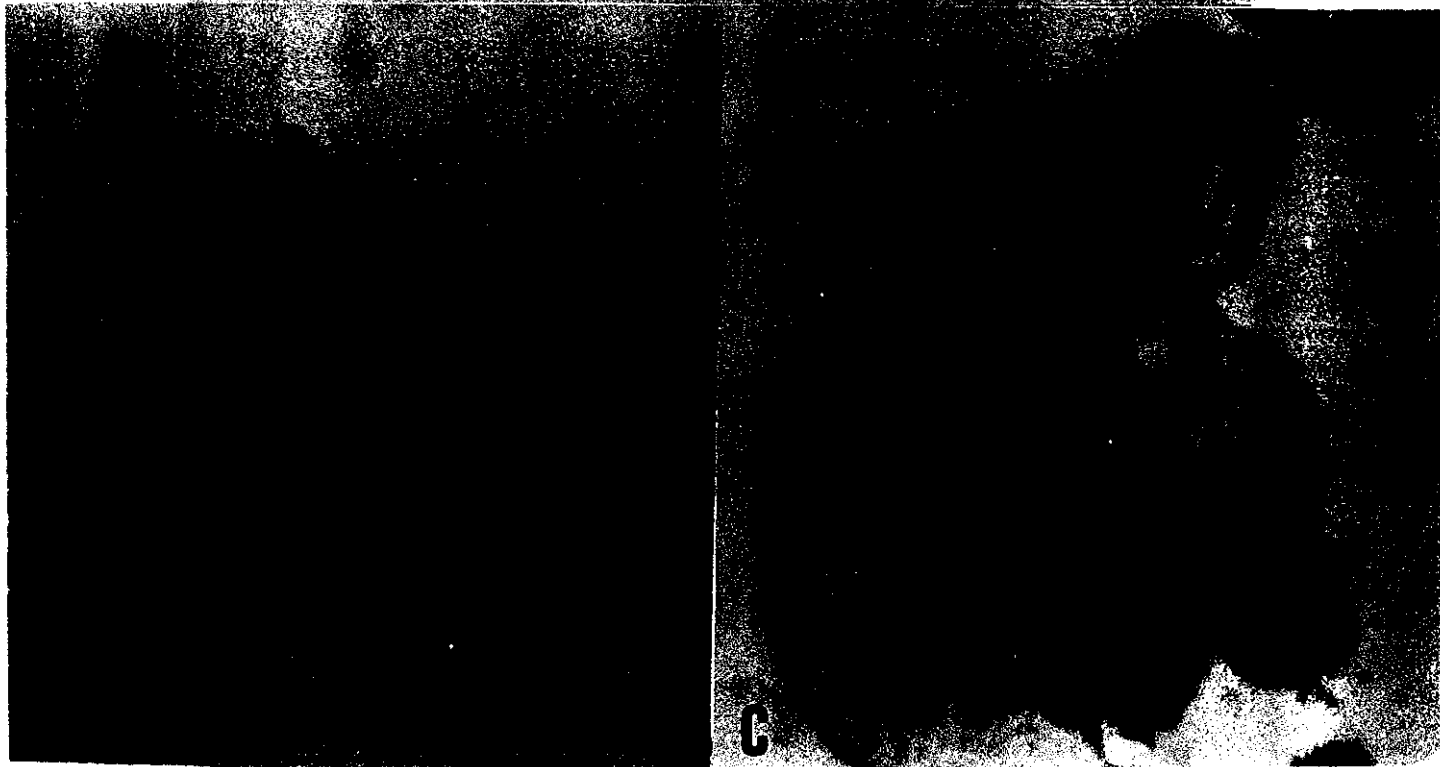


Fig. 6 Efecto de la toxina A de *C. difficile* en la liberación de histamina en células PMC. Los ensayos fueron realizados tratando a las PMC por 4 horas (A) o 30 min (B) con diferentes concentraciones de toxina A, en presencia o no de AgNb y/o ionóforo de calcio. Una inhibición significativa se observó en las células expuestas por 4 h a 1µg/ml de toxina en presencia de AgNb (77%) o de toxina más inóforo (41%) P<0.001. Sin embargo en las PMC expuestas por solo 30 min (B) no se encontró diferencia. Los resultados mostrados son el promedio de cinco experimentos ± SE.



A



C

Fig. 7 Cambios morfológicos observados en células HRMC tratadas con $1\mu\text{g/ml}$ de toxina A, mediante la técnica de cytospot (100X). En (A) observamos la morfología celular normal de las células HRMC, con la membrana citoplásmica íntegra, citoplasma granular basófilo y nucleos grandes pleomórficos que muestran cromosomas alargados con la cromatina bien distribuída y ligeramente acidófila. En (B), observamos las mismas células después 24 h de exposición a $1\mu\text{g/ml}$ de toxina A, con su membrana citoplásmica íntegra, retracción citoplásmica, presentando los núcleos cromatina condensada y basófila. Así mismo se observó la formación de células gigantes (C) con fragmentación nuclear, formación de cuerpos apoptóticos y fagocitosis.

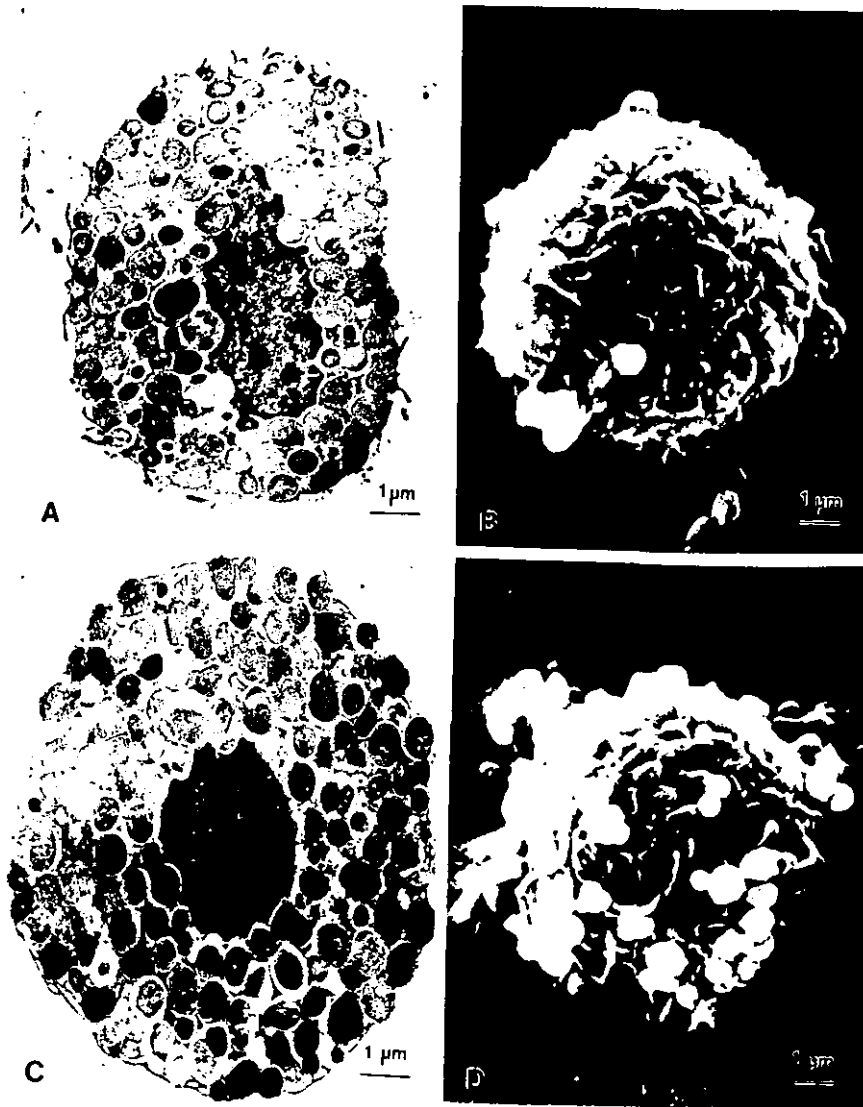


Fig 8. Cambios morfológicos de PMC inducidos por la toxina A de *C. difficile* analizados por microscopía electrónica. En (A) observamos células control y en (C) células tratadas con 1 $\mu\text{g/ml}$ de toxina por 4 horas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM); observándose en estas últimas la pérdida de sus microvellosidades, condensación de la cromatina y conservación de la integridad membranal. En (B) observamos células control y en (D) células tratadas con toxina A bajo las condiciones antes referidas, mediante microscopía electrónica de barrido (SEM); observándose en (D) importante pérdida de la organización normal de los gránulos, desorganización de la membrana celular, así como la posible formación de cuerpos apoptóticos.

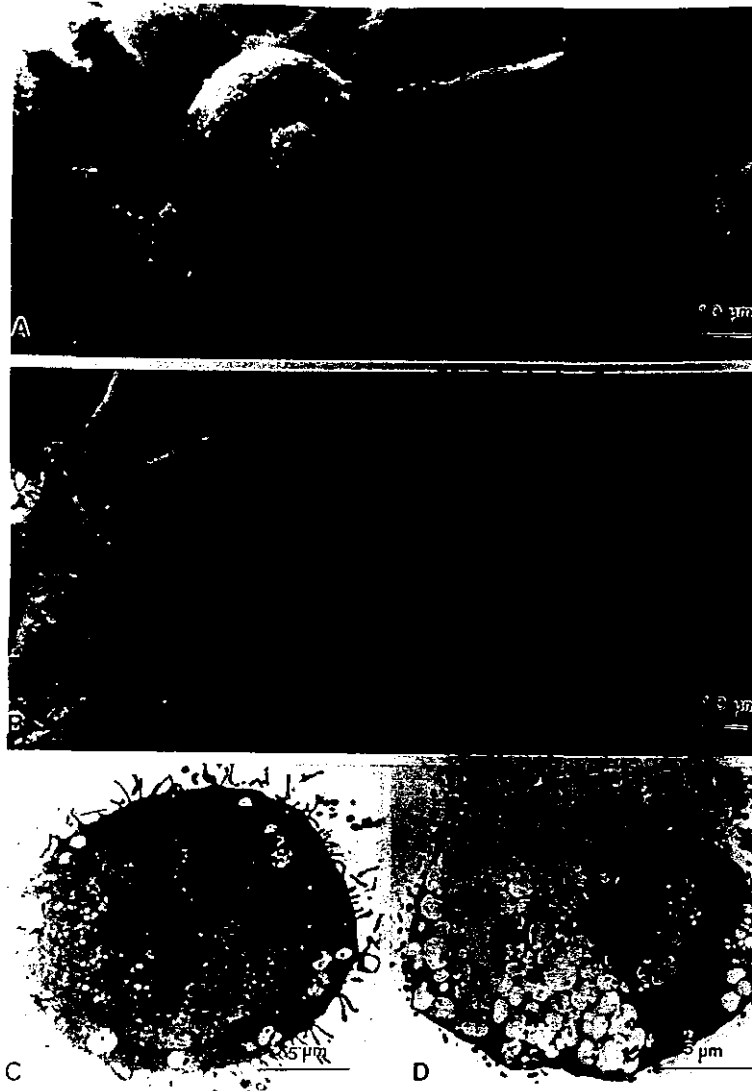


Fig 9. Cambios morfológicos en HRMC inducidos por la toxina A de *C. difficile* analizados por microscopía electrónica. En (A) y (B) observamos células control y células tratadas con 1 $\mu\text{g/ml}$ de toxina por 4 horas después de 24 h de iniciado el tratamiento mediante microscopía electrónica de barrido (SEM); las células tratadas (B) con la toxina mostraron importantes alteraciones morfológicas como redondeamiento, arborescencia y formación de cuerpos apoptóticos. En (C) y (D) observamos a las células control y tratadas de acuerdo a las condiciones antes mencionadas, observándose en estas últimas (D), pérdida de sus microvellosidades, condensación de la cromatina e importante vacuolización así como, conservación de la integridad membranal.

