Universidad Andrés Bello

Facultad de Ciencias de la Vida

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

“Formación de células persistentes por daño en el DNA inducido por vancomicina y metronidazol en *Clostridioides difficile*.”

Memoria de Título presentada como parte de los requisitos para optar al título de Ingeniero en Biotecnología.

Director: Dr. Fernando Gil

Co-Director: Dr. Osvaldo Inostroza

Paulina Fernanda Yáñez Cáceres

Santiago, Chile.

Junio,2024

Universidad Andrés Bello

Facultad de Ciencias de la Vida

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

“Formación de células persistentes por daño en el DNA inducido por vancomicina y metronidazol en *Clostridioides difficile*.”

Memoria de Título presentada como parte de los requisitos para optar al título de Ingeniero en Biotecnología.

Director: Dr. Fernando Gil

Co-Director: Dr. Osvaldo Inostroza

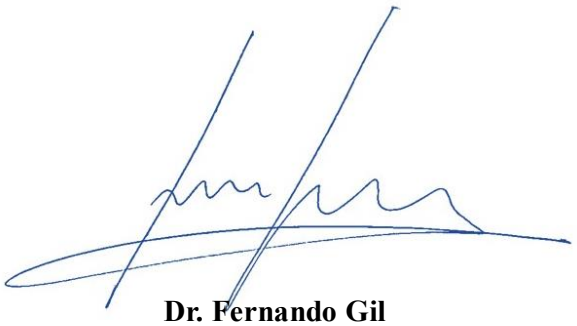
Universidad Andrés Bello

Microbiota Host Interactions & Clostridia Research Group

Paulina Fernanda Yáñez Cáceres

Santiago, Chile.

Junio,2024



Dr. Fernando Gil



Dr. Osvaldo Inostroza

Dedicada a mis padres y hermana.

Gracias por siempre estar.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, debo expresar mi más sincero agradecimiento al Doctor Fernando Gil, por haberme recibido en su laboratorio desde mi primer investigador. Su acompañamiento a lo largo de este extenso proceso no solo ha sido invaluable si no que ha despertado y fortalecido mi interés por la microbiología. Quiero extender mi gratitud de manera muy especial a mi codirector de tesis, Osvaldo Inostroza. Su guía constante, tanto en el ámbito académico como en el personal ha sido fundamental para mi desarrollo. Su aliento me ha impulsado a mejorar continuamente y a dar siempre lo mejor de mí, gracias por ser un mentor y apoyo esencial en este proceso. A mis compañeros de laboratorio, que son parte esencial de mi rutina diaria, les agradezco su ayuda incondicional y por estar presente tanto en los momentos de fracasos como en los de alegría, sin su apoyo este proceso habría sido mucho más difícil.

Agradezco ampliamente a mi familia, a mis padres y hermana, porque siempre tuvieron una palabra de aliento y me dieron fuerzas cuando más las necesitaba. Su apoyo y amor constante e inquebrantable hicieron posible que llegara hasta aquí, gracias por ser mi pilar y mi inspiración. Finalmente, quiero agradecer a mi mejor amiga y a esa persona especial que siempre estuvieron dispuestas a escucharme y ofrecerme su apoyo incondicional. Su presencia y comprensión fueron esenciales para este recorrido.

Índice

RESUMEN 9

ABSTRACT 10

1. INTRODUCCIÓN 11

1.1. *Clostridioides difficile* 11

1.2. Ciclo infectivo de *C. difficile* 12

1.3. Respuesta a estrés por antibióticos. 13

1.4. Células Persistentes 15

HIPÓTESIS. 19

MATERIALES 20

2. MÉTODOS 22

2.1 Cultivo de *C. difficile*. 22

2.2 Curva de crecimiento. 22

2.3 Concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada antibiótico. 22

2.4 Curva de Persistencia. 23

2.5 Microscopia de fluorescencia. 23

2.6 Ensayo Cometa. 24

2.7 Análisis estadístico 24

3. RESULTADOS. 25

3.1. Curva de crecimiento y concentración mínima inhibitoria. (CMI) 25

3.2. Curvas de persistencia. 26

3.3. Inducción de células persistentes por estrés inducido con vancomicina en fase exponencial. 27

Inducción de células persistentes por estrés inducido con vancomicina en fase estacionaria. 29

3.4. Inducción de células persistentes por estrés inducido con metronidazol en fase exponencial. 29

3.5. Inducción de células persistentes por estrés inducido con metronidazol en fase estacionaria. 31

3.6. Evaluación de la actividad metabólica de RNA y la viabilidad celular por microscopia de fluorescencia 33

3.7. Evaluación del metabolismo de RNA y viabilidad celular durante tratamientos con vancomicina y metronidazol en fase exponencial. 35

3.8. Evaluación del metabolismo de RNA y viabilidad celular durante tratamientos con vancomicina y metronidazol en fase estacionaria. 37

3.9. Evaluación de la integridad del ADN de *C. difficile* durante tratamientos con vancomicina y metronidazol. 39

4. DISCUSIÓN 41
5. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES 48
6. REFERENCIAS 49

ABREVIATURAS

Ácido desoxirribonucleico: ADN

Células viables pero no cultivables: VBNC

Clostridioides Difficile: C. difficile

Ácido etilendiaminotetraacético: EDTA

Escherichia coli: E. coli

Isotiocianato de fluoresceína: FITC

Infección de *Clostridioides difficile*: ICD

Ioduro de Propidio: PI

Instituto de Salud Pública: ISP

Staphylococcus aureus: S. aureus

Tioflavina – T: Tio-T

Tratamiento de lisis: TL

Isotiocianato de tetrametilrodamina: TRITC

Ancho completo a media altura: FWHM

RESUMEN

Clostridioides difficile es un bacilo Gram positivo, anaerobio estricto, formador de esporas el cual es conocido como el causante de enfermedades nosocomiales como la diarrea asociada a antibióticos. Las enfermedades causadas por la infección de *C. difficile* (ICD), que van desde leves a potencialmente mortales, se propagan principalmente por la vía fecal-oral y son tratados principalmente con vancomicina y metronidazol. Ambos corresponden a antibióticos bactericidas, en el caso de vancomicina actúa a nivel de pared celular bacteriana mientras que el metronidazol afecta a nivel de ADN bacteriano, sin embargo, estudios indican un mecanismo común de muerte para los antibióticos bactericidas, correspondería al estrés oxidativo/nitrosativo, que incluye entre otros blancos el ADN. *C. difficile*, entre sus formas de respuesta al estrés, tiene como mecanismo propuesto y estudiado, la formación de biopelículas. Estas estructuras extracelulares se han observado en otras bacterias que contienen un subtipo celular el cual se ha responsabilizado de la tolerancia al estrés. Este subtipo celular se denomina células persistentes, las cuales son variantes transitorias de una población genéticamente homogénea y cuyo metabolismo se encuentra disminuido al igual que su división celular, lo que le permite tolerar distintos mecanismos de estrés. A partir de los expuesto, se plantea que el daño en el ADN producido por vancomicina y metronidazol inducen la formación de células persistentes en *Clostridioides difficile.* Por consiguiente, se evaluó si los tratamientos con vancomicina y metronidazol eran capaces de inducir la formación de células persistentes mediante un enriquecimiento de este subcultivo con un tratamiento de lisis. Además, se determinó la viabilidad y el metabolismo del RNA por medio de una doble tinción (Tioflavina-T e Ioduro de Propidio) donde se confirmó la presencia de células vivas con metabolismo de RNA disminuido, lo que sugiere la presencia de la subpoblación persistente. Por otro lado, se encontró que la cantidad de bacterias persistentes inducidas con vancomicina son de un porcentaje cercano al 12% lo cual representa una amenaza clínica. Para evaluar si la inducción de esta subpoblación estaba dada por el daño en el ADN, se realizó un ensayo cometa, el cual permitió determinar que ambos antibióticos estarían provocando daño en el ADN bacteriano, sugiriendo que este podría ser el mecanismo por el que se estarían induciendo la expresión de este fenómeno.

ABSTRACT

Clostridioides difficile is a Gram-positive bacillus, strictly anaerobic, and spore-forming, known as the causative agent of nosocomial diseases, such as antibiotic-associated diarrhea. Diseases caused by C. difficile infection (CDI), which range from mild to potentially life-threatening, are primarily spread via the fecal-oral route and are mainly treated with vancomycin and metronidazole. Both are bactericidal antibiotics; vancomycin acts on the bacterial cell wall, while metronidazole affects the bacterial DNA. However, studies indicate a common mechanism of death for bactericidal antibiotics, which corresponds to oxidative/nitrosative stress, including DNA among other targets. One of C. difficile's stress response mechanisms is the formation of biofilms. These extracellular structures have been observed in other bacteria containing a cellular subtype responsible for stress tolerance. This cellular subtype is known as persister cells, which are transient variants of a genetically homogeneous population with reduced metabolism and cell division, allowing them to tolerate various stress mechanisms. Based on this, it is hypothesized that DNA damage caused by vancomycin and metronidazole induces the formation of persister cells in *Clostridioides difficile*. Consequently, it was evaluated whether treatments with vancomycin and metronidazole were capable of inducing the formation of persister cells through enrichment of this subculture with a lysis treatment. Additionally, the viability and RNA metabolism were determined through a double staining (Thioflavin-T and Propidium Iodide), confirming the presence of live cells with reduced RNA metabolism, suggesting the presence of the persister subpopulation. Furthermore, it was found that the number of persister bacteria induced with vancomycin is close to 12%, representing a clinical threat. To assess whether the induction of this subpopulation was due to DNA damage, a comet assay was performed, determining that both antibiotics cause bacterial DNA damage, suggesting that this could be the mechanism inducing the expression of this phenomenon.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Clostridioides difficile*

Clostridioides difficile (*C. difficile*) es una bacteria anaerobia estricta con forma de bacilo (Figura 1). Es Gram positiva y tiene la capacidad de formar esporas y producir toxinas. Además, es una de las principales causas de infecciones nosocomiales, como la diarrea asociada al uso de antibióticos [1]. Las enfermedades causadas por la infección por *C. difficile* (ICD) varían desde diarrea leve hasta condiciones potencialmente mortales, como el megacolon tóxico y la colitis pseudomembranosa [2]. En la última década, se ha observado un aumento significativo en los casos de ICD a nivel mundial, especialmente en Estados Unidos y Canadá, con mayores tasas de recurrencia y mortalidad [3]. Estos brotes se han asociado principalmente al ribotipo 027, cuya primera cepa secuenciada fue la R20291, convirtiéndose en una de las cepas de laboratorio más estudiadas [4]. Otra cepa ampliamente investigada es la R20291 Δ*spo0A*, que presenta una mutación en el gen regulador maestro de la esporulación, lo que la convierte en un control útil para descartar la formación de esporas en ciertos estudios [5]. Según el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP), entre los años 2013 y 2018 se registraron 1687 muestras positivas para *C. difficile*, representando un 72,8% de las muestras recibidas. En 2015, se observó un aumento significativo, con un 78,5% de muestras positivas para este patógeno. Al igual que los brotes en Estados Unidos, estos casos en Chile estaban relacionados con la cepa R20291. [6]

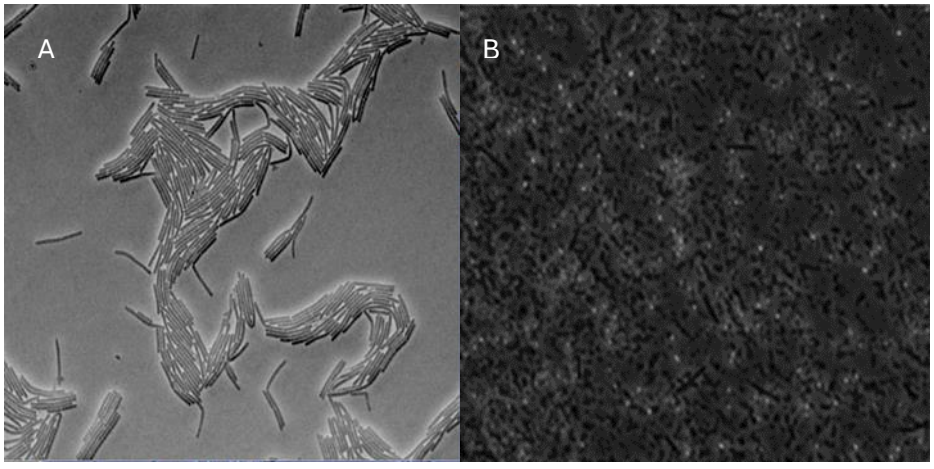


Figura 1. *Clostridioides difficile*, cepa R20291 bajo microscopio de contraste de fases. A. Se observa la forma de bacilo de *C. difficile* crecida con glucosa 0.2%, fructosa 0.2% y taurocolato al 0.2% en un cultivo ON de 16 horas. **B.** Se observa las esporas como estructuras brillantes dentro y fuera de los bacilos, en un cultivo de 48 horas. Microbiota Host Interactions & Clostridia Research Group, 2020.