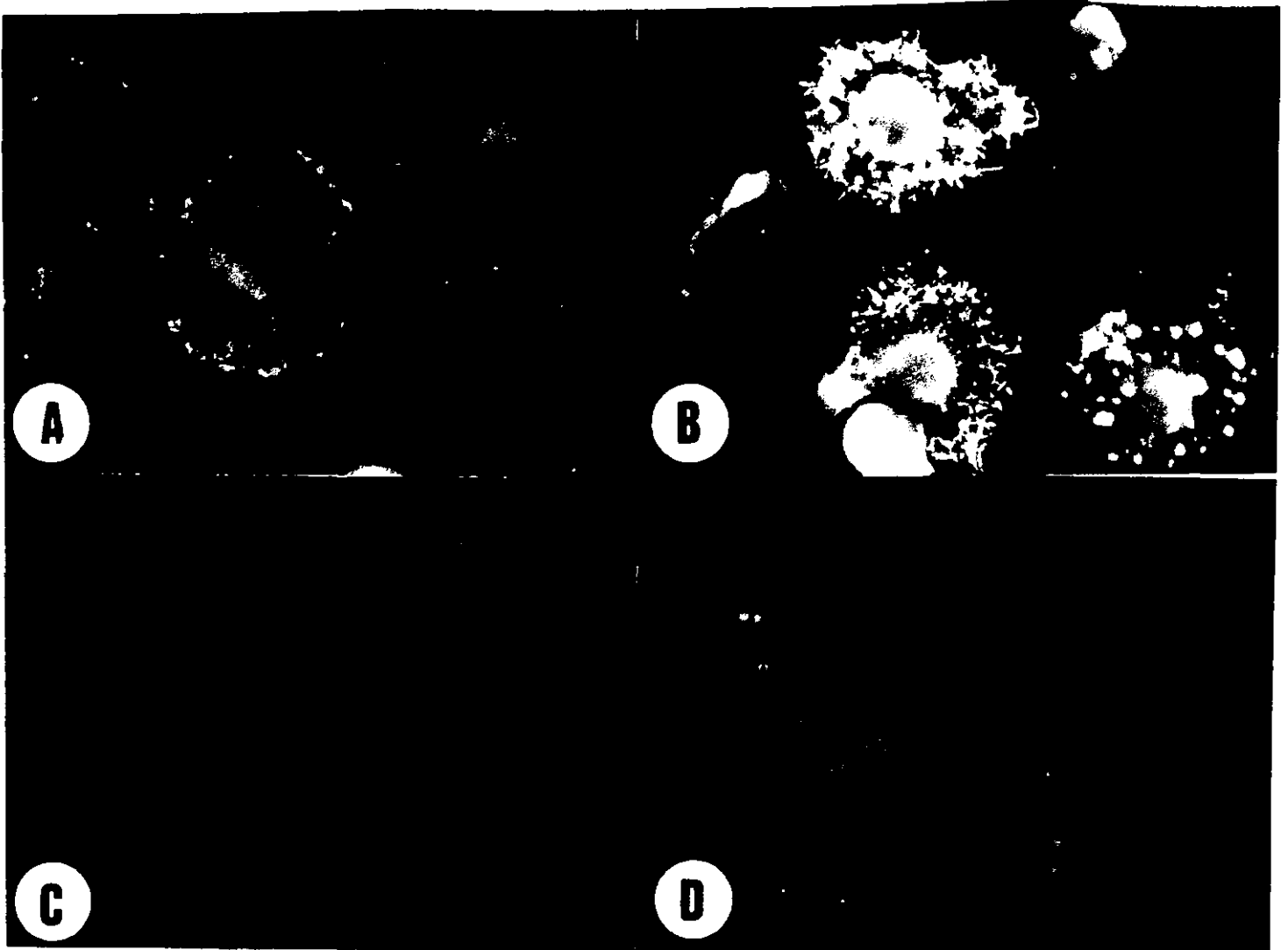


Fig 10. Alteraciones sobre citoesqueleto de PMC inducidas por la toxina A de *C. difficile* (100X). En (A) y (C) se observa la distribución normal del citoesqueleto de actina y tubulina en células control. En (B) se observan las alteraciones causadas por 1µg/ml de toxina A por 4 horas sobre los filamentos de actina; observándose la formación de depósitos densos en citoplasma así como retracción membranal. En (D) se observan las alteraciones sobre los filamentos de tubulina, con rearreglos y formación de depósitos perinucleares.

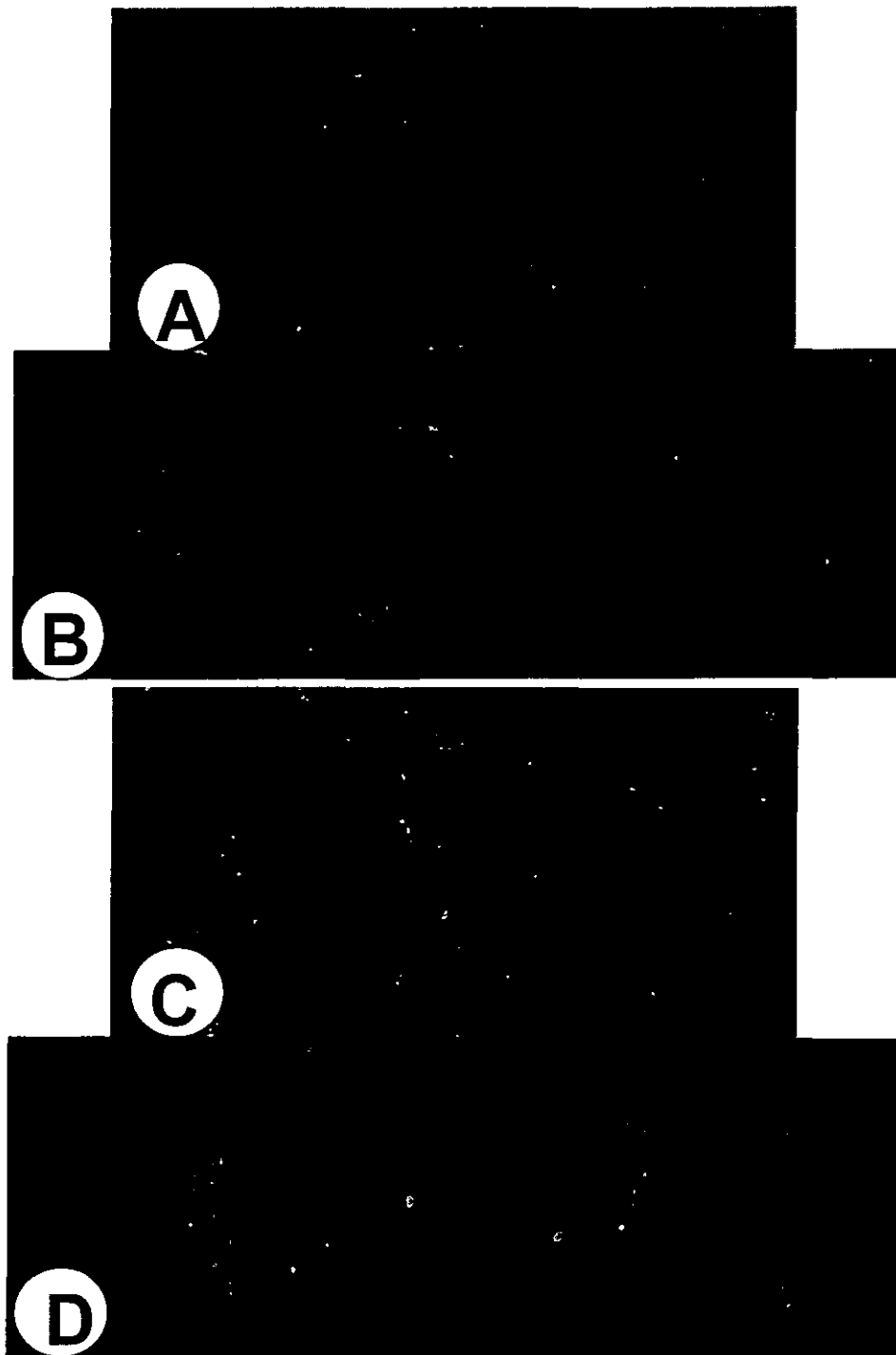


Fig 11. Alteraciones sobre el citoesqueleto de HRMC inducidos por la toxina A *de C. difficile* (100X). En (A) y (C) se observa la distribución normal del citoesqueleto de actina y tubulina en células control. Las células fueron tratadas con 1µg/ml de toxina A por 4 h. En (B) observamos retracción de los filamentos de actina con formación de depósitos perinucleares, en (D) observamos condensación citoplásmica de los filamentos de tubulina con formación de depósitos densos.

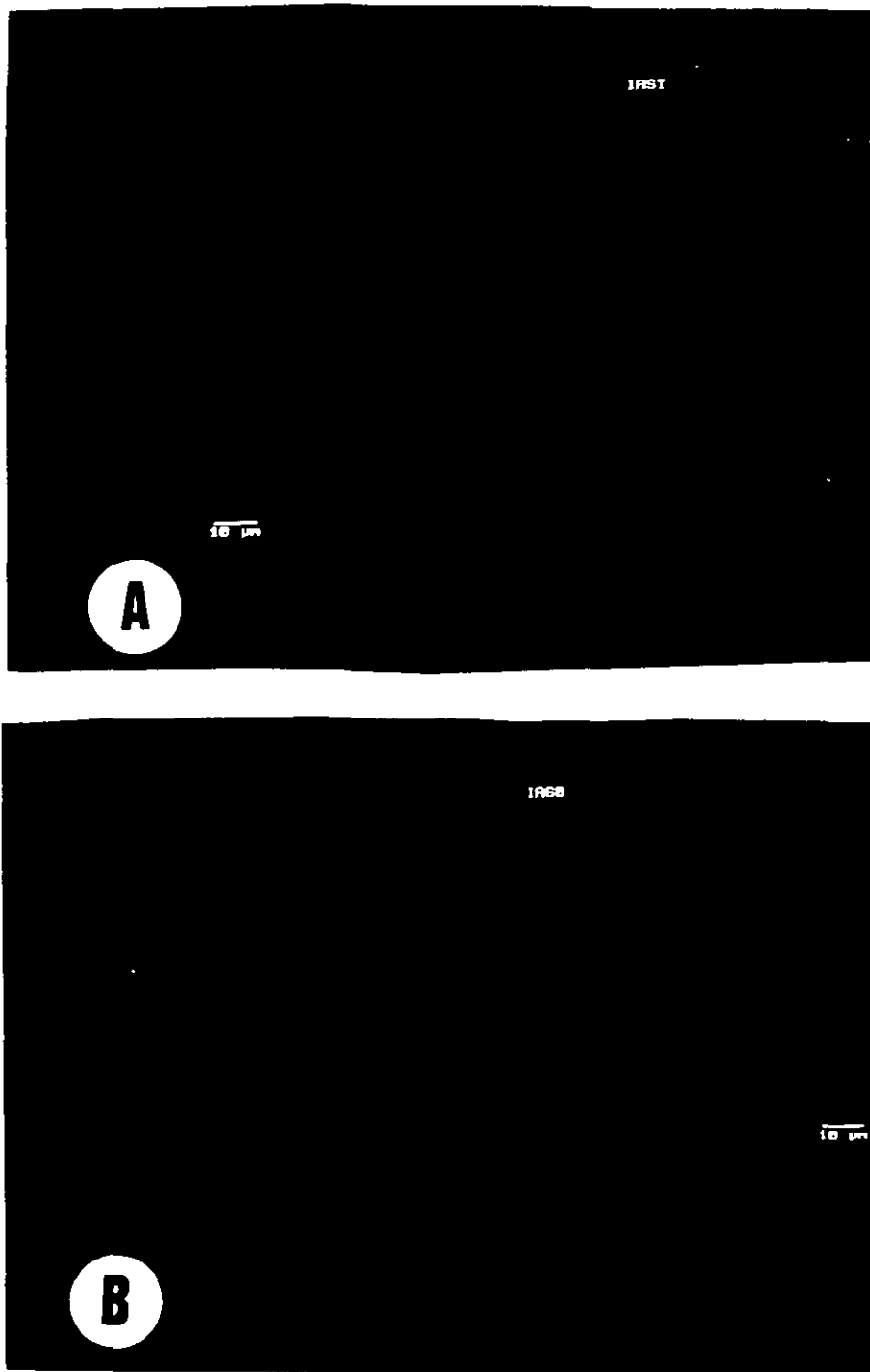


Fig 12. Efecto de la toxina A de *C. difficile* en el citoesqueleto de actina de células IEC18 (100X). (A) Distribución del citoesqueleto de actina en células control. (B) Alteraciones en los microfilamentos de actina en células tratadas con 1μg/ml de toxina A por 4 h; observándose disrupción de las uniones celulares y ruptura de la membrana plasmática y desarreglo importante del citoesqueleto.

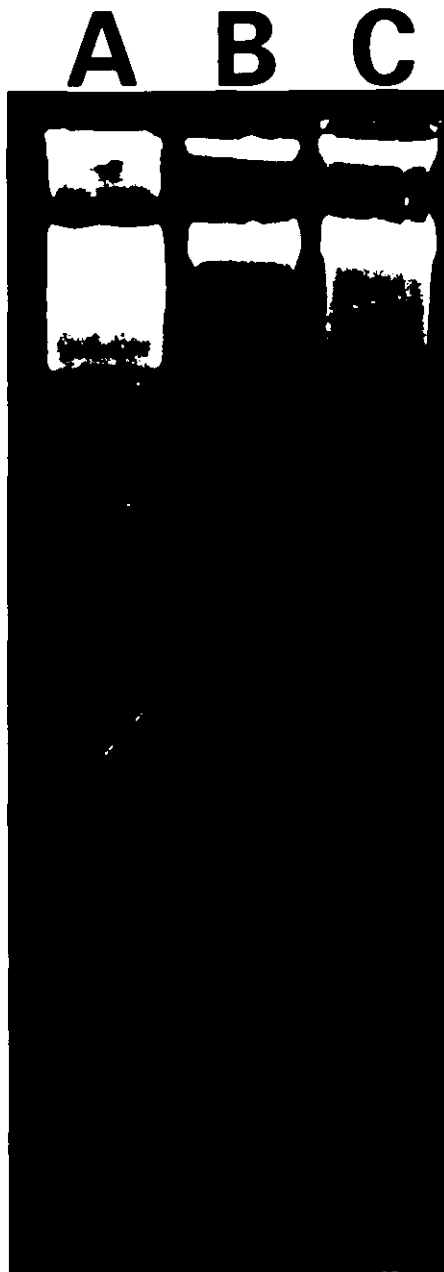


Fig 13. Análisis electroforético del DNA fragmentado de PMC tratadas con toxina A (1 μ g/ml por 4 h). Carril A, estándar de peso molecular de 123-pb. Carril B, DNA obtenido de PMC control. Carril C, DNA obtenido de PMC después de 24 h de iniciada la exposición a la toxina A.