1.2. Ciclo infectivo de *C. difficile*

La bacteria *C. difficile* se propaga principalmente mediante la ruta fecal-oral [7,8]. En este mecanismo de transmisión, las esporas presentes en las heces de pacientes infectados pueden diseminarse a través de las manos de pacientes y profesionales de la salud, siendo estas las fuentes primarias de contagio. Sin embargo, existen otras posibles fuentes de infección, como los animales o el entorno ambiental [7,9]. Durante este proceso, las esporas son ingeridas oralmente y, al enfrentarse al bajo pH del estómago, logran resistir y pasar al duodeno, donde germinan en pacientes que padecen disbiosis, ya sea por el uso de antibióticos para otra patología o por enfermedades intestinales. Al germinar, se transforman en células vegetativas capaces de colonizar y multiplicarse en el colon, y finalmente son excretadas en forma de esporas por el paciente durante la infección [10] (Figura 2). La patogenicidad de *C. difficile* está estrechamente relacionada con la expresión de factores de virulencia, como la producción de diferentes toxinas. Entre estas toxinas se encuentran la toxina A, la toxina B [11] y, en algunas cepas, la toxina binaria de *C. difficile* (CDT) [12]. Estas toxinas actúan sobre las células epiteliales del colon, modificando químicamente mediante glucosilación a las proteínas RHO, provocando así la muerte celular y la pérdida de la función de la barrera intestinal, lo que genera rasgos distintivos de la enfermedad [13,14]. La incidencia de la enfermedad causada por *C. difficile* está influenciada por diversos factores, como el sistema inmunológico del individuo infectado [15], la edad avanzada [16] y la disbiosis de la microbiota intestinal, siendo este último el factor más destacado [17] . La disbiosis debilita la resistencia contra la colonización por esta bacteria específica. El uso de antibióticos, en particular clindamicina [18], penicilinas, cefalosporinas [19] y fluoroquinolonas [20] , favorece la infección al perturbar el equilibrio de la microbiota comensal.

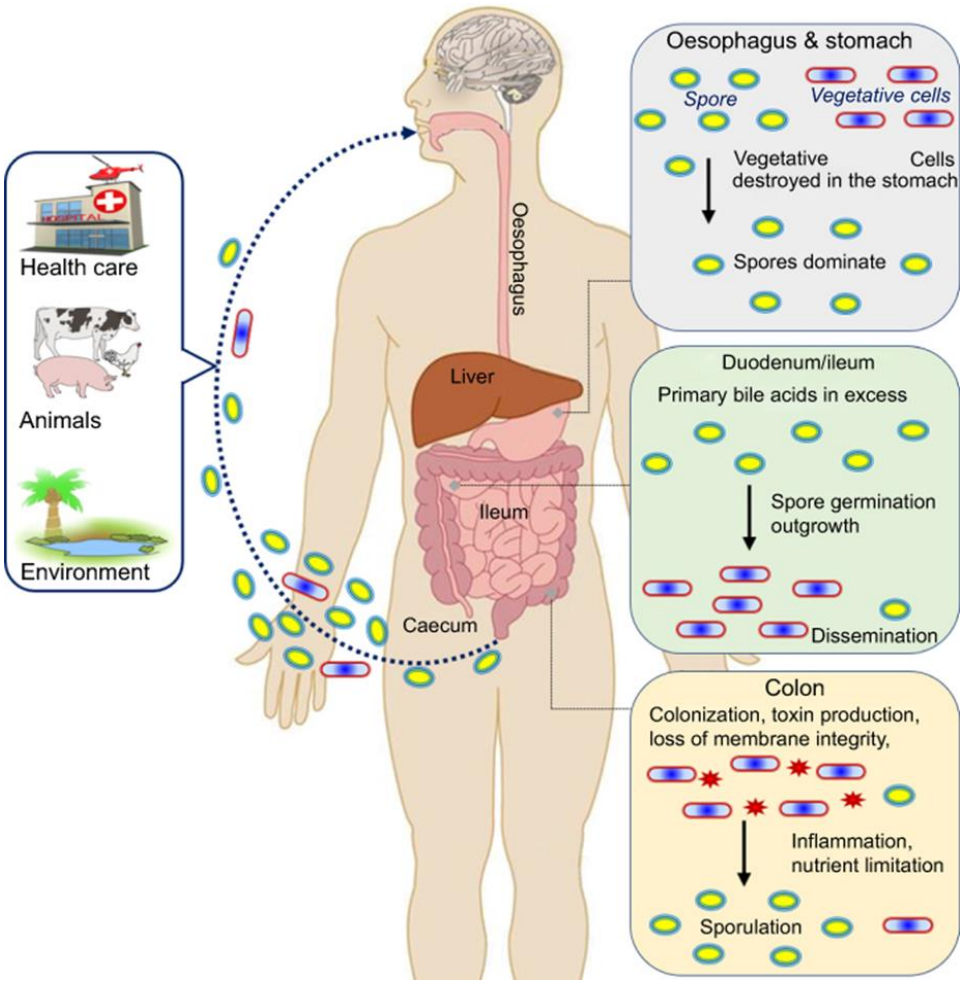


Figura 2. Ciclo infectivo de *C. difficile*. Comienza con la ingesta oral de esporas y células vegetativas provenientes de centros de atención médica, animales o ambiente, las esporas sobreviven al paso por el estómago, mas no las células vegetativas las cuales se ven afectadas por el pH del estómago. Las esporas continúan por el duodeno/ íleon donde germinan en pacientes que padecen una disbiosis, luego la célula vegetativa se disemina y así coloniza el colon, lugar donde se producen las toxinas que dañan el epitelio intestinal causando los síntomas clínicos asociados a la enfermedad. Imagen obtenida de Giau, 2019. [9]

1.3. Respuesta a estrés por antibióticos.

El manejo antimicrobiano de la infección por *C. difficile* se basa en el uso de dos fármacos clásicos: la vancomicina y el metronidazol. Sin embargo, en los últimos años se ha añadido el uso de fidaxomicina [21]. Aunque la fidaxomicina ha demostrado ser más eficaz contra *C. difficile* en comparación con la vancomicina y el metronidazol, tanto en la etapa inicial como en la primera recurrencia o en infecciones no graves [22], estos dos últimos antibióticos siguen siendo el tratamiento de primera línea. Estudios indican que, aunque

la eficacia de la fidaxomicina es similar a la de la vancomicina, su costo es significativamente más alto, lo que es un factor a considerar en el tratamiento de la infección por *C. difficile* [23]. Por lo tanto, debido a su menor costo y a la extensa experiencia clínica acumulada, la vancomicina y el metronidazol se mantienen como los antibióticos de primera elección para el tratamiento inicial de la infección, mientras que la fidaxomicina se reserva para los casos más graves, dada su mayor efectividad en situaciones clínicas complicadas [24]. La vancomicina es un antibiótico glucopéptido de origen natural, uno de los más antiguos utilizados para tratar infecciones por bacterias Gram positivo, ya que inhibe la polimerización de peptidoglicanos en la pared celular bacteriana [25]. Este antimicrobiano se une a la terminal D-alanil D-alanina, inhibiendo las enzimas glucosiltransferasa y el transportador de fosfolípidos, lo que impide la síntesis y polimerización de los compuestos N-acetilmurámico (NAM) y N-acetilglucosamina (NAG) en la capa de peptidoglicano, debilitando la pared celular y causando la fuga del contenido intracelular [26,27]. Por otro lado, el metronidazol es un derivado sintético de la azomicina [28] que ejerce su acción antimicrobiana desestructurando el ADN. Una vez dentro de la célula por difusión pasiva, el metronidazol es reducido químicamente por proteínas de transporte de electrones de bajo potencial redox, específicas del metabolismo anaerobio. Esta reducción activa el metronidazol, formando aniones de nitroimidazol inestables que reaccionan con el ADN, creando aductos dañinos para la bacteria [29]. Tanto la vancomicina como el metronidazol son antibióticos bactericidas, es decir, matan al microorganismo responsable de la infección [30]. Además, estimulan la formación de radicales hidroxilos en la bacteria, independientes de la interacción fármaco-objetivo [31], los cuales pueden reaccionar con moléculas orgánicas e inorgánicas, como ADN, proteínas, lípidos y carbohidratos, causando daños graves a la célula [32]. Cuando *C. difficile* se expone a antibióticos como los mencionados, se desencadenan varios mecanismos de respuesta al estrés para su supervivencia [33]. Uno de estos mecanismos es la formación de esporas, estructuras altamente resistentes a compuestos como fenol, cloroformo, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y condiciones como altas temperaturas [34]. Otra estrategia es la formación de biopelículas, estructuras adheridas a superficies inertes o vivas que protegen a las células bacterianas [35]. Como se muestra en la Figura 3, este mecanismo de supervivencia se debe a la formación de biopelículas, dentro de las cuales se desarrollan células persistentes, un fenómeno observado en bacterias como *Escherichia coli* [36]. Además, un estudio en *C. difficile* sugiere que la formación de biopelículas puede ser crucial para la persistencia de este patógeno [37].

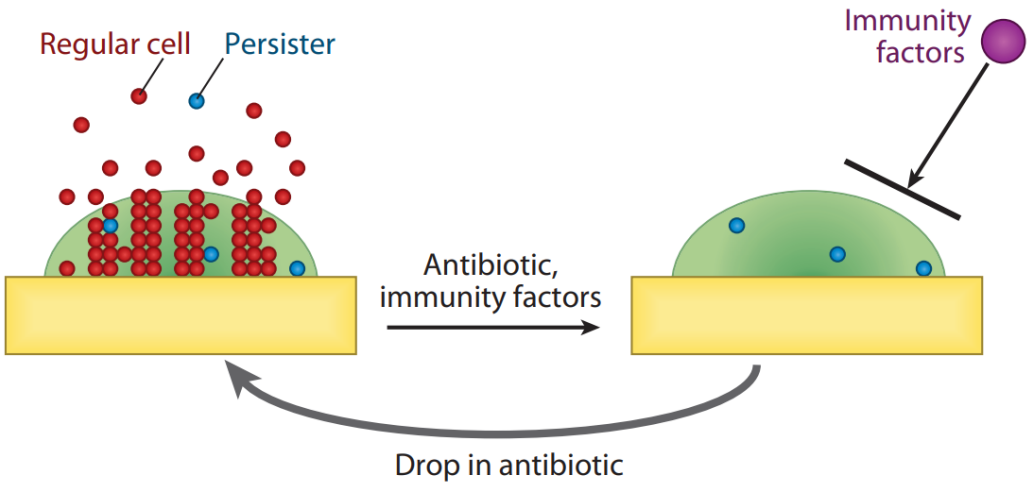


Figura 3. Modelo de células persistente alojadas en biopelícula. En el diagrama se puede observar cómo el mecanismo de supervivencia de las biopelículas corresponde a; en el caso de los factores inmunes, la protección física que forma la matriz extracelular y en el caso de antibióticos, las células persistentes serían las responsables de la supervivencia al interior de la biopelícula. Imagen obtenida de Lewis, 2010 [38]