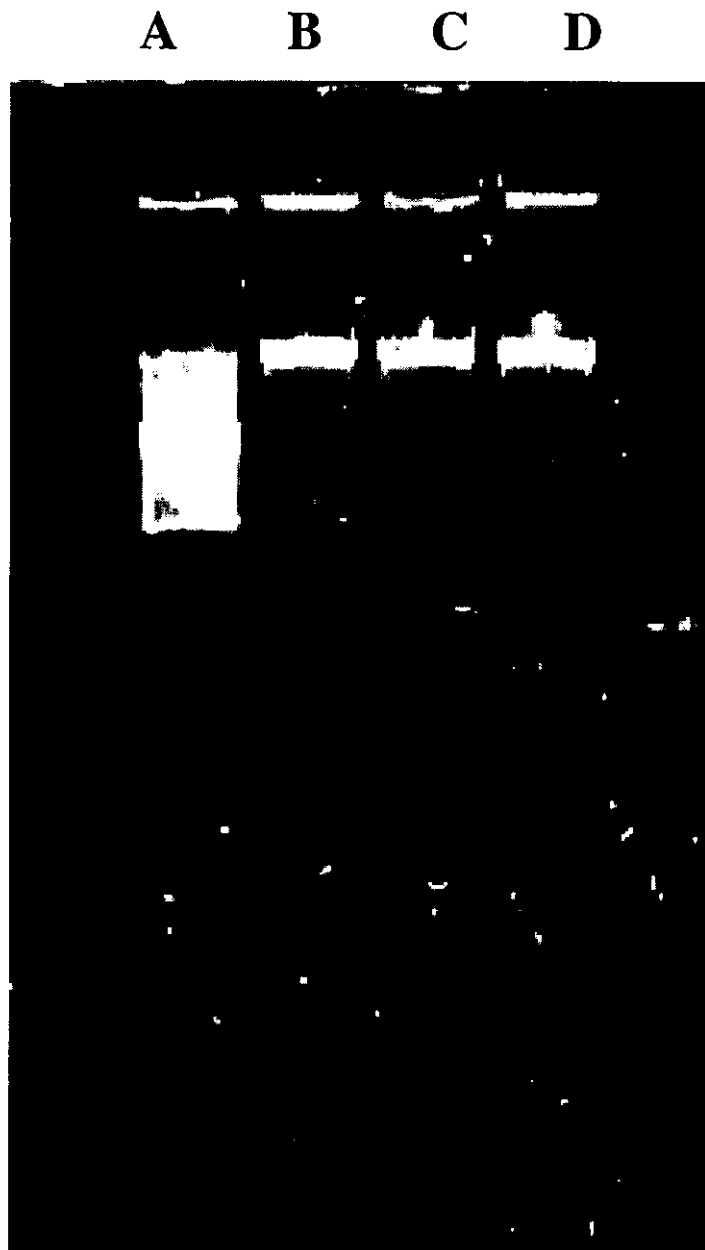


Fig 14. Análisis electroforético de DNA fragmentado de HRMC tratadas con toxina A ($1\mu\text{g}/\text{ml}$ por 4 h). Carril A, estándar de peso molecular de 123 pb. Carril B, DNA obtenido de HRMC al inicio del tratamiento con la toxina A. Carril C, DNA obtenido de HRMC después de 24 h de iniciada la exposición a la toxina A y carril D, DNA de HRMC sin tratamiento con la toxina.

% DNA FRAGMENTADO

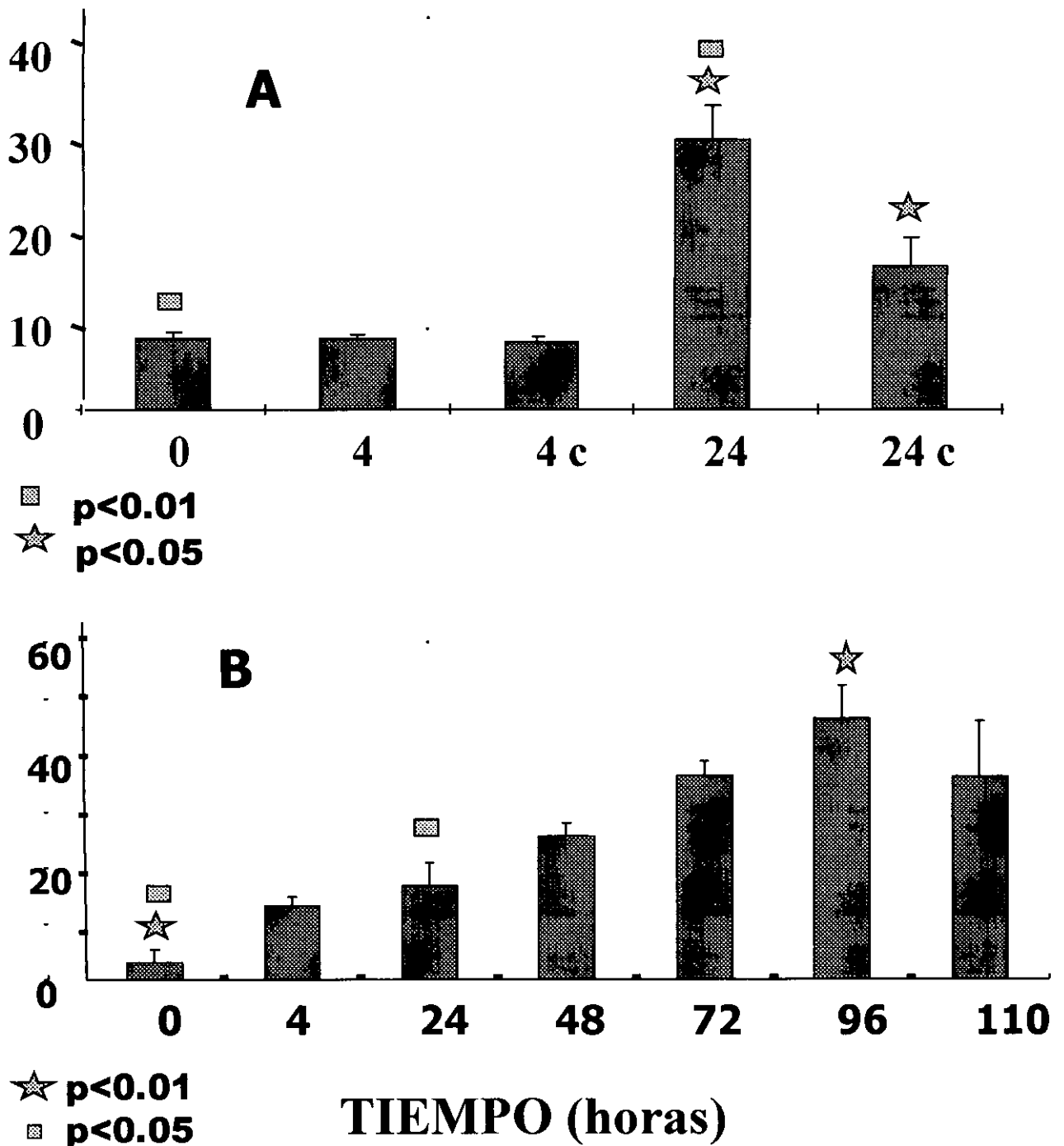


Fig.15 Porcentaje de DNA fragmentado en células cebadas expuestas a 1µg/ml de toxina A. En (A) observamos PMC tratadas con la toxina A y el incremento en el porcentaje de DNA fragmentado, con una diferencia significativa P<0.01 a las 18 hs y con una P< 0.05 a las 24 hs con respecto al control. En (B) se observa el efecto de la toxina A en las HRMC, en las cuales se encontró una diferencia significativa con respecto al control desde las 24 hs con una P<0.05 y a las 96 hs con una P<0.01. Los resultados mostrados son el promedio ± SE de tres experimentos.

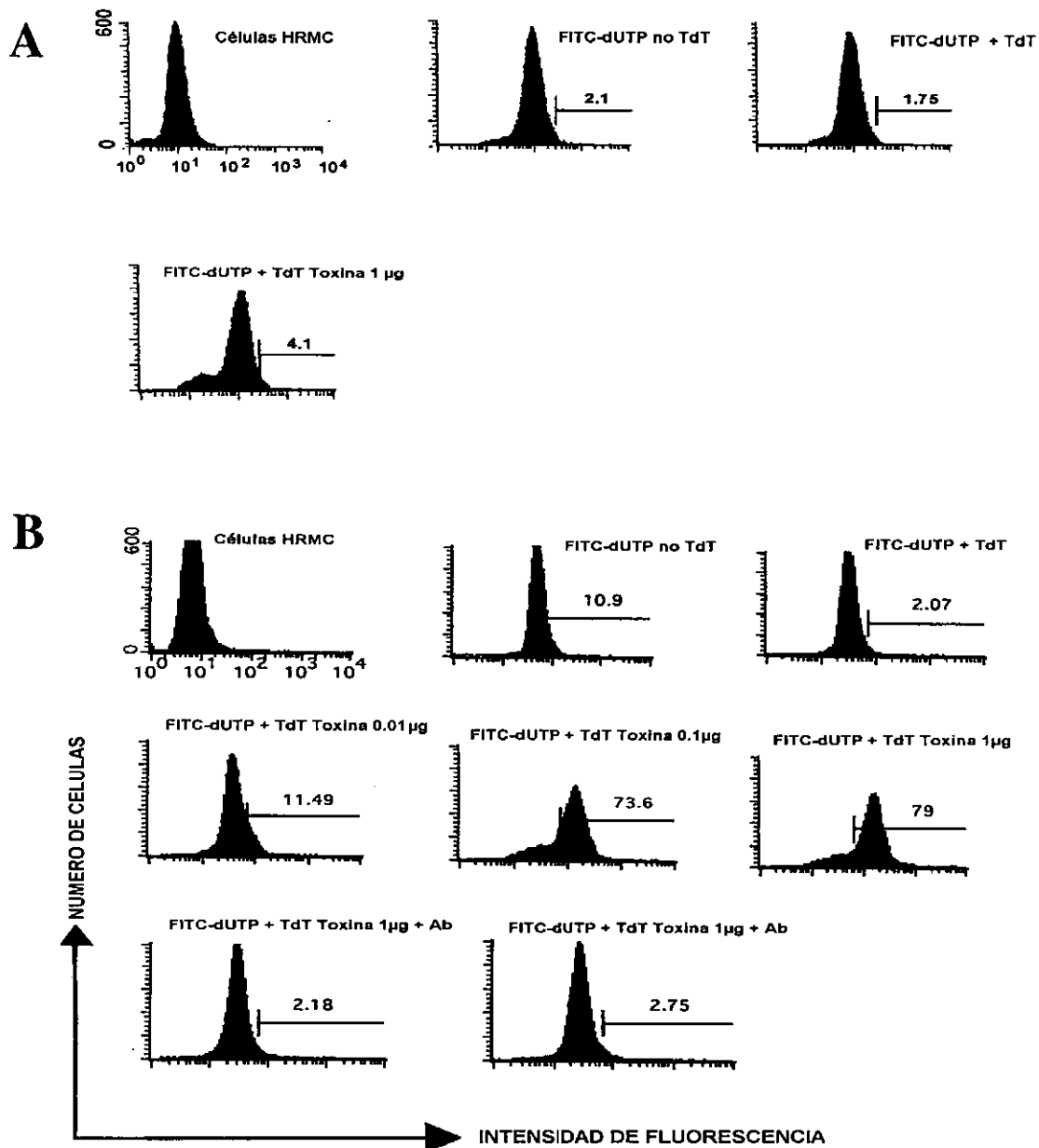


Fig 16. Identificación de células HRMC en apoptosis mediante la técnica de TUNEL. A. Se analizaron HRMC tratadas con 1 µg/ml de toxina A de *C. difficile* por 4 h, observándose una incorporación del 4.1 %. Las células con FITC-dUTP con o sin TdT se tomaron como control. B. Se analizaron HRMC tratadas con diferentes concentraciones de toxina A por 4 h (0.01, 0.1 y 1 µg/ml) y se incubaron por 20 h post-tratamiento. Se observó que con 0.1 y 1 µg/ml de toxina, las células presentaron más de un 70% de incorporación de fluoresceína, mientras que las células tratadas con 0.01 µg/ml mostraron un 11% de incorporación. Las HRMC tratadas con 1 µg/ml de toxina más anticuerpos anti-toxina A inhibieron completamente el fenómeno.

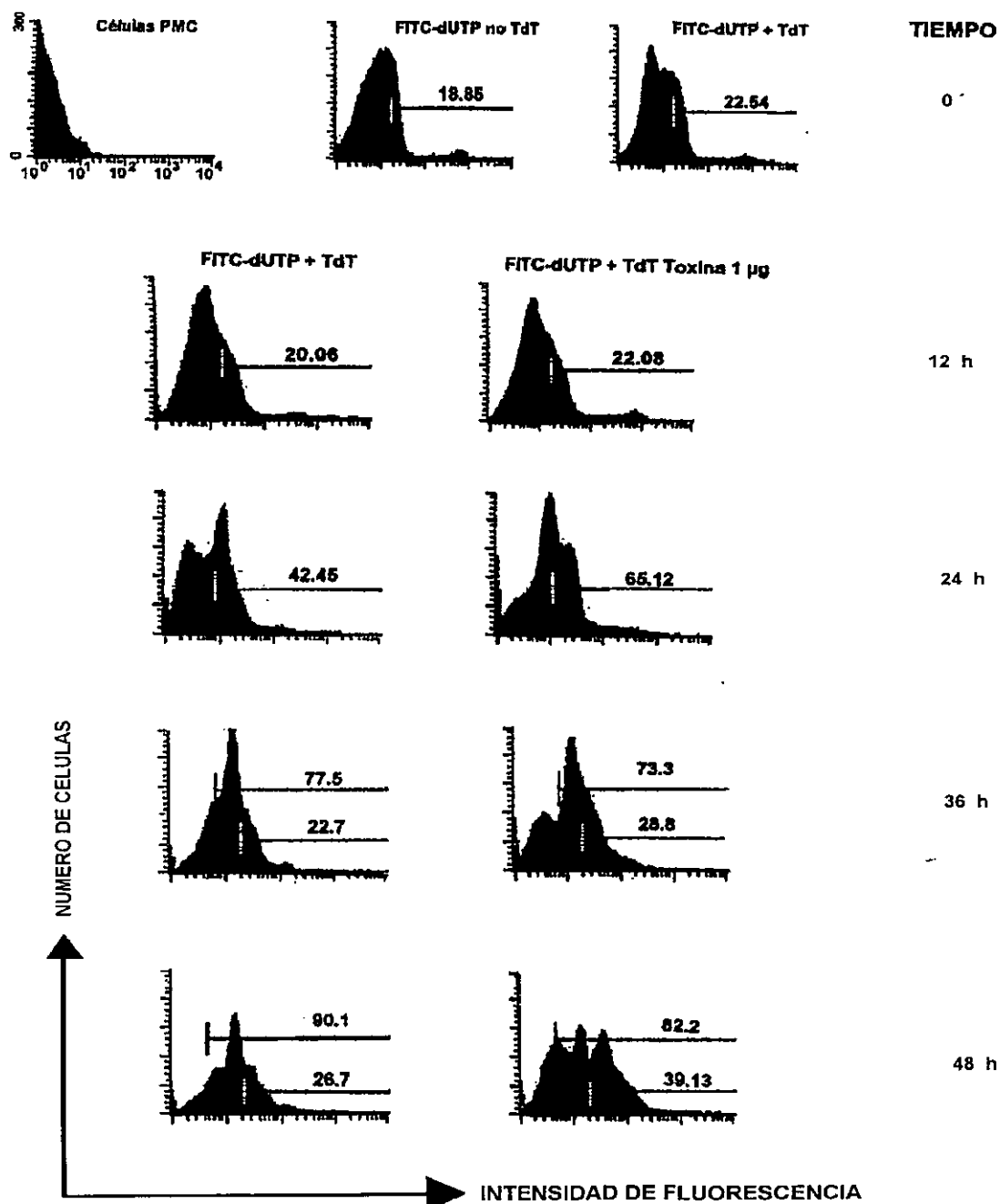


Fig 17. Detección de apoptosis en células PMC mediante la técnica de TUNEL. Las células PMC fueron tratadas con 1 µg/ml de toxina A y se evaluó la incorporación de dUTPs fluoresceinados (FITC-dUTP) a diferentes tiempos. Las células control (FITC-dUTP + TdT) muestran valores mas bajos a las 24 h(42 vs 65%) que las tratadas con toxina. No observándose diferencias a tiempos posteriores.

IX) DISCUSION

En la enterocolitis experimental, la toxina A de *C.difficile* causa inflamación severa y necrosis de la pared intestinal; sin embargo, no se sabe con precisión como participan las células que median los procesos inflamatorios. Se ha demostrado, que tanto en la lámina propia como en la mucosa intestinal, se encuentra una amplia variedad de células inmunes incluyendo las células cebadas, macrófagos y polimorfonucleares las cuales participan en procesos inflamatorios. En el caso particular de las células cebadas, se les ha relacionado, con el daño inducido por la toxina A a nivel intestinal (34,36,37,39,95).

Las células cebadas son una importante fuente de mediadores de la inflamación por lo que se han relacionado con las alteraciones inducidas por la toxina A de *C.difficile* (92,93,95,98). Diversos estudios (95,96,98) han demostrado en el modelo de asa ileal de rata, que la toxina A causa liberación de mediadores de la inflamación como la proteasa II de células cebadas, el factor activador de plaquetas (PAF) y leukotrienos. Así mismo, se ha reportado que pacientes con colitis por *C.difficile* presentan un incremento de la prostaglandina E2, prostaglandina F2, tromboxano y en el receptor de la sustancia P, observándose además en casos severos un incremento de leucotrieno B4 (92,103). Fármacos como el ketotifén (estabilizador de las células cebadas), histaminasas y antagonistas específicos de la sustancia P, pueden disminuir el proceso inflamatorio y la secreción de mediadores liberados por las células cebadas (94,95). Sin embargo, la activación directa de éstas células por la toxina A no se ha demostrado, tampoco se sabe con precisión el blanco intracelular de la toxina ni el efecto en la viabilidad de las células cebadas. De tal forma, es importante notar que aunque existen evidencias de la participación de las células cebadas en la enterocolitis y colitis pseudomembranosa secundarias a la acción de la toxina A, no existe ninguna prueba directa de las acciones de la toxina sobre estas células. Por lo tanto, nuestros resultados demuestran por primera vez que la toxina A de *C.difficile* no es capaz de inducir por sí misma en un modelo *in vitro*, la liberación de histamina o de NO en células cebadas. Aún más, en el caso de histamina la toxina A inhibe su liberación hasta en un 70% tanto en sistemas dependientes

ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

como independientes de IgE. Esto contrasta con los estudios realizados en el modelo animal (93,95,98) donde se ha observado, liberación de mediadores de la inflamación y degranulación de las células cebadas inducidas por esta toxina. Lo anterior sugiere por lo tanto, que podrían existir vías indirectas para activar a estas células. En ese sentido, Goyal y cols (96) han propuesto un modelo que podría explicar una activación indirecta de las células cebadas por la toxina. En este modelo, se sugiere que los enterocitos dañados por la toxina A, podrían liberar moléculas estimuladoras de las neuronas aferentes primarias para secretar sustancia P y de esta forma, activar a las células cebadas de mucosa intestinal, produciendo degranulación y liberación de mediadores de la inflamación. Además, no deben descartarse otras vías de activación, ya que los factores C3a y C5a del complemento, el factor de crecimiento de células estaminales (SCF) y otras linfocinas producidas por las células vecinas, pueden activar a las células cebadas. Nuestros resultados apoyan la posible existencia de estas vías alternas de activación o al menos el requerimiento de factores liberados *in vivo* ya que la toxina no puede activar directamente *in vitro*, a estas células para que ocurra la liberación de histamina y NO.

Sabemos que en la degranulación de las células cebadas por activación de los FcεRI influyen el receptor de antígeno, el flujo de Ca⁺⁺, la cascada de cinasas y las proteínas G (40). Algunas toxinas bacterianas actúan sobre las células cebadas. De acuerdo a lo reportado con la toxina de pertussis en un modelo murino (89,91), esta toxina inhibe la liberación de histamina en las células cebadas en un proceso dependiente de IgE, actuando principalmente sobre la fosfolipasa A₂, que interviene con el metabolismo del ácido araquidónico y sobre las proteínas G produciendo una ADP-ribosilación que bloquea la capacidad de las proteínas G para interactuar con receptores específicos (41,89). En nuestro modelo sin embargo, demostramos que la toxina A inhibe la liberación de histamina en presencia o ausencia de antígeno y más aún en presencia del Ionóforo A23187. En el caso de la toxina A también sabemos que actúa sobre proteínas G y en proteínas de unión a GTP, produciendo una monoglucosilación (31). En las proteínas de unión a GTP, específicamente, la toxina A actúa sobre Rac y Rho

que regulan el citoesqueleto celular (28,29). En las células cebadas se ha demostrado que estas proteínas participan en la regulación de los procesos de exocitosis y secreción (107,108,109). Por lo tanto, podemos considerar que la inhibición en la liberación de histamina, podría ser el efecto de una alteración de las proteínas reguladoras de citoesqueleto, afectando los procesos de exocitosis. Además una alteración directa sobre las proteínas G, como en el caso de pertussis podría también inducir una inactivación subsecuente de las vías de síntesis de esta amina.

Sin embargo, al contrario de lo ocurrido con la liberación de histamina, concentraciones de 0.1 µg/ml de toxina A de *C.difficile* indujeron *in vitro* la secreción de TNF α en células cebadas de peritoneo. Como ya ha sido previamente reportado (66), existen al parecer diferentes vías de síntesis y posiblemente diferentes vías de activación de histamina y TNF α , hipótesis que apoyan nuestros resultados. Aunque en ambos casos, la activación puede ser mediada por antígeno o independiente de IgE, la vía de síntesis de ambas moléculas es diferente. El papel del TNF α en las infecciones y choque séptico ha sido ampliamente documentado (68,69), se ha observado que en respuesta al LPS se induce su secreción así como de otras citocinas. Sin embargo su efecto no es solo deletéreo ya que en el caso de algunos patógenos como *Listeria*, *Klebsiella* y *Salmonella* puede tener un papel para limitar la infección (69). El TNF a nivel intestinal causa necrosis de las células epiteliales, inhibe la motilidad gástrica (158) e induce una importante migración de neutrófilos hacia el sitio de la inflamación (69). Además la liberación de otros factores quimioatrayentes por las células cebadas en presencia de la toxina A son la IL-8 y la IL-6, cuya liberación puede ser promovida por el TNF α y la IL-1 β . Nuestro trabajo es el primer estudio que demuestra que una enterotoxina bacteriana puede causar la liberación de TNF α por las células cebadas, hecho de importante relevancia, ya que no solo sabemos por estudios previos que estas células pueden modular la respuesta a ciertas infecciones bacterianas (69,159), regulando el reclutamiento de neutrófilos hacia los sitios de inflamación. Es importante notar que en contraste con otras células como macrófagos, las células cebadas sintetizan de novo y almacenan

TNF α en sus gránulos. Nuestros resultados relacionan la acción de la toxina A sobre la liberación del TNF α sintetizado de novo, ya que se retiró el TNF α preformado que se pudo liberar, al retirarse la toxina post-incubación de 4 horas con las células cebadas. Considerándose por lo tanto, que el curso del experimento (30 h) no nos permite evaluar la liberación de gránulos de TNF α post-activación, sino del TNF α que se sintetiza y se libera de los gránulos de las células dañadas por la toxina. En base a todos estos antecedentes consideramos que, posiblemente *in vivo* después de la exposición a la toxina A, las células cebadas pueden liberar inmediatamente TNF α preformado y así participar en la fase temprana de la reacción inflamatoria intestinal que se observa en la colitis pseudomembranosa. Consideramos importante enfatizar, que el daño inducido por la toxina A se pudiera incrementar por la acción del TNF, ya que como mencionamos anteriormente las células cebadas pueden almacenarlo aunque esto en concentraciones mínimas ya que solo un 10% se libera en una sola activación, siendo una estimulación constante la que induce mayor síntesis y secreción

El óxido nítrico es otra molécula efectora liberada por las células cebadas activadas (160) que se encuentra involucrada en la fisiopatogenia de la enterocolitis por la toxina A. Así por ejemplo, Qiu y cols (161) han demostrado que el NO inhibe la enterotoxicidad de la toxina en intestino de rata, sin embargo en nuestro modelo no encontramos estimulación de la síntesis ni efecto en la secreción *in vitro* de NO en presencia de diferentes concentraciones de toxina. Estos resultados pueden relacionarse con alteraciones en el metabolismo de la L-arginina que es un precursor de la síntesis de NO en las células cebadas y que podría estar afectada por la toxina A. De acuerdo a nuestros resultados, sería importante analizar los cambios inducidos por la toxina en ésta vía metabólica en células cebadas. Por lo tanto consideramos que el NO pudiera provenir *in vivo* de otras células como macrófagos o células endoteliales que podrían liberarlo a nivel local y esta molécula actuar como mecanismo de defensa o potenciando la citotoxicidad provocada por el TNF α . Desconocemos cual es la fuente real de la molécula, pero su participación es muy importante en la producción del proceso

inflamatorio inducido por la toxina A de **C. difficile**, por lo que estudios posteriores para dilucidar su síntesis y secreción serían de gran utilidad.