1.4. Células Persistentes

Las células persistentes bacterianas son variantes transitorias de una población genéticamente homogénea, caracterizadas por presentar un metabolismo disminuido y la ausencia de división celular [39]. Esta característica les permite tolerar distintos tipos de estrés, incluyendo la exposición a altas concentraciones de antibióticos bactericidas que serían letales para las células metabólicamente activas de la misma población [40]. Esto las diferencia de las células resistentes, que han adquirido mutaciones genéticas que les confieren resistencia a los antibióticos [41]. Para estudiar este fenómeno, se realizan curvas de muerte dependientes de la dosis de antimicrobiano, que exhiben un comportamiento bifásico con dos inclinaciones distintas [42]. En la primera fase, muere la mayoría de la población sensible al antimicrobiano, mientras que, en la segunda fase, se alcanza una meseta en el recuento de bacterias viables, donde se encuentran las bacterias persistentes que han entrado en un estado de latencia o dormancia metabólica [43] (Figura 4). Entre los tipos de células persistentes, se encuentran la persistencia inducida y la persistencia estocástica. La persistencia inducida es la más común y ocurre como respuesta a una señal o factor de estrés, como la escasez de nutrientes [44], el alto número de células [45] o la administración de un fármaco [46], provocando una subpoblación de células dormantes que persisten incluso después de eliminar el factor estresante. En cambio, la persistencia estocástica es menos frecuente y ocurre de manera espontánea en condiciones de equilibrio, sin necesidad de un desencadenante [47]. Para investigar las células persistentes, es necesario enriquecer el

cultivo con este subtipo celular, lo cual se realiza usualmente mediante la técnica de clasificación celular (*cell sorting*) [48,49]. Sin embargo, este método no es aplicable a *C. difficile* debido a que implica una exposición prolongada a altas concentraciones de oxígeno, perjudicial para esta bacteria por su naturaleza estrictamente anaerobia [1]. Se ha descubierto un método alternativo para enriquecer cultivos con células persistentes que combina la lisis alcalina y enzimática dirigida a la membrana celular, disminuyendo la probabilidad de activar mecanismos de respuesta al estrés debido a su rapidez en comparación con métodos convencionales [50]. Además, dado que las células persistentes tienen un metabolismo disminuido, se ha implementado el uso de sondas fluorescentes como la Tioflavina-T (cloruro de 4-(3,6-dimetil-1,3-benzotiazol-3-io-2-il)-N,N-dimetilanilina) para monitorear el metabolismo del RNA, lo que permite visualizar bacterias persistentes y de crecimiento activo [51]. Esto es útil para el estudio de esta subpoblación. Un estudio reciente revela la relación entre el daño en el ADN y la formación de células persistentes [52]. Este daño en el ADN se puede evaluar mediante electroforesis en gel unicelular, conocido como ensayo cometa, que consiste en inmovilizar las células en una capa de agarosa, lisarlas para liberar los nucleoides, y realizar una electroforesis en pH alcalino que permite que los fragmentos de ADN dañados migren y formen una estructura similar a la de un cometa [53]. En nuestro laboratorio, se demostró la existencia de células con comportamiento de persistentes en *C. difficile* tras el tratamiento con antibióticos como pefloxacino, cefalexina y vancomicina, evidenciado por las curvas bifásicas descritas anteriormente (Figura 5). Además, para trabajar con la forma vegetativa de *C. difficile*, el cultivo fue enriquecido con glucosa, fructosa y taurocolato para inhibir la esporulación [54]. Dada la presencia de células persistentes en *C. difficile*, que demuestran una supervivencia al estrés producido por antimicrobianos, y considerando la función bactericida de la vancomicina y el metronidazol, se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿ La formación de células persistentes es inducida en *Clostridioides difficile* como consecuencia del daño en el ADN producido por vancomicina y metronidazol?

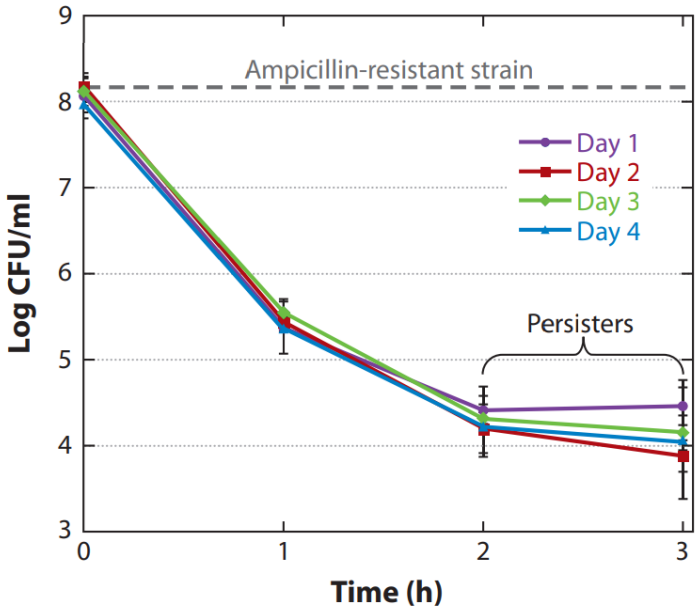


Figura 4. Curva de persistencia con comportamiento bifásico. Estudio realizado en *E. coli*, donde se aplicó ampicilina en una concentración de 10 veces el CMI, luego de observar el plateu de persistencia, se recolectaron las células y se recrecieron y nuevamente fueron expuestas a ampicilina en diferentes días. En las diferentes ocasiones se logra observar el comportamiento de muerte bifásica, en donde se puede encontrar el plateu de células persistentes. La línea punteada indicia como se comportaría una célula resistente (). Imagen obtenida de Lewis, 2010.[38]

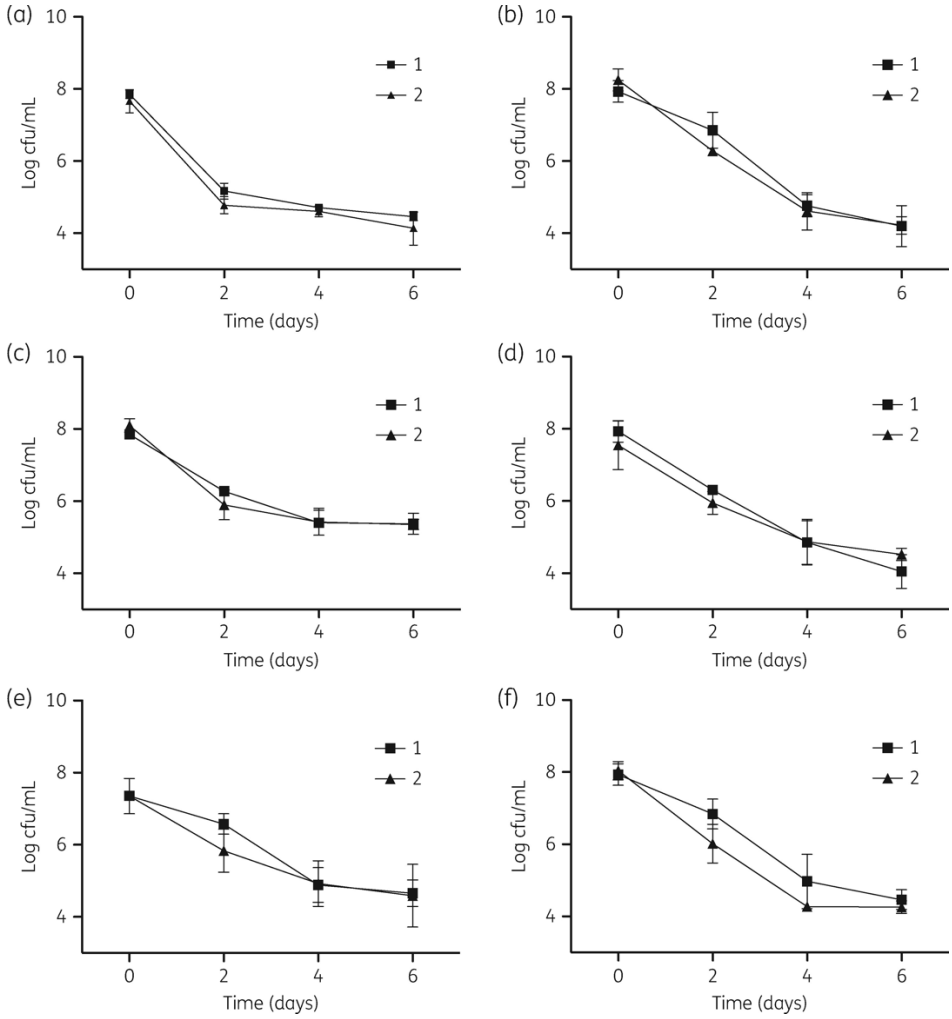


Figura 5. Curva tipo persistente en *C. difficile*. Cultivo en fase estacionaria de crecimiento de cepas R20291 WT (a, b y c) y la cepa R20291 Δ*spo0A* (d, e y f) tratadas con 2,5 veces el CMI de pefloxacina (a y d), 10 veces el CMI de cefalexina (b y e) y por último con 10 veces el CMI de vancomicina (c y f). Demostrando la formación del plateu de células persistencia desde los 4 días de tratamiento. Imagen obtenida de Álvarez, 2018 [54]

HIPÓTESIS.

La exposición a vancomicina y metronidazol induce la formación de células persistentes *en Clostridioides difficile* como consecuencia del daño producido en el ADN.

OBJETIVO GENERAL.

Evaluar el efecto de vancomicina y metronidazol en la inducción de la formación de células persistentes y producción de daño en el ADN en *Clostridioides difficile*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Objetivo específico 1. Determinar la inducción de células persistentes en *C. difficile* tras la administración de tratamientos con vancomicina y metronidazol respectivamente.

- Objetivo específico 2. Evaluar la presencia de daño en el ADN en *C. difficile* por tratamientos con vancomicina y metronidazol.

MATERIALES

- BHI broth BD Difco
- LB broth BD Difco
- Cisteína Merck
- AGAR BD Difco
- Agarosa Merck
- Fructosa Merck
- Glucosa Merck
- Taurocolato Merck
- Vancomicina Sigma
- NaOH Merck
- SDS Merck
- Placas Petri plásticas Winkler
- Placas Petri de vidrio Winkler
- Agua destilada
- PBS 10x Merck
- Placas micro tituladoras de 96 pocillos s/ tratamiento Invitrogen
- Micropipetas p1000, p200, p20, p2
- Estufa de placas a 37 ºC
- Shaker para tubos cónicos a 37 ºC
- Puntas amarillas (p200 y p20)
- Puntas azules (p1000)
- Puntas blancas (p20 y p2)
- Rastrillos plásticos desechables

- Asas plásticas desechables
- Tubos cónicos de 15 mL
- Tubos cónicos de 50 mL
- Tubos cónicos de 1,5 mL
- Tubos cónicos de 2 mL
- Tubos cónicos 0,6 mL
- Micro centrifuga para tubos de 1,5 y 2 mL de 16.000 xg
- Multicanal p200
- Benzalconio
- Cámara anaeróbica BACTRON EZ (Shellab)
- Cilindro de gas N_2 (99,9%)
- Cilindro de gas mezcla de gases (CO_2 5%, H_2 10% N_2 85%)
- Autoclave
- Tioflavina-T Thermocientific
- Ioduro de propidio Invitrogen

2. MÉTODOS

2.1 Cultivo de *C. difficile*.

El cultivo de *Clostridioides difficile* se realizó para estudiar los mecanismos de persistencia a antibióticos en la cepa hipervirulenta R20291 WT y Δ*spo0A*. Estas cepas se sembraron en medio BHIS (infusión de cerebro-corazón suplementado con extracto de levadura) y fue suplementada con taurocolato, glucosa y fructosa al 0,1%, para eliminar esporas del cultivo y trabajar sólo con la célula vegetativa. Además, se utilizó la cepa R20291 Δ*spo0A* como control ya que es una cepa que presenta una alteración en el gen que codifica el factor de transcripción de esporulación por lo cual no esporula [5]. Los cultivos son crecidos a 37°C en una cámara anaeróbica, BactronEZ (Shellab), cuya mezcla de gases es de 5% de CO_2, 5% de H_2 y finalmente 90% de N_2 [55].

2.2 Curva de crecimiento.

Para entender la cinética de crecimiento, es crucial realizar una curva de crecimiento, ya que esta técnica permite evaluar el comportamiento y la viabilidad de cualquier microorganismo. Para comenzar con la curva de crecimiento se necesita de un cultivo ON (16 hrs) previo de ambas cepas (R20291 y R20291 Δ*spo0A*) del cual se utiliza 100 µL y se agregó a un tubo cónico con 10 mL de medio BHIs. Una vez se tiene el cultivo, se toman alícuotas de 10 µL cada 1 hora las que fueron sembradas en BHIs agar en diluciones seriadas 1:10 incluyendo el tiempo 0 el cual fue el INPUT, posteriormente se dejó las placas incubando a 37 °C. Se realizaron por triplicado biológicos.

2.3 Concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada antibiótico.

Establecer la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para antibióticos es fundamental en los estudios de persistencia bacteriana, ya que permite determinar la dosis mínima de un antibiótico requerida para detener el crecimiento visible de una bacteria. Para llevar a cabo dicho ensayo se agregó vancomicina (10 mg/mL) o metronidazol (5 mg/mL) según corresponda a tubos eppendorf de 1.5 mL realizando diluciones seriadas 1:10 en un total de 6 diluciones, luego se agregó 20 µL a una placa de 96 pocillos sin tratar, donde en el primer pocillo se agregó el stock de antibiótico y en el último un control con el solvente usado para cada antibiótico. Posteriormente se adicionó una alícuota del cultivo de la cepa R20291 de 180 µL el cual se encontraba a una DO = 0,02, el cual se preparó desde un cultivo ON (16 horas antes). Para esto se llevó a cabo tres réplicas tanto técnicas como biológicas ya sea para vancomicina como para metronidazol. La placa

se dejó incubar durante 24 horas a 37 °C. Se cultivó como fue descrito en la sección anterior y se realizó por triplicado biológico.

2.4 Curva de Persistencia.

Se llevó a cabo una curva de persistencia para evaluar y caracterizar el fenómeno de persistencia bacteriana en respuesta a la exposición a antibióticos, para ello la bacteria se utilizó con un crecimiento ON, se tomó una alícuota de 20 µL y se sembró en BHIS agar por diluciones (1:10). Luego se agregó 10 veces la concentración del CMI tanto de vancomicina como de metronidazol y se dejó actuar durante 60 minutos para el primero y 30 minutos para el segundo antibiótico. Transcurrido ese tiempo se tomó 20 µL de cultivo con tratamiento y se sembró nuevamente en diluciones. Se agregó el tratamiento de lisis (NaOH 1mM y SDS 0,005%) [50], posteriormente se sembró en diluciones a distintos tiempos 2, 10, 15, 30 y 60 minutos respectivamente. Se realizó este proceso por triplicado para cada antibiótico y se utilizó además la cepa R20291 Δ*spo0A* como control. Las placas sembradas fueron incubadas dentro de la estufa a 37 °C durante 24 horas para finalmente contar las colonias en cada tiempo realizado. Dicho proceso se llevó a cabo dentro de la cámara anaeróbica. El experimento se realizó por triplicado bilógico.

2.5 Microscopía de fluorescencia.

Una vez se tiene un cultivo enriquecido en células persistentes gracias al tratamiento de lisis inducidas por ambos antibióticos, se comprobó el metabolismo de estas bacterias mediante microscopía de fluorescencia por lo que el cultivo se retiró de la cámara anaeróbica y se realizó una centrifugación a 16.000 r.p.m durante 5 minutos. Luego se descartó el sobrenadante y se realizó un lavado TE (Tris 50 mM, EDTA10 mM; pH 8), se agregó las tinciones de Ioduro de Propidio (PI) a 10 µg/mL y Tioflavina- T (Tio-T) a 250 µM y se dejó incubar durante 15 minutos en obscuridad. Posteriormente se realizó otro lavado con TE para luego cargar un volumen de 5 µL en un portaobjeto, se añadió el cubreobjeto y se observó bajo el microscopio de fluorescencia Olympus con filtro Filtros FITC (isotiocianato de fluoresceína) con una longitud de onda central de 475 nm y un ancho de banda completo a media altura (FWHM) de 35 nm y TRITC (isotiocianato de tetrametilrodamina) con una longitud de onda central de 542 nm y un FWHM de 20 nm y cámara Qimaging Retiga 6, las imágenes fueron analizadas en el programa Ocular y posteriormente en el software ImageJ.

2.6 Ensayo Cometa.

El ensayo cometa se utilizó para visualizar el daño en el ADN de las células persistentes previamente aisladas e inducidas por vancomicina o metronidazol. Este ensayo consiste en la aplicación de diferentes capas de agarosa: la primera capa es de agarosa al 1%, la segunda es de agarosa al 0,5%, la tercera capa incluye agarosa al 0,5% y 2 µL de bacteria, y la cuarta y última capa consta de agarosa al 0,5%, 5 µg de ARNasa, 1 mg/mL de lisozima y 0,25% de SDS. Cada capa se incuba durante 15 minutos. Luego se realiza la lisis celular (con 1% de Triton X-100, 2,5 M de NaCl, 100 mM de EDTA, 10 mM de Tris pH 10 y 1% de SDS) y posteriormente la lisis enzimática (con 2,5 M de NaCl, 10 mM de EDTA, 10 mM de Tris pH 7,4 y 0,6 mg/mL de proteinasa K). El portaobjetos con ambos tratamientos de lisis se sometió a una electroforesis durante 15 minutos a 20 V, luego se lavó con acetato de amonio 1 M y posteriormente con etanol absoluto. Finalmente, se agregó ioduro de propidio disuelto en DMSO al 0,5% y se visualizó bajo un microscopio de fluorescencia Olympus con filtro TRITC, con una longitud de onda central de 542 nm y un FWHM de 20 nm y cámara Qimaging Retiga 6. Las imágenes fueron analizadas con el programa Ocular y posteriormente con el software ImageJ.

2.7 Análisis estadístico

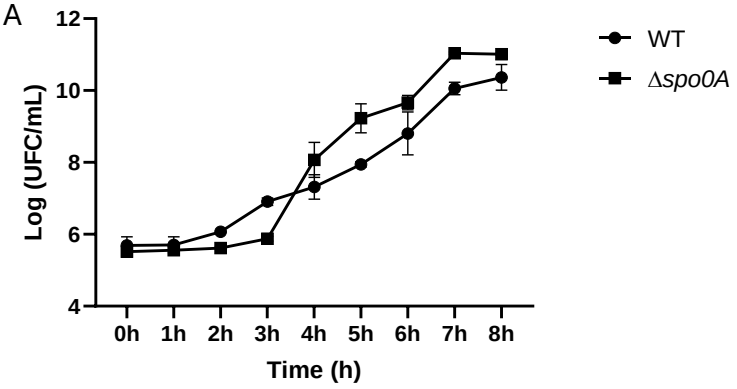
Se uso el software GraphPad para graficar y analizar los datos mediante ensayos estadísticos como ANOVA con ensayos post hoc de Sidak y Tukey [57].

3. RESULTADOS

3.1. Curva de crecimiento y concentración mínima inhibitoria. (CMI)

Antes de comenzar a trabajar con *C. difficile* fue necesario realizar experimentos de control de crecimiento, uno de estos fue la curva de crecimiento, la cual ayudó a entender la cinética de crecimiento de este microorganismo mediante el recuento de unidades formadoras de colonias por mililitro de cultivo (UFC/mL). Como se observa en la Figura 6A tanto la cepa R20291 y R20291 Δ*spo0A* presentan un comportamiento de crecimiento similar. Entre las 4 y 5 horas de crecimiento ambos cultivos llegan a un estadio de crecimiento de log 8, el cual es indicativo de fase exponencial de crecimiento y es una de las dos fases de crecimiento que se usarán para evaluar la formación de células persistentes. También se llevó a cabo la evaluación de la concentración mínima inhibitoria de los antibióticos vancomicina y metronidazol. Para esto se tiene que la CMI de vancomicina en la cepa R20291 y su mutante en *spo0A* es de 10 µg/mL, asimismo, la CMI de metronidazol en las mismas cepas es de 0,5 µg/mL. Se usarán estos datos para utilizar concentraciones sobre estos valores, como esta reportado para otras bacterias, para la inducción de la formación de células persistentes.

A



B

Antibiótico	WT	*Δ spo0A*
Vancomicina	10 µg/mL	10 µg/mL
Metronidazol	0,5 µg/mL	0,5 µg/mL

Figura 6. Estudios previos en *C. difficile*. A. Curva de crecimiento de cepas R20291 y R20291 Δ*spo0A* con suplementos (Glucosa, fructosa y taurocolato al 0,2%). Se tomaron alícuotas en los tiempos señalados para posteriormente realizar diluciones 1:10 que fueron sembradas en BHIs agar e incubadas a 37 °C durante 16 horas, para posteriormente contar colonias. **B.** CMI de vancomicina y metronidazol en las dos cepas de estudio, R20291 y R20291 Δ*spo0A*.

3.2. Curvas de persistencia.

Como se menciona previamente, Cañas – Duarte 2014, con su protocolo dirigido a la membrana bacteriana, permite enriquecer el cultivo con células persistentes ya que, al utilizar soluciones líticas, se busca eliminar las células en crecimiento normal, dejando intactas las células persistentes, lo que permite su posterior estudio y caracterización. Por este motivo, se evaluó la respuesta de *C. difficile* a dicho tratamiento y como se puede apreciar en la Figura 7 en A no se logra observar una curva con el comportamiento bifásico tanto para la cepa WT y la cepa Δ*spo0A*, puesto que el límite de detección nos indica que no fue posible recuperar células, estos cultivos se encontraban sin suplementar con glucosa, fructosa y taurocolato. Siguiendo esta idea, se decidió evaluar con un cultivo libre de esporas (suplementado con glucosa, fructosa y taurocolato) el cual presentó el comportamiento típico de células persistentes (Figura 7B). también se realizó este ensayo con las células que fueron aisladas con el tratamiento de lisis, las cuales fueron resembradas con el propósito de descartar la presencia de células resistentes ya que, si logran recuperar su capacidad de crecimiento y división luego del estrés aplicado, y al ser sometidas nuevamente al tratamiento presentan el comportamiento persistente, se confirma que constituían a dicha subpoblación de células dormantes. La cepa R20291 y su respectiva cepa resucitada efectivamente presentó el comportamiento bifásico (Figura 7C), lo mismo ocurrió con la cepa mutante Δ*spo0A* y su respectiva cepa resucitada (Figura 7D). Esto sugiere que es posible enriquecer el cultivo de *C. difficile* con células persistentes utilizado el tratamiento de lisis, después de 10 minutos de tratamiento ya que se puede observar el plató de persistencia (Figura 7B, C y D).

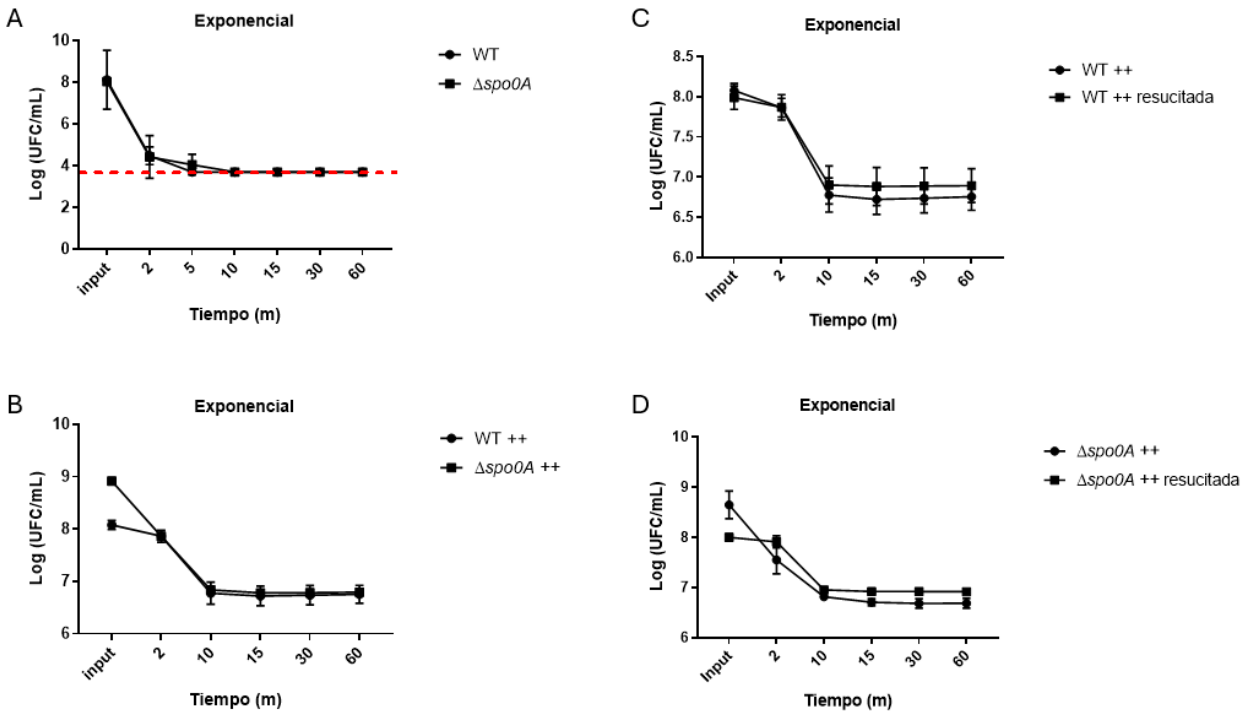


Figura 7. Respuesta de *C. difficile* R20291 ante tratamiento de lisis. En cultivo exponencial aproximadamente en log 8, se realizó el tratamiento de lisis a las cepas R20291 WT y la cepa R20291 Δ*spo0A*, tomando alícuotas en los tiempos señalados para sembrar en diluciones seriadas 1:10 y posteriormente contar colonias. Este experimento se repitió para respectivas células resucitadas, revividas desde las diluciones correspondientes al tiempo 60 minutos. N =3. (++: cepas suplementadas con glucosa 0,2%, fructosa 0,2% y taurocolato 0,2%)