Aunque la capacidad *in vitro* de la toxina A para activar a las células mediadoras de la inflamación ha sido estudiada, la penetración de la toxina desde el lumen intestinal es aun controversial, debido al tamaño de la molécula activa (aproximadamente 300 kDa). Para conocer sus mecanismos de acción una probable explicación, es que las células epiteliales o enterocitos que entran en contacto por primera vez con la toxina A de **C.difficile**, sufren un daño muy importante por acción de la toxina provocándoles necrosis. El epitelio así dañado puede entonces permitir el paso de toxina hacia la lámina propia y a la mucosa intestinal, en donde las moléculas liberadas por las células dañadas y por la misma toxina, alteran a las células residentes. Aunque las concentraciones de toxina A liberadas en el lumen intestinal pueden variar y se desconocen, podemos pensar que una baja concentración inicial, puede ser suficiente para activar a las células cebadas y generar compuestos pro-inflamatorios.

Por otro lado, consideramos que la liberación de mediadores por las células cebadas, involucran diferentes vías metabólicas y procesos de exocitosis que son modulables a diferentes concentraciones. Así, es posible que aún a bajas concentraciones, la toxina A de **C. difficile** tenga efecto sobre células cebadas. Dentro de este contexto, cuando se induce la liberación de mediadores, las vesículas citoplásmicas se movilizan y se fusionan con la membrana celular en un proceso que requiere de la participación activa del citoesqueleto. Al igual que lo observado en otros tipos celulares (23,24,25), nuestros resultados mostraron que la toxina A produce en las células cebadas, daño en los microfilamentos de actina y tubulina,. Observamos que, una concentración de 1µg/ml de toxina A induce cambios en la organización del citoesqueleto celular; aunque no sabemos, si esta concentración se logre en condiciones fisiológicas. Como ya se ha mencionado tanto la toxinas A como la B de **C.difficile** monoglucosilan a las proteínas de unión al GTP principalmente Rho y Rac (29,31). Estas proteínas en general se han involucrado en la regulación del citoesqueleto celular, así como en procesos de exocitosis, proliferación y muerte celular (105,106,107,108,109). Estos reportes

fortalecen lo documentado (142), que tanto en las líneas celulares Caco2, HT29, T84 como en las células epiteliales de colon, la toxina A puede causar desprendimiento de las monocapas celulares y apoptosis. Nosotros encontramos que secundario a las alteraciones del citoesqueleto producidas por la toxina A, las células cebadas presentaron alteraciones morfológicas características de apoptosis. La inducción de este fenómeno por productos bacterianos ha sido documentada en otros tipos celulares (140,141). Sin embargo, este es el primer estudio realizado en el cual una toxina bacteriana induce el fenómeno en células cebadas. Los resultados de este estudio indican que, probablemente las alteraciones inducidas por la toxina A en proteínas como Rho y Rac no solo causan daño en los mecanismos de exocitosis, sino también pueden estar involucradas en los mecanismos reguladores de muerte celular (104,105,106). Es importante mencionar, que en la fase aguda de la inflamación inducida por las toxinas de *C.difficile* podemos encontrar tanto eventos de apoptosis como de necrosis intestinal dependiendo de la concentración de toxina presente y del tipo celular afectado en epitelio. En condiciones normales los procesos de apoptosis en células cebadas dependen de factores de crecimiento y maduración así como del microambiente, principalmente IL-3, SCF, el TGF- β 1 y el factor de crecimiento nervioso (131,132,133,134). Principalmente, este proceso es inducido por privación de factores de crecimiento. De hecho, nosotros observamos que las células cebadas peritoneales presentan apoptosis de forma normal al ser retiradas de la cavidad peritoneal y ser privadas de su medio ambiente normal. También se ha visto la inducción de apoptosis en estas células por activación de diversos genes como bcl-2, p53, c-kit y Fas/FasL (135,136,137,162). Sin embargo, en nuestro modelo no sabemos aún si las alteraciones inducidas por la toxina A probablemente involucren alteraciones, en las proteínas de citoesqueleto como Rho o en los genes conocidos como inductores de apoptosis en las células cebadas. Se sabe además, que el espectro de daño inducido por la toxina A es variable, existiendo como lo hemos mencionado, la posibilidad de que las células cebadas de mucosa intestinal puedan estar expuestas a diferentes concentraciones y por diferentes tiempos a la toxina, generando diferentes niveles

de daño intestinal. Así, otras células como macrófagos, monocitos y neutrófilos también se ven afectadas por la toxina, lo cual podría contribuir a un aumento en el daño observado, lo cual podría también explicar la existencia de casos severos refractarios a tratamiento.

De acuerdo a nuestros resultados en conjunto, sugerimos que las células cebadas pueden participar en la reacción inflamatoria inicial liberando $TNF\alpha$ en respuesta a la toxina A. En contraste, la acción directa de la toxina A en las células cebadas no produce liberación de mediadores como la histamina y el NO. La disrupción del citoesqueleto celular causada por la toxina A podría alterar la capacidad de las células cebadas para secretar histamina y NO en procesos de activación dependientes e independientes de antígeno. En oposición a la acción necrótica de la toxina A en otros tipos celulares, en las células cebadas esta toxina produce apoptosis. La exposición prolongada a la toxina A en intestino podría disminuir la función y viabilidad de las células inflamatorias intestinales, alterando con esto su capacidad de defensa contra la infección. Finalmente todos los eventos inducidos por la toxina A, podrían favorecer los casos severos y prolongados de colitis pseudomembranosa.

En perspectiva pensamos que existe un panorama muy amplio para poder evaluar los procesos metabólicos que induce la toxina A en las células cebadas. Por lo que, nos proponemos demostrar los procesos de internalización de la toxina y su acción sobre blancos celulares específicos. Consideramos además, que toda esta serie de procesos dentro de las células cebadas, pueden ser analizados mediante técnicas de biología molecular. En este sentido, se ha pensado utilizar bibliotecas substractivas que nos permitan analizar los genes diferencialmente expresados, importantes no solo en apoptosis sino en los eventos de regulación y activación de las células cebadas estimuladas.

Effects of Toxin A from *Clostridium difficile* on Mast Cell Activation and Survival

GLORIA M. CALDERÓN,¹ JAVIER TORRES-LÓPEZ,¹ TONG-JUN LIN,² BIBIANA CHAVEZ,³
MANUEL HERNÁNDEZ,⁴ ONOFRE MUÑOZ,¹ A. DEAN BEFUS,² AND J. ANTONIO ENCISO^{1*}

*UIMEIP, Hospital de Pediatría, CMN Siglo XXI, IMSS, México City,¹ and Departamento de Patología Experimental³
and Departamento de Biología Celular,⁴ CINVESTAV, IPN México City, México, and PRG, University of Alberta,
Edmonton, Alberta, Canada²*

Received 11 December 1997/Returned for modification 2 February 1998/Accepted 11 March 1998

Toxins A and B from *Clostridium difficile* are the main cause of antibiotic-associated diarrhea and pseudomembranous colitis. They cause fluid accumulation, necrosis, and a strong inflammatory response when inoculated in intestinal loops. Since mast cells are a rich source of inflammatory mediators, abundant in the gut, and known to be involved in *C. difficile*-induced enteritis, we studied the *in vitro* effect of toxin A on isolated mast cells. Normal rats sensitized by infection with *Nippostrongylus brasiliensis* were used to isolate peritoneal mast cells (PMC). PMC from naive rats were stimulated with calcium ionophore A23187 as a model of antigen-independent activation, and PMC from sensitized rats were stimulated with *N. brasiliensis* antigens to study immunoglobulin E-dependent mast cell activation. After 4 h, toxin A did not induce release of nitric oxide or histamine in naive PMC. However, 10 ng of toxin per ml caused a significant release of tumor necrosis factor alpha (TNF- α). In contrast, 1 μ g of toxin per ml inhibited antigen or A23187-induced histamine release by PMC. Toxin A at 1 μ g/ml for 4 h caused disruption of actin which aggregated in the cytoplasm and around the nucleus. After 24 h, chromatin condensation, cytoplasmic blebbing, and apoptotic-like vesicles were observed; DNA fragmentation was documented also. These results suggest that mast cells may participate in the initial inflammatory response to *C. difficile* infection by releasing TNF- α upon interaction with toxin A. However, longer exposure to toxin A affects the release of inflammatory mediators, perhaps because of the alteration of the cytoskeleton and induction of apoptosis. The impaired functions and survival of mast cells by *C. difficile* toxin A could hamper the capacity of these cells to counteract the infection, thus prolonging the pathogenic effects of *C. difficile* toxins.

Clostridium difficile is the etiologic agent of antibiotic-associated diarrhea and pseudomembranous colitis (1). Antibiotics and cytotoxic drugs disturb colonic flora, allowing overgrowth of *C. difficile* and production of toxins A and B. Toxin A elicits an acute inflammatory response, congestion, and necrosis when inoculated in the gut (1, 14, 36, 44). It is chemotactic and induces the release of inflammatory mediators by macrophages and neutrophils (9, 24, 31). Some studies suggested that mast cells also play an important role in the pathophysiology of toxin A (25). Thus, toxin A administered into ileal loops of rats elicited the release of inflammatory mediators such as leukotriene B₄, platelet-activating factor, and rat mucosal mast cell protease II (RMCPII) (6, 26, 35). Moreover, treatment of animals with the anti-allergy and anti-inflammatory agent ketotifen, with the H1 histamine antagonist idoxamide, or with histaminase reduced the inflammation and secretory responses caused by toxin A (12, 25, 34). It has been proposed that toxin A induces the secretion of inflammatory mediators from mast cells either directly, or indirectly through the release of substance P, a known activator of mucosal mast cells (7, 19, 29).

Mast cells are widely distributed in the intestinal mucosa, in skin and around blood and lymphatic vessels, and in many other tissues and organs. They can be activated to release inflammatory mediators via immunoglobulin E (IgE)-dependent and IgE-independent mechanisms (16). In IgE-independent mechanisms, mast cells can be activated by substances

such as calcium ionophore, compound 48/80, substance P, and microbial products (11, 16). They can release potent mediators of inflammation and recently have been shown to play a pivotal role in host defense against bacterial infection (11, 28). The defenses in sepsis are dependent on mast cells that produce tumor necrosis factor alpha (TNF- α), which in turn attracts and activates neutrophils to the site of infection (28). However, in all these studies, direct evidence of *C. difficile* toxin A effect on mast cells has not been described.

Thus, to investigate whether toxin A has direct effects on mast cells, we analyzed the influence of toxin A on the secretion of histamine, TNF- α , and nitric oxide (NO) *in vitro*. We found that toxin A did not induce the release of histamine and NO, although it induced the release of small amounts of TNF- α . Moreover, exposure to large doses of toxin A inhibited mast cell activation induced by IgE-dependent and IgE-independent mechanisms and also altered the mast cell cytoskeleton and induced cell death by apoptosis.

MATERIALS AND METHODS

Rat PMC. Peritoneal mast cells (PMC) were from 250- to 300-g male Sprague-Dawley rats (Charles River, Canada Inc.), maintained under standard laboratory conditions with food and water *ad libitum*. PMC were obtained by lavage of the peritoneal cavity with HEPES-buffered Tyrode's solution (HTBS) containing 0.1% bovine serum albumin and isolated in a discontinuous gradient of sterile Percoll (Pharmacia Ltd., Uppsala, Sweden). Purity of isolated cells was checked by staining with toluidine blue (3) and observed under light microscopy. Mast cells used in all experiments were 97 to 99% pure, with viability of >96%. To study the IgE-dependent activation of mast cells, rats were infected with 3,000 third-stage larvae of *Nippostrongylus brasiliensis* 5 to 6 weeks before PMC isolation (2). To evaluate activation by calcium ionophore A23187 or toxin A, mast cells were obtained from naive rats. All protocols used for mast cell isolation

* Corresponding author. Mailing address: Hospital de Pediatría, CMN Siglo XXI, Av. Cuauhtémoc 330 Col Doctores, México 06725, D.F., México. Phone: (525) 627-69-40. Fax: (525) 627-69-49. E-mail: enciso@huzón.main.conacyt.mx.

from animals were approved by Animal Ethics Committees from University of Alberta (Canada), as well from the Mexican Institute of Social Security.

Reagents. 1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), sulfanilamide, naphthylethylenediamine dihydrochloride, HEPES (sodium salt), H_2PO_4 , $NaNO_2$, calcium ionophore A23187 (Calon), 2-mercaptoethanol, *p*-phenylenediamine, and E-toxate kit (*Limulus* amoebocyte lysate, for detection of endotoxin) were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo. *C. difficile* toxin A free of endotoxin, as tested with the E-toxate kit, was produced and purified as previously described (45). *N. brasiliensis* antigen (NbAg) was obtained according to the procedure of White and Pearce (47). RPMI 1640 medium was from Gibco-BRL (Grand Island, N.Y.). Fetal bovine serum was purchased from HyClone (Logan, Utah). Monoclonal antibodies to actin were produced and purified as described by Diaz-Barriga et al. (10). Polyclonal antibodies to toxin A were produced by immunization of rabbits with purified toxin A as described previously (46).

TNF- α bioassay. For the TNF- α assay, 2.5×10^4 naive PMC were mixed with different concentrations of toxin A (0.001, 0.01, 0.1, and 1 μ g/ml) in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS (RPMI-FBS) and incubated for 4 h at 37°C under a 5% CO_2 atmosphere. Unbound toxin A was removed by centrifugation at 600 \times g, and PMC were suspended in fresh RPMI-FBS. The cell suspension was further incubated for 6 h at 37°C. The cells were then centrifuged at 900 \times g, and the supernatant was tested for TNF- α cytotoxicity on WEHI 164.13 cells (13). As a control, the direct effect of toxin A (1 to 100 ng/ml) on WEHI 164.13 cells was tested and shown not to be toxic; by contrast, with 1 μ g of toxin A per ml, we observed evidence of toxicity. This alteration was abolished with rabbit antiserum (1:50 dilution). Under these conditions, TNF- α -mediated toxicity was not modified by toxin A. Antibody to toxin A did not alter the TNF- α -mediated toxicity of mast cells, given that antibody to TNF- α fully blocked the toxicity against WEHI cells induced by supernatants from mast cells following toxin A stimulation. Mouse recombinant TNF- α (Genzyme Co., Cambridge, Mass.) was used as a standard. Test samples were assayed with concentrations of TNF- α from 0.8 to 100 pg/ml. WEHI 164.13 cells were incubated in 50 μ l of RPMI-FBS with 50 μ M 2-mercaptoethanol for 20 h at 37°C in 5% CO_2 atmosphere. Viability of cells was measured 3 h following addition of 10 μ l of MTT (5 mg/ml) per well. Isopropanol-HCl (150 μ l) was added to dissolve the purple formazan precipitates. The plate was read on a Vmax kinetic microplate reader (Molecular Devices Co., Menlo Park, Calif.) at 570 nm.

NO production. PMC from uninfected rats (10⁵ cells/well) were incubated for 4 h with different concentrations of toxin A (0.001, 0.01, 0.1, and 1 μ g/ml) in RPMI 1640 without phenol red. After washing, they were further incubated for 72 h at 37°C. Cell supernatants were mixed with an equal volume of Griess reagent [1% sulfanilamide, 0.1% *N*-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride, 2.5% H_2PO_4] and incubated for 10 min at room temperature (20). Concentration of NO_2^- was determined by measuring the absorbance at 540 nm with a Vmax kinetic microplate reader (Molecular Devices). $NaNO_2$ was used as a standard.

Histamine release assay. PMC (2.5×10^4) from *N. brasiliensis*-infected rats were suspended in 100 μ l of HBTS containing 0.1% bovine serum albumin and incubated in the presence or absence of toxin A (0.001, 0.01, 0.1, and 1 μ g/ml) for 30 min or 4 h at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere. After incubation, cells were washed and resuspended in HBTS and challenged with 10 worm equivalents of NbAg per ml for 20 min. Isolated PMC from uninfected rats were also treated with toxin A, A23187 (2.5 μ M), or medium alone under the same conditions. The supernatant and cell pellets were then separated by centrifugation at 3,000 \times g. Histamine levels were measured in both supernatant and pellet fractions with a fluorometric assay (43) using a CytoFluor 2350 fluorescence spectrometer (Millipore Co., Bedford, Mass.). The percentage release of the total histamine content was calculated as described previously (4), and the spontaneous release in the absence of toxin, A23187, or NbAg was subtracted to estimate specific histamine release.

Cell morphology studies. One million naive PMC were exposed to either 1 μ g of toxin A per ml or vehicle and incubated for 4 h at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere; cells were then washed, resuspended in RPMI 1640, and further incubated for 20 h. Subsequently, cells were fixed in 2.5% glutaraldehyde for 1 h and postfixed in 1% OsO_4 in cacodylate buffer (0.3 M, pH 7.2). Cells were gradually dehydrated with ethanol and finally embedded in Epon (18). The samples were thin sectioned and observed by transmission electron microscopy (TEM) with a JEOL-X100 SX microscope (JEOL Co., Tokyo, Japan). For scanning electron microscopy (SEM), after dehydration the samples were critical point dried with CO_2 and gold coated in an ion-sputtering device. Specimens were observed with a JEOL 35C scanning electron microscope.

Cytoskeleton analysis. A total of 2.5×10^4 naive PMC were incubated 37°C for 4 h with 1 μ g of toxin A per ml. Cells were fixed in 3.7% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4) for 30 min at room temperature. After washing, the cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 10 min at room temperature. For visualization of cytoskeletal proteins, monoclonal antibodies directed against actin or tubulin were added to permeabilized cells and incubated for 1 h at room temperature (10). Cells were washed with PBS and then incubated with a fluorescein-conjugated sheep anti-mouse IgG antibody (1:30) (Boehringer, Mannheim, Germany) for 1 h at room temperature. Finally, after washing with PBS, coverslips were mounted with *p*-phenylenediamine in Gelvatol (100 μ g/ml; Monsanto-Birchman Bend Plant, Birchman Bend, Mass.)

and analyzed with an Olympus BH-2 fluorescence microscope (Olympus Co., Tokyo, Japan).

Analysis of DNA fragmentation. A suspension of 2×10^6 naive PMC was mixed with 1 μ g of toxin A per ml and incubated for 4 h at 37°C. Cells were then washed with PBS (pH 7.4) and resuspended in lysis buffer (10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl [pH 8], 0.5% sodium dodecyl sulfate) with proteinase K (500 μ g/ml) and RNase A (50 μ g/ml). After incubation at 50°C for 2 h, DNA was extracted twice with an equal volume of phenol-chloroform-isoamyl alcohol (Gibco Co., Gaithersburg, Md.). DNA obtained in the aqueous fraction was precipitated overnight in 0.1 volume of sodium acetate (3 M) and 2.5 volumes of 100% ethanol at -20°C. After washing with 70% ethanol, DNA pellet was resuspended in 20 μ l of TE buffer (40 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA), and 10 μ g of DNA was electrophoresed on a 1% agarose gel and stained with SYBR green (Molecular Probes, Eugene, Oreg.).

Statistical analysis. The two-tailed paired Student's *t* test was used for statistical evaluation of TNF- α and NO studies. Results were considered significantly different when *P* was <0.05. For histamine release, a three-way interaction variance analysis was used. Results were considered significantly different when *P* was <0.01 with the Scheffe test.

RESULTS

The viability of PMC from both *N. brasiliensis*-infected and uninfected rats was not affected by exposure of up to 4 h with doses of toxin A from 0.001 to 1 μ g/ml. However, exposure to 1 μ g/ml for longer periods of time (24, 48, and 72 h) decreased the viability of mast cells (17, 30, and 60%, respectively), whereas exposure to 10 μ g of toxin A per ml for 4 and 24 h reduced cell viability to 12 and 26%, respectively. Accordingly, for studies of mediator secretion, toxin A doses of up to 1 μ g/ml and exposure for up to 4 h were used.

Effect of *C. difficile* toxin A on TNF- α and NO production. To determine the effects of toxin A on TNF- α production, PMC from uninfected rats were incubated with different concentrations of toxin A for 4 h. TNF- α in cell-free supernatants was assessed on TNF- α -sensitive WEHI cells. Treatment of PMC with 0.01 or 0.1 μ g of toxin A per ml stimulated (*P* < 0.05) release of TNF- α (Fig. 1A), from 14.4 pg/10⁶ in sham-treated PMC to 36.5 or 46 pg/10⁶ cells, respectively.

To investigate the effects of toxin A on NO production by mast cells from uninfected rats, we exposed PMC to different concentrations of toxin A. Toxin A did not induce NO production in PMC (Fig. 1B) at any of the concentrations tested. Constitutive NO production by PMC in presence of toxin A was not affected (Fig. 1B).

Effect of toxin A on histamine release from PMC stimulated by IgE- and non-IgE-dependent pathways. To investigate the effects of toxin A on IgE-dependent histamine release, PMC from *N. brasiliensis*-infected and uninfected rats were incubated with different concentrations of toxin (Fig. 2). Toxin A (4-h incubation, doses from 0.001 to 1 μ g/ml) did not stimulate histamine secretion from normal or *N. brasiliensis*-sensitized mast cells above the level of spontaneous release (2.6% \pm 0.5%, mean \pm standard error [SE]). However, exposure to 1 μ g of toxin A per ml significantly inhibited histamine release (77%, *P* < 0.01) from sensitized mast cells stimulated with NbAg. To analyze the inhibitory effect of toxin A on IgE-independent histamine release, naive PMC were incubated with toxin A and then treated with A23187 (2.5 μ M) for 20 min. A significant inhibition of histamine release (41%, *P* < 0.01) was observed when PMC were treated with 1 μ g of toxin A per ml for 4 h. However, treatment of PMC with up to 1 μ g of toxin A per ml for 30 min did not inhibit IgE-dependent or IgE-independent histamine release (data not shown).

Cytoskeletal changes associated with toxin A treatment on PMC. There were cytoskeletal changes in rat PMC after incubation with 1 μ g of toxin A per ml for 4 h (Fig. 3). Sham-treated PMC cultured for 4 h showed a normal distribution of actin filaments (Fig. 3A). In contrast, PMC treated with 1 μ g of toxin A per ml for 4 h showed cytoplasm retraction and cy-

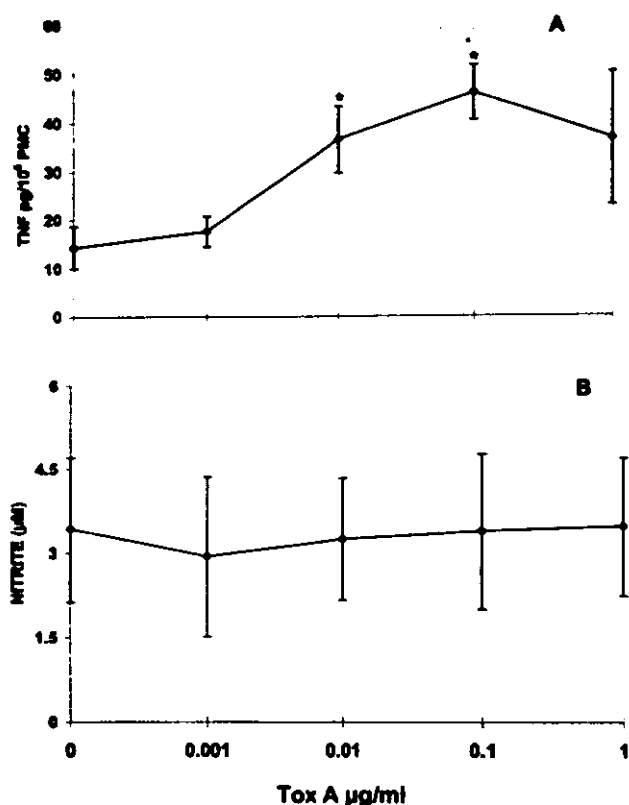


FIG. 1. (A) Effects of toxin A (Tox A) on TNF α production by rat PMC. Cells were incubated with toxin A for 4 h, washed, and then cultured for an additional 6 h before the supernatants were assayed for TNF α or NO. Results are the means \pm SE for five experiments. Shown are effects on TNF α production (*, $P < 0.05$ by comparison with cells not treated with toxin A). (B) Effect on NO production. PMC were treated under same conditions as above ($P > 0.05$ by comparison with cells not treated with toxin A).

toskeletal rearrangements with actin-containing dense deposits in the cytoplasm (Fig. 3B).

Morphological changes in PMC induced by *C. difficile* toxin A. TEM and SEM were used to examine naive PMC treated with 1 μ g of toxin A per ml for 4 h (Fig. 4). Naive cells showed a regular distribution of granules with well-dispersed chromatin in the nuclei. The plasma membrane was normal, and granule contents were clearly visible (Fig. 4A). However, PMC treated with toxin A (Fig. 4C) showed a decreased number of membrane microvilli, changes in electron-dense granules in the cytoplasm, and pyknotic nuclei with condensation of nuclear chromatin, all features characteristic of apoptosis. Furthermore, PMC treated with toxin A and observed with SEM (Fig. 4D) showed morphological changes and evidence of enhanced granule release compared with untreated cells (Fig. 4B).

DNA fragmentation. DNA from PMC treated with 1 μ g of toxin A per ml showed a characteristic ladder pattern after agarose electrophoresis (Fig. 5, lane C). DNA from sham-treated PMC (Fig. 5, lane B) did not show DNA fragmentation.