3.3. Inducción de células persistentes por estrés inducido con vancomicina en fase exponencial.

Para realizar la curva de persistencia inducida por vancomicina, en primer lugar, se debe estandarizar parámetros en cuanto a cantidad del antibiótico sobre el CMI y el tiempo de exposición de este. Como un estudio previo indica que con 10 veces el CMI de vancomicina se logra observar un comportamiento tipo persistente durante la fase estacionaria de crecimiento [54] se decidió utilizar esta concentración (100 µg/mL) a distintos tiempos de exposición, luego se utilizó el tratamiento de lisis durante 20 minutos con el fin de enriquecer el cultivo y se evaluó la supervivencia del patógeno (Figura 8). De acuerdo con el porcentaje de supervivencia, no se observan diferencias significativas por lo que se decidió utilizar un tratamiento estándar de 1 hora con tratamiento de vancomicina, 10 veces la concentración del CMI.

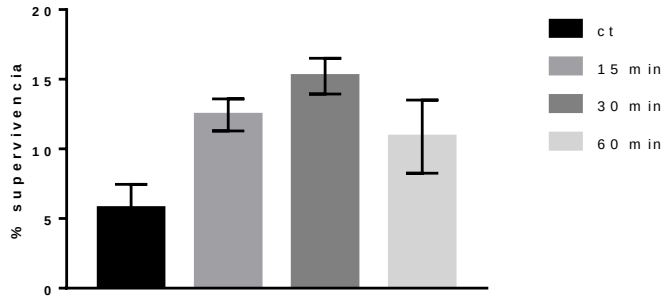


Figura 8. Supervivencia de *C. difficile* R20291 ante diferentes tiempos de vancomicina 10 veces el CMI. Se utilizo un cultivo en fase estacionaria (ON 16 horas), el cual se trato con una concentración 10 veces el CMI de vancomicina, luego se tomaron alícuotas a los 0(ct), 15, 30 y 60 minutos, para ser enriquecidos en células persistentes con el tratamiento de lisis. N= 3, one-way anova con el test post hoc Sidak, no se observaron diferencias significativas.

Como se muestra en la Figura 9, se observa como en ambas cepas se obtiene el plató de persistencia, al inducir durante 60 minutos con vancomicina y luego enriquecer el cultivo con tratamiento de lisis en fase exponencial, lo que sugiere que la vancomicina es capaz de inducir la formación de células persistentes, las cuales además pueden ser enriquecidas con el tratamiento de lisis.

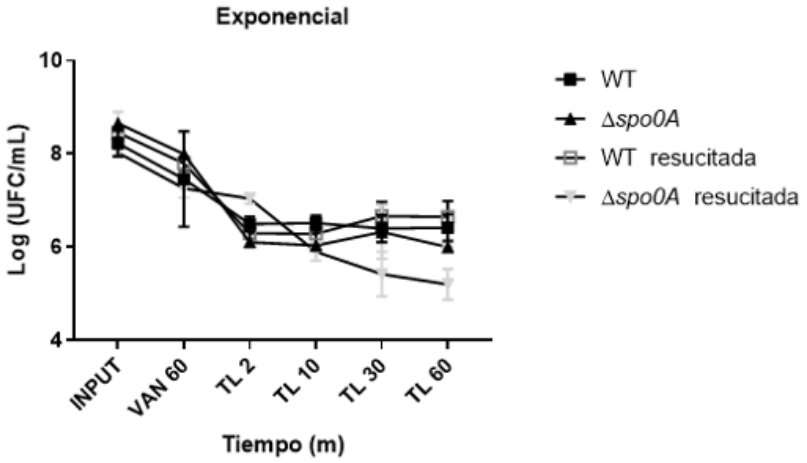


Figura 9. Formación de células persistentes inducidas por vancomicina en fase exponencial. Se utilizaron las cepas WT y Δ*spo0A* fase exponencial log 8, induciendo la formación de células persistentes con 10 veces la CMI de vancomicina durante 60 minutos y luego enriquecer el cultivo con 60 minutos de tratamiento de lisis. N=3.

Inducción de células persistentes por estrés inducido con vancomicina en fase estacionaria.

Para evaluar si la vancomicina inducía la formación de células persistentes en fase estacionaria, se utilizó un cultivo en log 10 de crecimiento (16 horas de crecimiento, fase estacionaria) y se realizó el tratamiento con vancomicina 10 veces el CMI. Esto nos permitió demostrar que de igual forma fue posible enriquecer el cultivo de células persistentes, sugiriendo que los tratamientos con vancomicina inducen la formación de células persistentes en fase estacionaria de crecimiento.

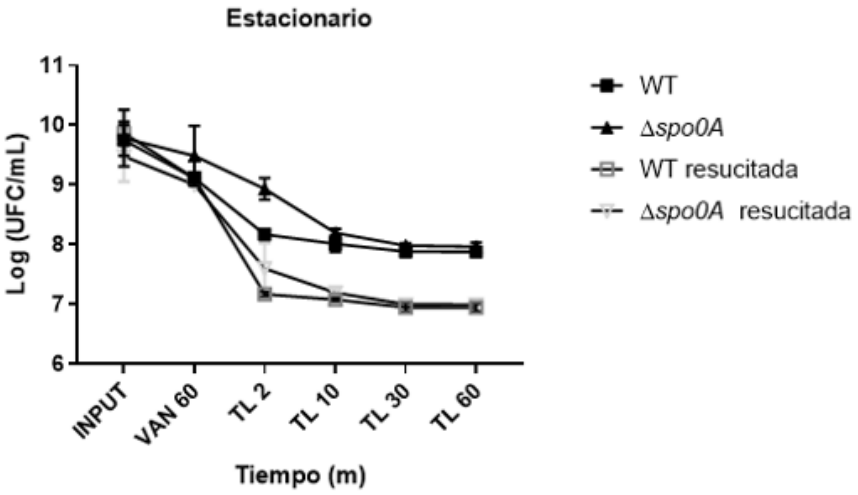


Figura 10. Formación de células persistentes inducidas por vancomicina en fase estacionaria. Se utilizaron las cepas WT y Δ*spo0A* en fase estacionaria log 10, las cuales fueron inducidas con 10 veces la CMI de vancomicina durante 60 minutos y luego se enriqueció el cultivo de células persistentes con el tratamiento de lisis. N=3.

3.4. Inducción de células persistentes por estrés inducido con metronidazol en fase exponencial.

En el caso del metronidazol, no se encontró información previa sobre la concentración óptima para inducir células persistentes en *C. difficile*. Por ello, se evaluaron dos concentraciones: 5 y 10 veces el valor de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), aplicadas durante 60 y 30 minutos (Figura 10). Los datos obtenidos indican que, tras 60 minutos de tratamiento a 10 veces la CMI (Figura 11 A), no fue posible contar colonias, lo que sugiere una alta tasa de muerte bacteriana. Incluso con 5 veces la CMI, el número de colonias fue muy bajo. Debido a esto, se realizó el experimento reduciendo el tiempo de exposición a 30 minutos (Figura 11 B), observándose una mayor cantidad de colonias, especialmente con 10 veces la CMI

en comparación con 5 veces. Por lo tanto, se decidió trabajar con un tiempo de tratamiento de 30 minutos a una concentración de metronidazol de 10 veces la CMI.

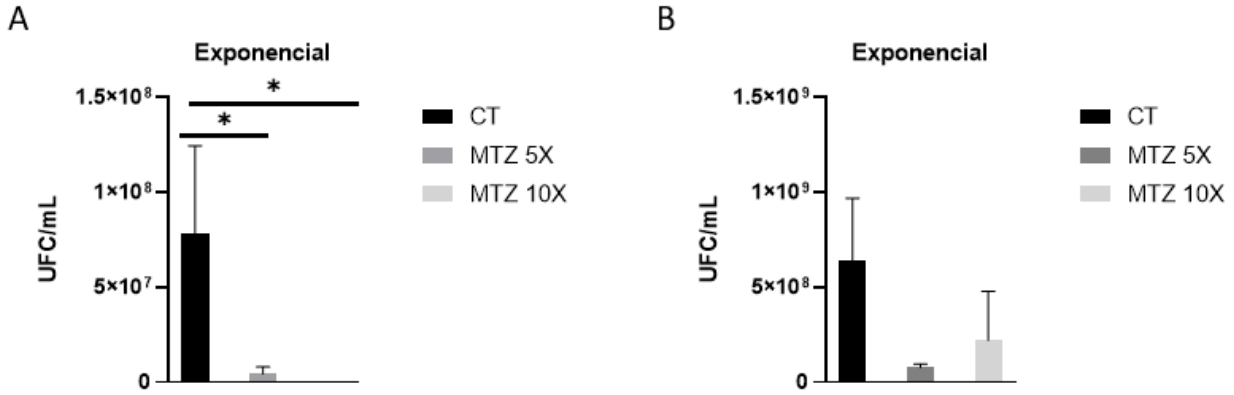


Figura 11. Estandarización de concentración según CMI de metronidazol y tiempo en fase exponencial. A. Cultivo exponencial expuesto a 5 y 10 veces el CMI durante 60 minutos de metronidazol. **B**. Cultivo exponencial expuesto a 5 y 10 veces el CMI durante 30 minutos de metronidazol. N=3. One-way ANOVA con un test post hoc de Dunnet (* $p<0.05$; ** $p<0.005$; *** $p<0.0005$; **** $p<0.0001$).

Una vez que se estandarizaron los parámetros de la concentración y tiempo de antibiótico a usar, se llevó a cabo la curva de persistencia con metronidazol. Se observo que el tratamiento de metronidazol de 30 minutos con 10 veces el CMI y un posterior enriquecimiento de células persistentes, permitió observar la curva bifásica de persistencia (Figura 12). Además, al repetir este experimento con las células resucitadas, se repitió el fenómeno, sugiriendo que es posible enriquecer el cultivo de células persistentes, inducidas con metronidazol en fase exponencial de crecimiento.

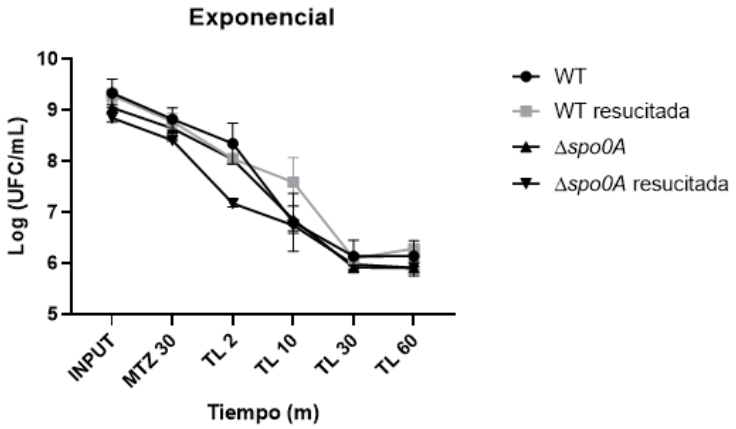


Figura 12. Formación de células persistentes inducidas por metronidazol en fase exponencial. Se utilizaron las cepas WT y Δ*spo0A* en fase exponencial log 8, estas fueron inducidas con 10 veces la CMI de metronidazol durante 30 minutos y luego se enriqueció el cultivo con el tratamiento de lisis en los tiempos indicados. n=3.