DISCUSSION

In experimental enterocolitis, toxin A causes inflammation and necrosis of the intestinal wall (24, 35, 44). Both mast cells and other leukocytes have been implicated in the pathophysiology of toxin A-induced mucosal damage. To understand the

mechanisms involved, several in vivo and in vitro approaches have been used. For example, the in vitro interaction of toxin A with rat peritoneal macrophages induces release of interleukin-1 β and TNF α , which attract and activate neutrophils (40). Toxin A also causes release of RMCPII when injected in ileal loops of rats (6). This effect can be inhibited with a specific antagonist of substance P (34), suggesting that toxin A activates mast cells via substance P released from adjacent sensory neurons (30). Thus, macrophages, other leukocytes, and mast cells may play a role in the inflammation and necrosis associated with toxin A.

Although mast cells are an important source of several inflammatory mediators and have been implicated in toxin A-induced enterocolitis, no studies about the direct action of toxin A on isolated mast cells have been published. Thus, our study showed that low doses of toxin A induce the secretion of TNF α from freshly isolated mast cells in vitro. This is to our knowledge, the first direct report showing that a bacterial enterotoxin causes release of TNF α from mast cells. The ability of toxin A to induce release of TNF α is not limited to mast cells, as both toxins A and B cause release of TNF α by human monocytes (15).

In contrast to macrophages, mast cells store TNF α in granules and can therefore release it immediately after toxin A activation and participate in the early phase of the inflammatory reaction. TNF α is also known to cause necrosis of epithelial cells of the intestine, as well as inhibition of gastric motility (42). Thus, all the above effects suggest that mast cell-derived TNF α may play a role in the mucosal damage and fluid accumulation observed in *C. difficile*-associated colitis.

Although the in vitro ability of toxin A to activate inflammatory cells such as neutrophils, macrophages, and mast cells (this study) has been demonstrated, the in vivo access of the toxin to these cells is in dispute because of the large size of the toxin. However, toxin A can cause detachment and apoptosis of enterocytes (27). In this disrupted epithelium, toxin A might diffuse and interact with inflammatory cells in the lamina propria, including mast cells.

In earlier reports, there is strong evidence that histamine is involved in the *C. difficile* toxin A experimental colitis in rats (25, 35). However, our results in vitro indicate that toxin A was

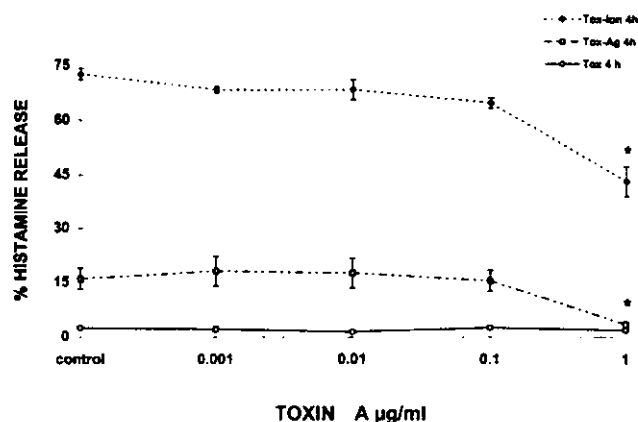


FIG. 2. Effect of *C. difficile* toxin A on NbAg and on A23187 induction of histamine release by PMC. The cells were incubated for 4 h with different concentrations of toxin A (Tox) and further stimulated with NbAg (Ag: 10 worm equivalents/ml) or A23187 (Ion: 2.5 μ M) for 20 min. A significant inhibition (*, $P < 0.01$) was observed on mast cells treated with 1 μ g of toxin A per ml plus antigen (77%) or toxin A plus A23187 (41%). Results are the mean \pm SE of five experiments with duplicates in each experiment.

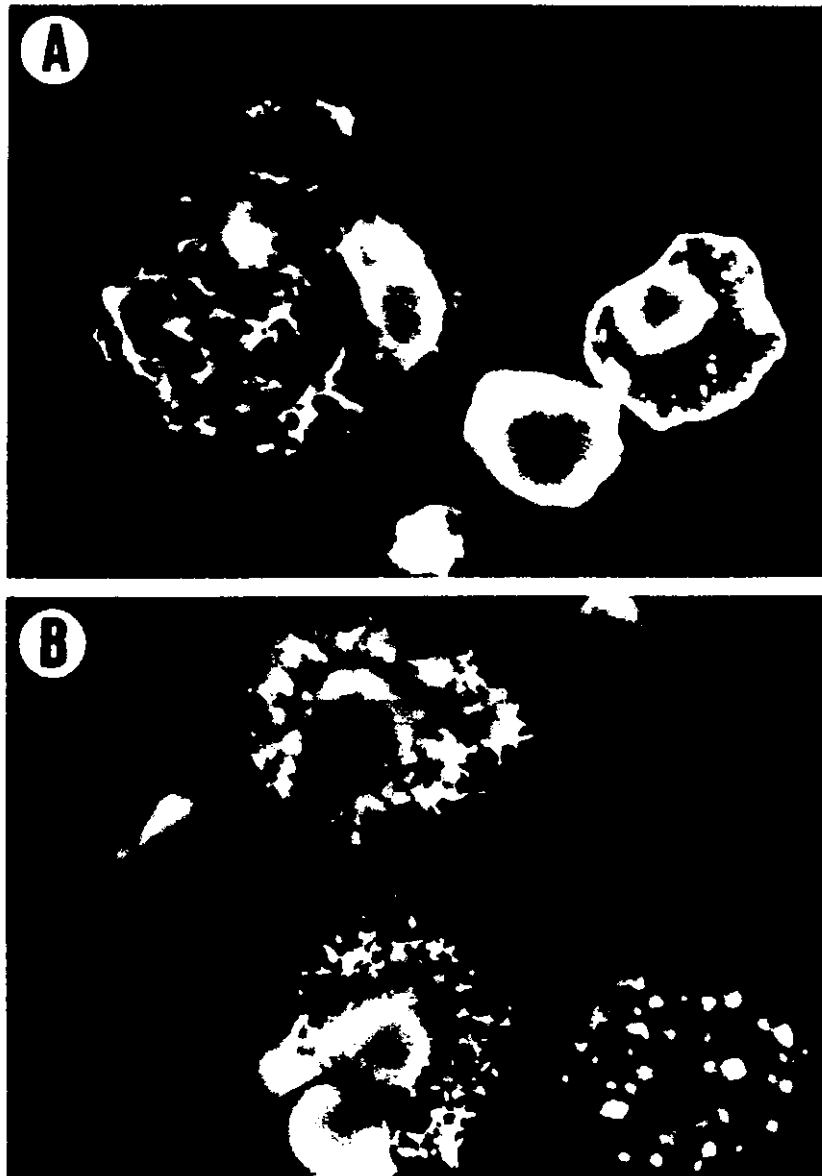


FIG. 3. Effect of toxin A on PMC actin microfilaments. (A) Mast cells showed a normal distribution of actin filaments without toxin A treatment. (B) Mast cells treated with 1 μ g of toxin A per ml showed cytoskeletal rearrangements with actin-forming dense deposits in the cytoplasm and cytoplasm retraction.

not able to directly induce the secretion of histamine or NO from mast cells. This contrasts to the *in vivo* degranulation observed after injection of toxin A in intestinal loops (25), suggesting that histamine is released *in vivo* due to indirect activation of mast cells, such as with substance P released by enteric nerves (6, 30, 34).

Our results further document that in mast cells, the mechanisms for TNF- α release are different from those involved in the release of histamine. Furthermore, we found that toxin A inhibited antigen-dependent and -independent release of histamine by mast cells. To release histamine, vesicles must move and fuse with the cell membrane, a process that requires the participation of the cytoskeleton. We found that in mast cells, like in other cell types, toxin A disrupts the actin microfilaments; this alteration may reduce the capacity of mast cells to release histamine contained in granules. It was recently reported that *C. difficile* toxins A and B alter cytoskeleton by

monoglycosylation of GTP-binding proteins Rho and Rac (17, 22, 23). These proteins have been shown to regulate the role of the cytoskeleton during secretion of inflammatory mediators in mast cells (33, 37, 38). However, the concentration of toxin used to alter the PMC cytoskeleton was high, and it is probably not achieved *in vivo*. Once again, degranulation of mast cells may occur *in vivo* by activation of neuronal circuits.

NO is also an effector molecule produced by mast cells that could be involved in the pathophysiology of enterocolitis (41). Interestingly, NO is able to potentiate mast cell cytotoxicity mediated by TNF- α (5). However, toxin A did not stimulate NO synthesis by mast cells at any of the concentrations of toxin used. Thus, direct interaction of toxin A with mast cells *in vitro* may not induce NO production, although this does not preclude synthesis of NO by mast cells or other cells induced by indirect mechanisms such as neuropeptides. Recently, Qiu et al. (39) demonstrated that NO inhibits the entero-

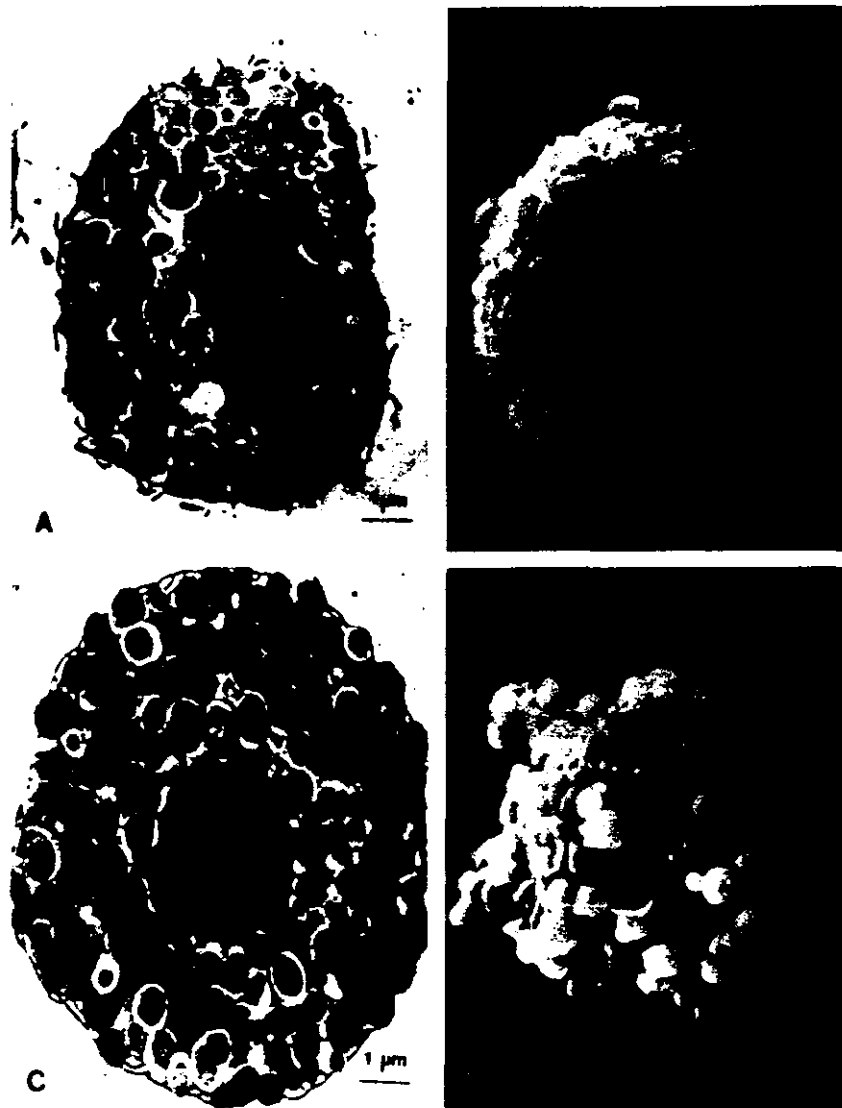


FIG. 4. TEM and SEM of control PMC (A and B) and PMC treated with 1 μg of toxin A per ml for 4 h (C and D). TEM showed that mast cells exposed to toxin A underwent loss of membrane microvilli and nuclear chromatin condensation (C). With SEM, some cells showed signs of alteration: surface blebbing, loss of rounding and normal granule organization, cell membrane disorganization, and changes in morphology (D).

toxicity of toxin A on rat small intestine; if NO acts as a mechanism of defense, this might come from cells other than mast cells.

We found that prolonged exposure to toxin A caused apoptosis of PMC. This is the first report on induction of apoptosis in mast cells caused by a bacterial toxin. The induction of apoptosis by bacterial products has been documented in other cell types (8, 21, 32). In fact, toxin A caused apoptosis in human intestinal epithelial cells (27). The ability of toxin A to cause apoptosis raises the interesting possibility that Rho and Rac proteins may be involved in the mechanisms regulating program cell death. We are currently studying the mechanisms involved in toxin A-induced apoptosis in mast cells.

During the acute phase of inflammation and necrosis in the intestinal wall caused by *C. difficile* toxins, mast cells are active and releasing mediators such as RMCPII, platelet-activating factor, and leukotriene B₄ (6, 26, 35). This finding suggests that toxin A-induced apoptosis may not occur at this stage. How-

ever, it could be that in severe cases of pseudomembranous colitis, mast cells in the lamina propria may be exposed to toxin A at doses or times that induce apoptosis; macrophages, monocytes, and neutrophils may also be affected (14, 15, 40). This would impair the ability of these cells to counteract infection and may explain in part why severe cases are so refractory to treatment and prone to recrudescence.

Our results suggest that mast cells may participate in the initial inflammatory reaction by releasing TNF- α in response to toxin A. In contrast, histamine and NO may not participate when toxin A acts directly on mast cells. The disruption of the cytoskeleton caused by the toxin A may alter the ability of mast cells to secrete histamine and NO after antigen-dependent or -independent activation. In opposition to the necrotic action of toxin A in other cell types, it induces apoptosis in mast cells. Prolonged exposure to toxin A decreases function and viability of intestinal inflammatory cells, hindering their ability to counteract infection; this would probably favor severe and long-lasting cases of pseudomembranous colitis.



FIG. 5. Analysis of DNA fragmentation of PMC treated with 1 μ g of toxin A per ml for 4 h. Ten micrograms of DNA was separated in a 1% agarose gel and stained with SYBR green. Lane A, molecular weight marker profile from a 123-bp ladder from Gibco-BRL; lane B, DNA from PMC incubated in RPMI 1640-5% FBS for 24 h; lane C, fragmented genomic DNA from PMC treated with toxin A for 24 h.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by research grants 2095-M9303 and F564-M9312 from El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (National Council of Science and Technology), Mexico, and by the Medical Research Council and Alberta Heritage Foundation for Medical Research, Canada. Gloria M. Calderón was supported by a doctoral scholarship from Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, Mexico.

We thank Mauricio Sarrazola for assistance with statistical analysis.

REFERENCES

- Bartlett, J. G. 1994. *Clostridium difficile*: history of its role as an enteric pathogen and the current state of knowledge about the organism. Clin. Infect. Dis. 18(Suppl. 4):S265-S272.
- Befus, A. D., F. L. Pearce, J. Gaudie, P. Horsewood, and J. Bienenstock. 1982. Mucosal mast cells. I. Isolation and functional characteristics of rat intestinal mast cells. J. Immunol. 128:2475-2480.
- Benyon, R. C., J. A. Enciso, and A. D. Befus. 1993. Analysis of human skin mast cell proteins by two-dimensional gel electrophoresis: identification of tryptase as a sialylated glycoprotein. J. Immunol. 151:2699-2706.
- Bissonnette, E. Y., J. A. Enciso, and A. D. Befus. 1997. TGF- β_1 inhibits the release of histamine and tumor necrosis factor- α from mast cells through an autocrine pathway. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 16:275-282.
- Bissonnette, E. Y., C. M. Hogaboam, J. L. Wallace, and A. D. Befus. 1991. Potentiation of tumor necrosis factor- α -mediated cytotoxicity of mast cells by their production of nitric oxide. J. Immunol. 147:3060-3065.
- Castagliuolo, I., J. T. LaMont, R. Letourneur, C. Kelly, J. C. O'Keane, A. Jaffer, T. C. Theoharides, and C. Pothoulakis. 1994. Neuronal involvement in the intestinal effects of *Clostridium difficile* toxin A and *Vibrio cholerae* enterotoxin in rat ileum. Gastroenterology 107:657-665.
- Castex, N., J. Fioramonti, M. J. Fargeas, J. More, and L. Bueno. 1994. Role of 5-HT $_1$ receptors and afferent fibers in the effects of mast cell degranulation on colonic motility in rats. Gastroenterology 107:976-984.
- Chen, Y., and A. Zychlinsky. 1994. Apoptosis induced by bacterial pathogens. Microb. Pathog. 17:203-212.
- Däubener, W., E. Leiser, C. von Eichel-Streiber, and U. Hadding. 1988. *Clostridium difficile* toxin A and B inhibit human immune response in vitro. Infect. Immun. 56:1107-1112.
- Diaz-Barriga, F., L. Carrizales, L. Yañez, J. M. Hernandez, C. Dominguez-Robles, E. Palmer, and J. L. Saborio. 1989. Interaction of cadmium with actin microfilaments in vitro. Toxic in vitro 3:277-284.
- Echtenacher, B., D. N. Mannel, and L. Hultner. 1996. Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. Nature 381:75-77.
- Eliakim, R., F. Karmeli, E. Okon, and D. Rachmilewitz. 1992. Ketotifen effectively prevents mucosal damage in experimental colitis. Gut 33:1498-1503.
- Espvik, T., and J. Nissen-Meyer. 1986. A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor tumor necrosis factor from human monocytes. J. Immunol. Methods 95:99-105.
- Fiorentini, C., and M. Thelestam. 1991. *Clostridium difficile* toxin A and its effects on cells. Toxicol. 29:543-567.
- Flegel, W. A., F. Müller, W. Däubener, H. Fisher, U. Hadding, and H. Northoff. 1991. Cytokine response by human monocytes to *Clostridium difficile* toxin A and toxin B. Infect. Immun. 59:3659-3666.
- Galli, S. J. 1993. New concepts about the mast cell. N. Engl. J. Med. 328:257-265.
- Giry, M., M. Popoff, C. von Eichel-Streiber, and P. Boquet. 1995. Transient expression of RhoA, -B, and -C GTPases in HeLa cells potentiates resistance to *Clostridium difficile* toxins A and B but not to *Clostridium sordellii* lethal toxin. Infect. Immun. 63:4063-4071.
- Gonzalez-Robles, A., A. Lázaro-Haller, M. Espinoza-Cantellano, F. Anaya-Velazquez, and A. Martínez-Palomo. 1995. *Trichomonas vaginalis*: ultrastructural bases of the cytopathic effect. J. Eucaryotic Microbiol. 42:641-651.
- Goyal, R., and I. Hirano. 1996. The enteric nervous system. N. Engl. J. Med. 334:1106-1115.
- Green, L. C., D. A. Wagner, J. Glogowski, P. L. Skipper, J. S. Wishnok, and S. R. Tannenbaum. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [15 N] nitrate in biological fluids. Anal. Biochem. 126:131-138.
- Inward, C. D., J. Williams, I. Chant, J. Crocker, D. V. Millford, P. E. Rose, and M. Taylor. 1995. Verocytotoxin-1 induces apoptosis in Vero cells. J. Infect. 30:213-218.
- Just, I., J. Selzer, C. von Eichel-Streiber, and K. Aktories. 1995. The low molecular mass GTP-binding protein Rho is affected by toxin A from *Clostridium difficile*. J. Clin. Invest. 95:1026-1031.
- Just, I., M. Wim, J. Selzer, G. Rex, C. von Eichel-Streiber, M. Mann, and K. Aktories. 1995. The enterotoxin from *Clostridium difficile* (toxin A) monogluco-sylates the rho proteins. J. Biol. Chem. 270:13932-13936.
- Kelly, C., S. Becker, J. K. Linevsky, M. A. Joshi, J. C. O'Keane, B. F. Dickey, J. T. LaMont, and C. Pothoulakis. 1994. Neutrophil recruitment in *Clostridium difficile* toxin A enteritis in the rabbit. J. Clin. Invest. 93:1257-1265.
- Kurose, I., C. Pothoulakis, J. T. LaMont, D. C. Anderson, J. C. Paulson, M. Miyasaka, R. Wolf, and D. N. Granger. 1994. *Clostridium difficile* toxin A-induced microvascular dysfunction. Role of histamine. J. Clin. Invest. 94:1919-1926.
- Lauritsen, K., L. Laursen, K. Bukhave, and J. Rask-Madsen. 1988. *In vivo* profiles of eicosanoids in ulcerative colitis, Crohn's colitis and *Clostridium difficile* colitis. Gastroenterology 95:11-17.
- Mahida, Y. R., S. Makh, S. Hyde, T. Gray, and S. P. Borriello. 1996. Effect of *Clostridium difficile* toxin A on human intestinal epithelial cells: induction of interleukin 8 production and apoptosis after cell detachment. Gut 38:337-347.
- Malaviya, R., T. Ikeda, E. Ross, and S. N. Abraham. 1996. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF- α . Nature 381:77-79.
- Mantyh, C. R., J. E. Maggio, P. Mantyh, S. Vigna, and T. N. Pappas. 1996. Increased substance P receptor expression by blood vessels and lymphoid aggregates in *Clostridium difficile*-induced pseudomembranous colitis. Digest. Dis. Sci. 41:614-620.
- Mantyh, C. R., T. N. Pappas, J. A. Lapp, M. K. Washington, L. M. Neville, J. R. Ghilardi, S. D. Rogers, P. W. Mantyh, and S. R. Vigna. 1996. Substance P activation of enteric neurons in response to intraluminal *Clostridium difficile* toxin A in the rat ileum. Gastroenterology 111:1272-1280.
- Miller, P. D., C. Pothoulakis, T. R. Baeker, J. T. LaMont, and T. L. Rothstein. 1990. Macrophage-dependent stimulation of T cell-depleted spleen cells by *Clostridium difficile* toxin A and calcium ionophore. Cell. Immunol. 126:155-163.
- Morimoto, H., and J. Bonavida. 1992. Diphtheria toxin and *Pseudomonas* toxin-mediated apoptosis. J. Immunol. 149:2089-2094.
- Norman, J. C., L. S. Price, A. J. Ridley, and A. Koffer. 1996. The small GTP-binding proteins, rac and rho, regulate cytoskeletal organization and exocytosis in mast cells by parallel pathways. Mol. Biol. Cell 7:1429-1442.
- Pothoulakis, C., I. Castagliuolo, J. T. LaMont, A. Jaffer, J. C. O'Keane, R. M. Snider, and S. E. Leeman. 1994. CP-96,345, a substance P antagonist, inhibits rat intestinal responses to *Clostridium difficile* toxin A but not cholera toxin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:947-951.
- Pothoulakis, C., F. Karmeli, C. P. Kelly, R. Eliakim, M. A. Joshi, J. C. O'Keane, I. Castagliuolo, J. T. LaMont, and D. Rachmilewitz. 1993. Ketotifen inhibits *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis in rat ileum. Gastroenterology 105:701-707.
- Pothoulakis, C., R. Sullivan, D. Melnick, G. Triadafilopoulos, A. S. Gadenne, T. Meshulam, and J. T. LaMont. 1988. *Clostridium difficile* toxin A stimulates intracellular calcium release and chemotactic response in human granulocytes. J. Clin. Invest. 81:1741-1745.
- Prepens, U., I. Just, C. von Eichel-Streiber, and K. Aktories. 1995. Inhibition of Fc ϵ R1 mediated activation of rat basophilic leukemia cells by *Clostridium difficile* toxin B (monogluco-syltransferase). J. Biol. Chem. 271:7324-7329.
- Price, L. S., J. Norman, A. J. Ridley, and A. Koffer. 1995. The small GTPases rac and rho as regulators of secretion in mast cells. Curr. Biol. 5:68-73.
- Qiu, B., C. Pothoulakis, I. Castagliuolo, Z. Nikulasson, and J. T. LaMont.

1996. Nitric oxide inhibits rat intestinal secretion by *Clostridium difficile* toxin A but not *Vibrio cholerae* enterotoxin. *Gastroenterology* **111**:409-418.
40. Rocha, M. F. G., M. E. T. Maia, L. R. P. S. Bezerra, D. M. Lyerly, R. L. Guerrant, R. A. Ribeiro, and A. M. Lima. 1997. *Clostridium difficile* toxin A induces the release of neutrophil chemotactic factors from rat peritoneal macrophages: role of interleukin-1 β , tumor necrosis factor alpha, and leukotrienes. *Infect. Immun.* **65**:2740-2746.
41. Salvemini, D., E. Masini, A. Pistelli, P. F. Mannaioni, and J. Vane. 1991. Nitric oxide: a regulatory mediator of mast cell reactivity. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **17**:S258-S265.
42. Sartor, R. B. 1994. Cytokines in intestinal inflammation: pathophysiological and clinical considerations. *Gastroenterology* **106**:533-541.
43. Shore, P. A., A. Burkhalter, and V. H. Cohn. 1959. A method for the fluorometric assay of histamine in tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **127**:182-186.
44. Torres, J., E. Jennische, S. Lange, and I. Lonnroth. 1990. Enterotoxins from *Clostridium difficile*: diarrhoeogenic potency and morphological effects in the rat intestine. *Gut* **31**:781-785.
45. Torres, J. F., and I. Lonnroth. 1988. Comparison of methods for the production and purification of toxin A from *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiol. Lett.* **52**:41-46.
46. Torres, J. F., and I. Lonnroth. 1989. Production, purification and characterization of *Clostridium difficile* toxic proteins different from toxin A and from toxin B. *Biochim. Biophys. Acta* **998**:151-157.
47. White, J. R., and F. L. Pearce. 1982. Characteristics of histamine secretion from rat peritoneal mast cells sensitized to the nematode *Nippostrongylus brasiliensis*. *Immunology* **46**:353-359.

Editor: J. T. Barbieri