3.5. Inducción de células persistentes por estrés inducido con metronidazol en fase estacionaria.

Para evaluar si el fenómeno es replicable en la fase estacionaria de crecimiento (log 10, 16 horas de crecimiento), se evaluaron los mismos parámetros mencionados previamente (Figura 13). Los resultados muestran que, luego de 60 minutos de tratamiento con el antibiótico a 10 veces la CMI, se observa una mayor cantidad de colonias en comparación con el cultivo expuesto a 5 veces la CMI (Figura 13A). Además, en el cultivo tratado durante 30 minutos, se obtiene una menor cantidad de células viables en comparación con el tratamiento de 60 minutos (Figura 13B). Estos resultados permiten concluir que la concentración de 10 veces la CMI durante 60 minutos es la más efectiva para el tratamiento.

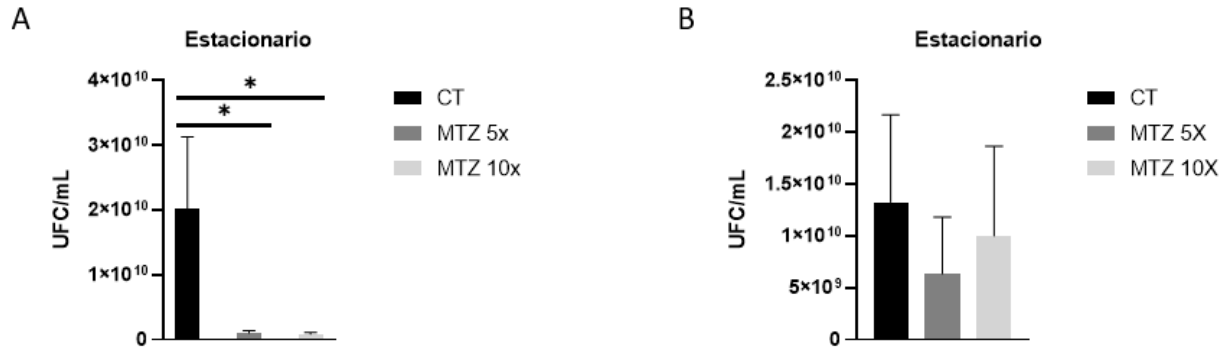


Figura 13. Estandarización de concentración según CMI de metronidazol y tiempo en fase estacionaria. A. Cultivo estacionario fue expuesto 5 y 10 veces el CMI durante 60 minutos con

metronidazol (2,5 µg/mL y 5 µg/mL). **B.** Cultivo estacionario fue expuesto a 5 y 10 veces el CMI durante 30 minutos con metronidazol. N=3. One-way ANOVA con un test post hoc de Dunnet (* $p<0.05$; ** $p<0.005$; *** $p<0.0005$; **** $p<0.0001$).

Cuando los parámetros ya se encuentran estandarizados se realiza la curva de persistencia con el inductor de metronidazol y el posterior enriquecimiento de células persistentes en el cultivo. Se lleva a cabo con ambas cepas de estudio, además de contar con las bacterias que fueron resucitadas.

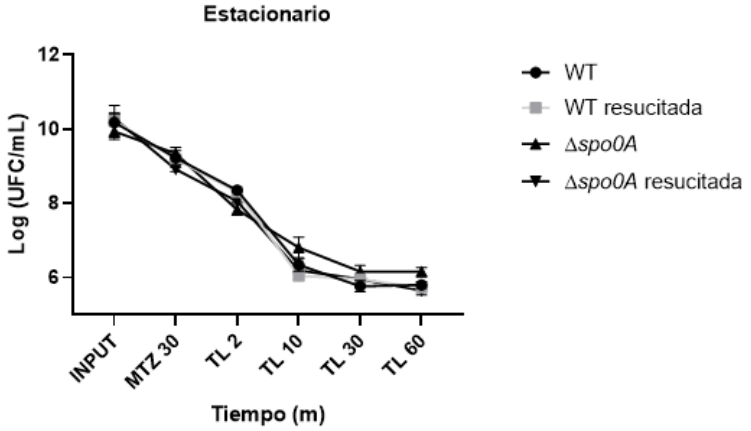


Figura 14. Formación de células persistentes inducidas por metronidazol en fase estacionaria. Se utilizaron las cepas WT y Δ*spo0A* en fase estacionaria log 10, las cuales fueron inducidas con 10 veces la CMI de metronidazol durante 60 minutos y luego se enriqueció el cultivo con tratamiento de lisis. N=3.

Para evaluar cuál de los dos tratamientos induce una mayor cantidad de células persistentes enriquecidas con tratamiento de lisis, se usaron los datos de supervivencia a los 30 minutos. Esto nos permitió definir que la vancomicina genera una mayor cantidad de células persistentes en fase estacionaria y exponencial en la cepa R20291 (Figura 15A y 15B). Además, se observó que en fase exponencial de crecimiento la cepa mutante *spo0A* produjo una menor cantidad de células persistentes, lo cual no ocurrió en fase estacionaria (Figura 15A y 15B).

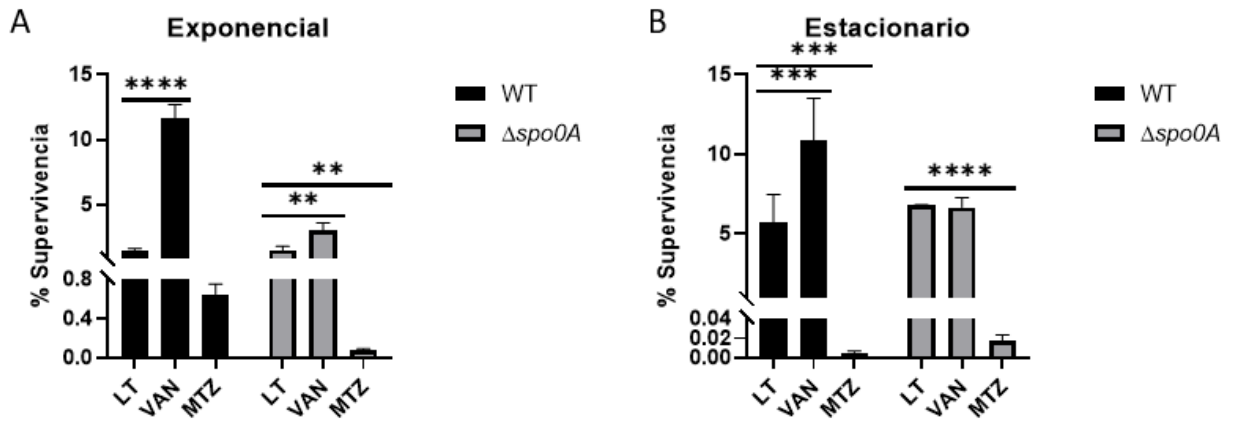


Figura 15. Comparación de supervivencia al inducir persistentes con vancomicina o metronidazol. A. Porcentaje de supervivencia de un cultivo exponencial en log 8 de las cepas WT y mutante Δ*spo0A*, inducidas con vancomicina o metronidazol y enriquecidas con a tratamiento de lisis. B. Porcentaje de supervivencia de un cultivo estacionario en log 10 de las cepas WT y mutante Δ*spo0A*, inducidas con vancomicina o metronidazol y enriquecidas con a tratamiento de lisis. n=3. Two-way ANOVA con un test post hoc de Dunnet (* $p<0.05$; ** $p<0.005$; *** $p<0.0005$; **** $p<0.0001$).

3.6. Evaluación de la actividad metabólica de RNA y la viabilidad celular por microscopia de fluorescencia

Para evaluar si las células recolectadas con el tratamiento de lisis se encontraban viables y con un metabolismo de RNA disminuido, se procedió a usar tinciones. La tinción con Tioflavina T (ThT) nos permitió evaluar el metabolismo de RNA y la tinción de Ioduro de Propidio (PI) nos permitió evaluar la viabilidad celular y la integridad de la membrana [58]. Para comenzar se evaluó la auto fluorescencia de *C. difficile* tanto en fase exponencial como en fase estacionaria puesto que se ha reportado una emisión basal de fluorescencia verde y es necesario descartar este fenómeno en dicho ensayo. Como se observa en la Figura 16 y 17, el patógeno no presenta coloración ni verde ni roja (Figura 16 y 17 primera fila). Además, se realizó un control positivo para observar las tinciones, esto nos permitió observar que en fase estacionaria se logra observar dos tonalidades de verdes (verde más tenue y verde más intenso), lo que nos indicó que la bacteria estaría entrando en un estado de dormancia a nivel de metabolismo de RNA, además se observó la presencia de color rojo (Figura 16 y 17 segunda fila) lo que nos sugiere que estas células se encontrarían muertas o con daño en la pared celular. Además, se evaluó la capacidad del tratamiento de lisis para verificar la eficacia de este y se logra observar como las bacterias se encuentran de una tonalidad verde más tenue, es decir, con su metabolismo de RNA disminuido o apagado (Figura 16 y 17 tercera fila).

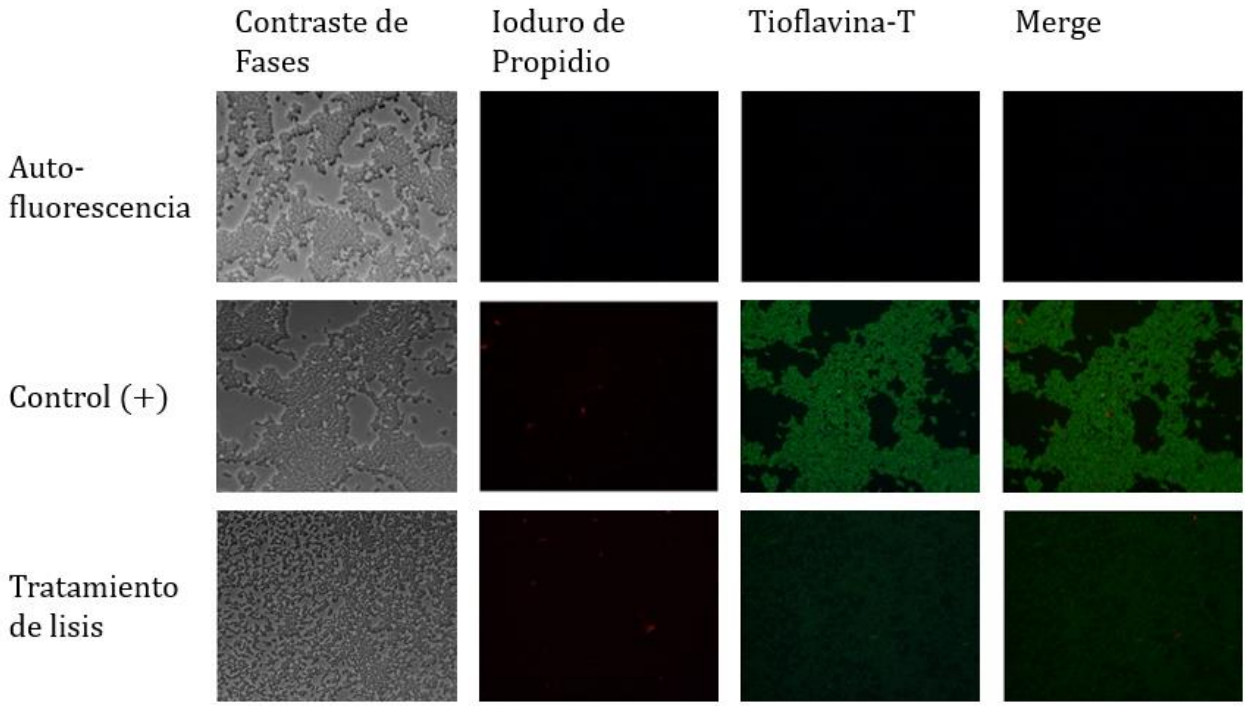


Figura 16. Monitoreo del metabolismo de RNA y viabilidad celular en fase exponencial. Se llevó a cabo en la cepa R20291 enriquecida con glucosa, fructosa y taurocolato al 0.2%. Se puede apreciar la ausencia de la auto florescencia, el control positivo a tinciones y el tratamiento de lisis con Ioduro de Propidio, Tioflavina- T además de su merge. Imágenes representativas de N=3.

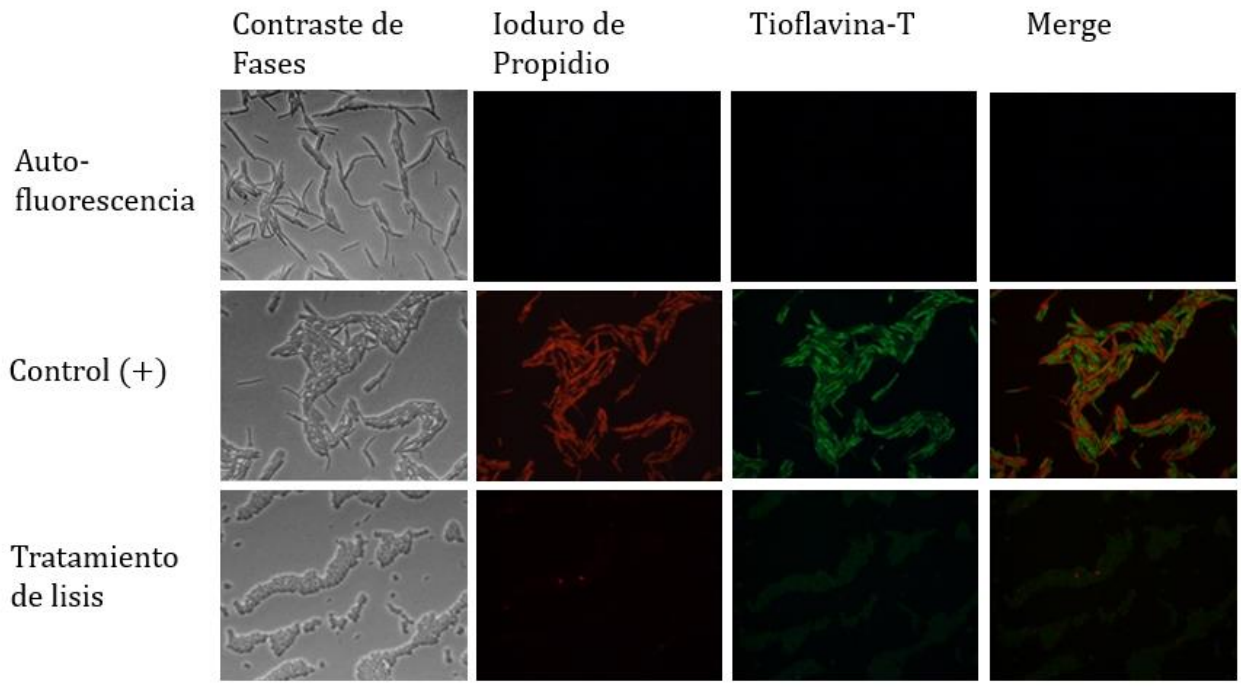


Figura 17. Monitoreo del metabolismo de RNA y viabilidad celular en fase estacionaria. Se llevó a cabo en la cepa R20291 enriquecida con glucosa, fructosa y taurocolato al 0.2%. Se puede apreciar la ausencia de auto florescencia, el control positivo a tinciones y el tratamiento de lisis con Ioduro de Propidio, Tioflavina- T además de su merge. Imágenes representativas de N=3.

3.7. Evaluación del metabolismo de RNA y viabilidad celular durante tratamientos con vancomicina y metronidazol en fase exponencial.

Para evaluar el metabolismo del RNA y la viabilidad celular de las células persistentes enriquecidas e inducidas con vancomicina y metronidazol, se utilizó Ioduro de propidio y Tioflavina-T siguiendo los procedimientos previamente descritos. En la Figura 18, tanto en el cultivo tratado con lisis, con vancomicina, como en la combinación de ambos tratamientos, la mayoría de la población se encuentra viva, lo cual se evidencia por el escaso color rojo. Además, se observa que el tamaño del bacilo varía dependiendo del tratamiento: el tratamiento de lisis produce bacilos de menor tamaño, la vancomicina mantiene el bacilo en su tamaño original, y la combinación de ambos tratamientos muestra una mezcla de tamaños. Esta misma tendencia se observa al agregar metronidazol al cultivo, como se muestra en la Figura 19.

En relación con las tinciones, tanto en la Figura 18 como en la Figura 19, las imágenes de la segunda fila (tratamientos con antibióticos) muestran algunas bacterias con un metabolismo de RNA activo (verde intenso), pero la mayoría presentan un verde más tenue, indicando un metabolismo de RNA disminuido. Cuando se añade el tratamiento de lisis a los antibióticos (tercera fila de las Figuras 18 y 19), se observa una combinación de tonalidades de verde, es decir, bacterias con metabolismo de RNA activo y otras con metabolismo de RNA reducido.

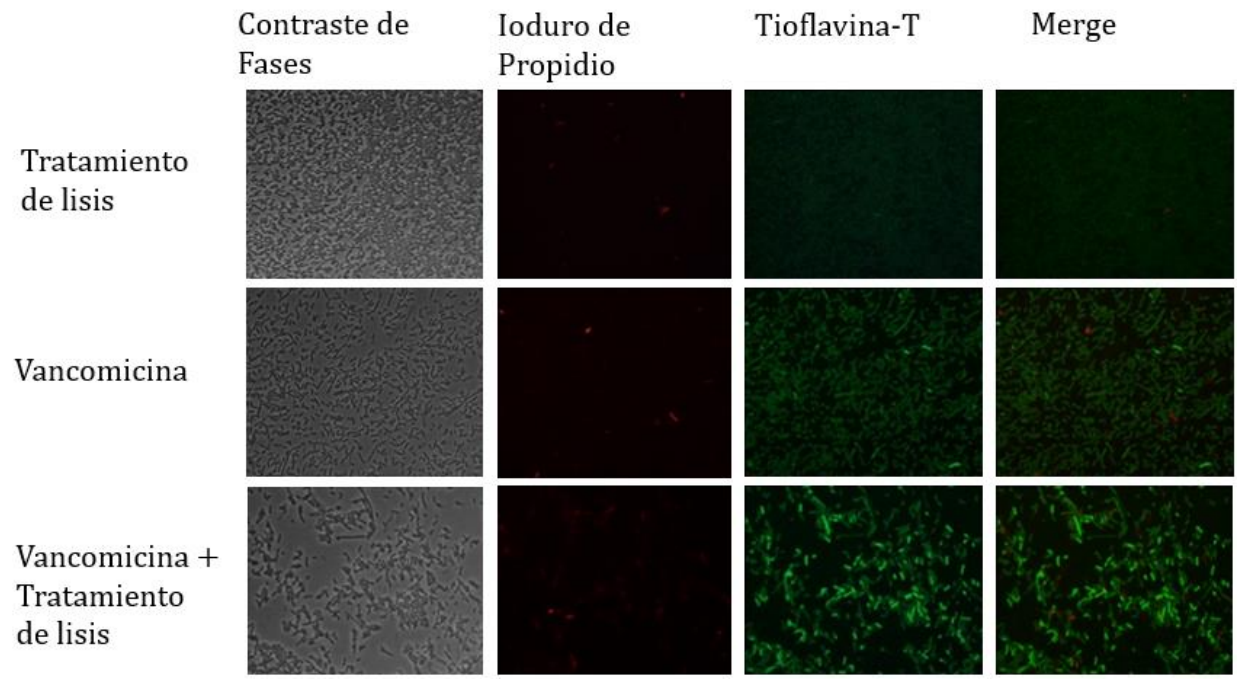


Figura 18. Monitoreo del metabolismo de RNA y viabilidad celular con vancomicina en fase exponencial. Cepa R20291 enriquecida con glucosa, fructosa y taurocolato al 0.2% hasta log 8. Se puede apreciar en la primera fila el tratamiento de lisis, segunda fila el tratamiento con vancomicina y la tercera fila es vancomicina más el tratamiento de lisis, con las tinciones de Ioduro de Propidio, Tioflavina- T además de su merge. Imágenes representativas de N=3.

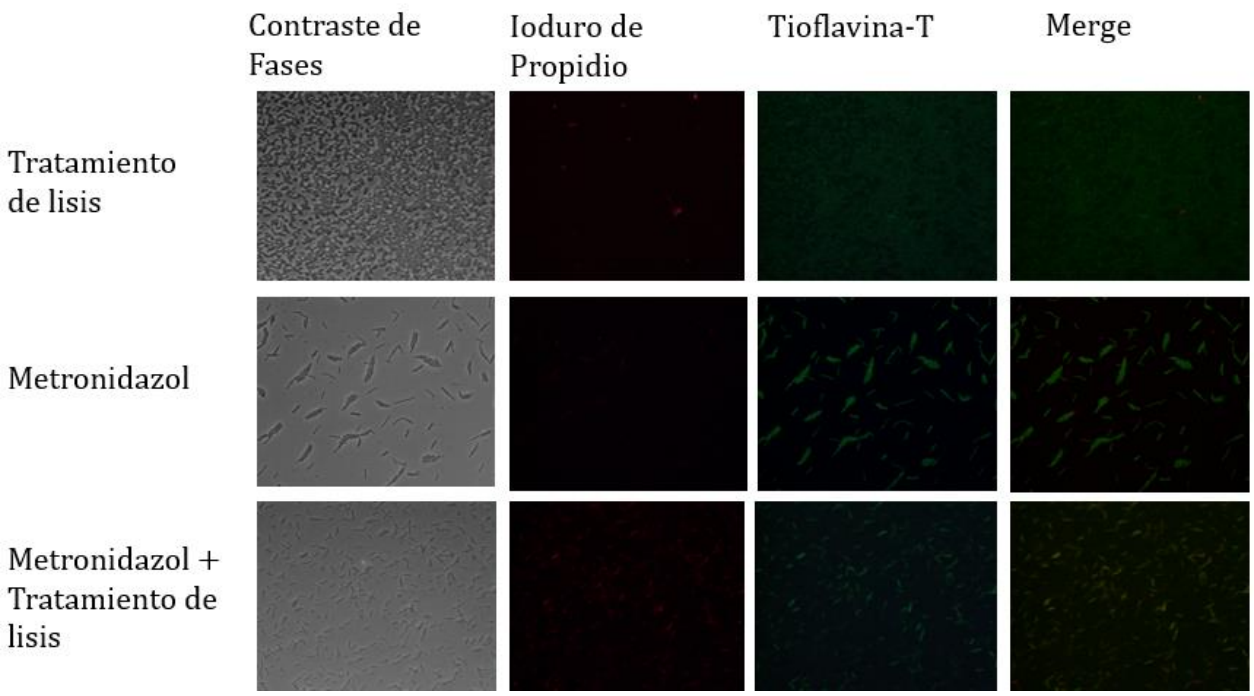


Figura 19. Monitoreo del metabolismo de RNA y viabilidad celular con metronidazol en fase exponencial. Cepa R20291 enriquecida con glucosa, fructosa y taurocolato al 0.2% hasta log 8. Se puede apreciar en la primera fila el tratamiento de lisis, segunda fila el tratamiento con metronidazol y la tercera fila es metronidazol más el tratamiento de lisis, con las tinciones de Ioduro de Propidio, Tioflavina- T además de su merge. Imágenes representativas de N=3.

3.8. Evaluación del metabolismo de RNA y viabilidad celular durante tratamientos con vancomicina y metronidazol en fase estacionaria.

Cuando el cultivo se expone al tratamiento de lisis, los bacilos presentan un tamaño menor y muestran un metabolismo disminuido, evidenciado por un verde más tenue en la tinción con Tioflavina-T (fila 1 de la Figura 20). En el caso del tratamiento con vancomicina, los bacilos recuperan su longitud original, y se observa una combinación de bacterias con metabolismo de RNA activo y otras con metabolismo de RNA disminuido (fila 2, Figura 20). Por el contrario, el tratamiento con metronidazol muestra principalmente bacterias con metabolismo reducido pero aún viables (fila 2, Figura 21). Al combinar el antibiótico con el tratamiento de lisis, se observó una mezcla de tamaños de bacilos, incluyendo tanto bacilos largos como cortos (tercera fila, Figuras 20 y 21). Además, se apreció una combinación de bacterias con metabolismo activo y bacterias con metabolismo disminuido, evidenciada por los diferentes tonos de verde presentes. En cuanto a la viabilidad, los resultados revelaron que el tratamiento con metronidazol (Figura 21) condujo a

una mayor viabilidad celular, mientras que el tratamiento con vancomicina (Figura 20) mostró una mayor cantidad de bacterias con problemas en la pared celular o muertas.

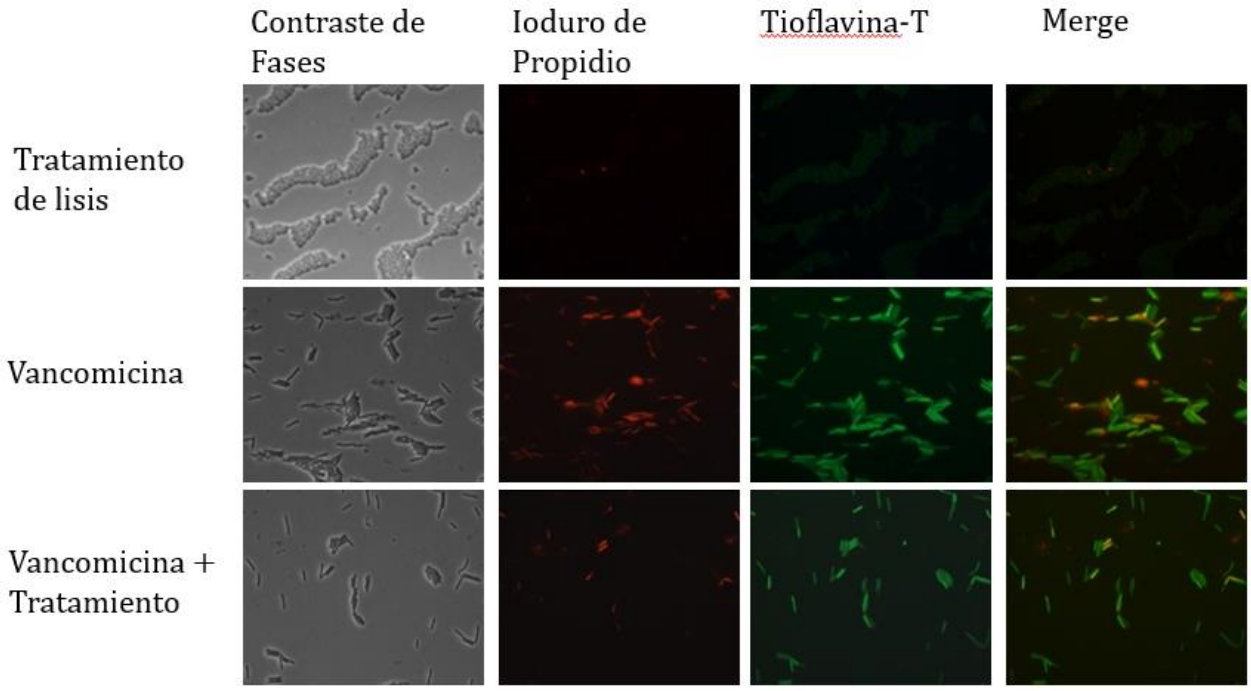


Figura 20. Monitoreo del metabolismo de RNA y viabilidad celular con vancomicina en fase estacionaria. Cepa R20291 enriquecida con glucosa, fructosa y taurocolato al 0.2% hasta log 10. Se puede apreciar en la primera fila el tratamiento de lisis, segunda fila el tratamiento con vancomicina y la tercera fila es vancomicina más el tratamiento de lisis, con las tinciones de Ioduro de Propidio, Tioflavina- T además de su merge. Imágenes representativas de N=3.

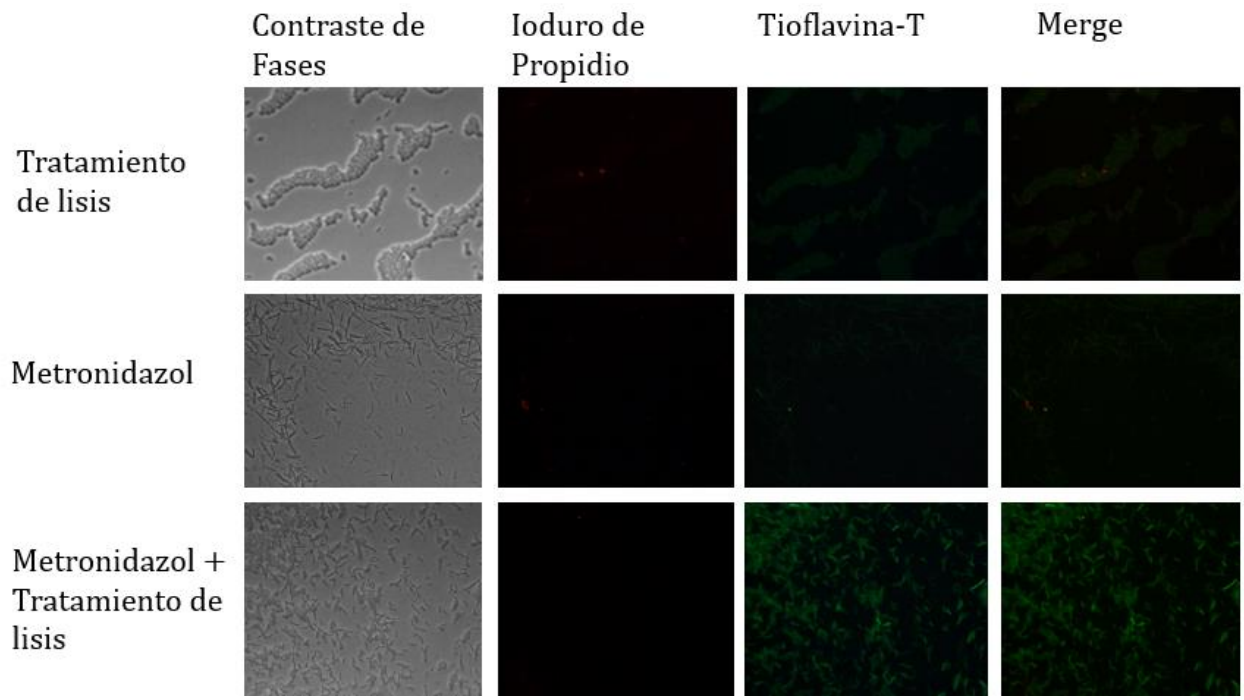


Figura 21. Monitoreo del metabolismo de RNA y viabilidad celular con metronidazol en fase estacionaria. Cepa R20291 enriquecida con glucosa, fructosa y taurocolato al 0.2% hasta log 10. Se puede apreciar en la primera fila el tratamiento de lisis, segunda fila el tratamiento con metronidazol y la tercera fila es metronidazol más el tratamiento de lisis, con las tinciones de Ioduro de Propidio, Tioflavina- T además de su merge. Imágenes representativas de N=3.

3.9. Evaluación de la integridad del ADN de *C. difficile* durante tratamientos con vancomicina y metronidazol.

Como se mencionó previamente, existe una relación entre los antibióticos bactericidas que inducen la formación de células persistentes y el daño en el ADN que estos producen. Para evaluar este posible mecanismo, se utilizó el ensayo cometa. Los resultados mostraron que en el control negativo el nucleoide contiene todo el material genético, indicando que no hay daño en el ADN (Figura 22A). En el control positivo, donde las bacterias fueron tratadas con luz UV, se observa el cometa característico del ensayo, lo que sugiere que el ADN ha migrado fuera del nucleoide, indicando daño en el ADN (Figura 22B). Además, se observó que el cultivo expuesto a metronidazol presenta una forma similar a un cometa, lo que sugiere que la inducción de células persistentes con metronidazol está fuertemente relacionada con el daño en el ADN (Figura 22D). Sorprendentemente, al analizar el cultivo tratado con vancomicina, también se observaron cometas (Figura 22C), lo que sugiere fuertemente que este antibiótico genera daño en el ADN de la bacteria, un hallazgo que no había sido reportado hasta ahora.

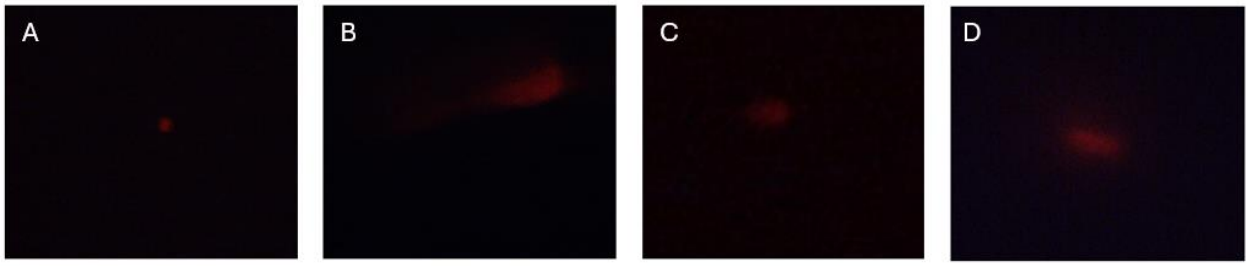


Figura 22. Daño en el DNA producido por vancomicina y metronidazol. Las bacterias fueron crecidas hasta fase exponencial log 8 con suplementos, luego se realizó el protocolo de ensayo cometa en láminas de agarosa tiñendo el ADN con Ioduro de Propidio. En la Figura se observa; **A.** El control negativo de la cepa R20291. **B.** Control positivo de la cepa R20291, el cual fue expuesto a luz UV durante 15 minutos. **C.** Cultivo de cepa R20291 tratado con vancomicina. **D.** Cultivo de cepa R20291 tratado con metronidazol.

4. DISCUSIÓN

Comprender la cinética de crecimiento es fundamental para el estudio de cualquier microorganismo [59] por lo que fue necesario estandarizar el crecimiento de *C. difficile*, por lo que se llevó a cabo una curva de crecimiento (Figura 6A). Una técnica común para evaluar el crecimiento microbiano es la medición de densidad óptica (DO), que mide la absorbancia o turbidez del cultivo a una longitud de onda específica [60]. Sin embargo, para lograr realizar estas mediciones con exactitud, es necesario la utilización de equipo especializado el cual debe mantenerse fuera de la cámara anaeróbica (en presencia de oxígeno), esto imposibilita la medición de la DO del patógeno en cuestión [61]. Las curvas de crecimiento bacteriano suelen presentar fases bien definidas, dentro de las cuales podemos encontrar; la fase de latencia o "lag", donde las bacterias se adaptan al nuevo entorno, posteriormente entran en la fase logarítmica o exponencial de crecimiento, en la cual las células comienzan a dividirse regularmente, alcanzando la tasa máxima de crecimiento. La fase estacionaria se produce cuando el número de células que se dividen es igual al número de células que mueren debido al agotamiento de nutrientes. Finalmente, la fase de muerte ocurre cuando las bacterias pierden la capacidad de dividirse, por lo que el número de células muertas en el cultivo es mayor que el número de células vivas [62] . Según los resultados observados en la Figura 6A, la fase de latencia de *C. difficile* tiene una duración aproximada de 2 horas. A partir de entonces, la fase logarítmica se extiende durante aproximadamente 5 horas. Después de este periodo, el cultivo entra en la fase estacionaria, que se observa al menos durante una hora en la curva de crecimiento, donde aparece la meseta característica de esta fase. El comportamiento observado en la cinética de crecimiento de *C. difficile* posee similitudes con el patrón reportado en *C. perfringens*. En esta última especie, se ha descrito que la fase exponencial de crecimiento tiene una duración aproximada de entre 2 y 6 horas después del inoculo inicial [63]. Esta similitud entre *C. perfringens* y *C. difficile* sugiere que pueden compartir características que les permiten alcanzar tasas de división celular comparables durante la etapa de crecimiento exponencial.

La literatura científica ha establecido la existencia de dos tipos de células persistentes en las poblaciones bacterianas: las células persistentes inducidas y las células persistentes estocásticas (anteriormente clasificadas como tipo I y tipo II) [38,64]. Las células persistentes estocásticas se producen durante el crecimiento exponencial para acumularse en la fase estacionaria, mientras que las inducidas se encuentran como su nombre lo indica, necesitan de un factor ambiental para ser producidas, como el estrés por antibióticos estudiados en este trabajo. Por esta razón, decidimos realizar experimentos en ambas fases, definiendo la fase exponencial como el período en el que el cultivo alcanza un valor logarítmico de 8, como se ha reportado en los artículos clásicos de persistencia [38] en términos de UFC/mL. Además, la formación de esporas es una parte integral del ciclo de vida de *C. difficile* [65], por lo que era crucial evitar que este fenómeno interfiriera con los estudios sobre células persistentes. Para abordar esta consideración, se utilizó

la cepa R20291 Δ*spo0A*, como control genético de no esporulación, que presenta una mutación en el regulador maestro de la esporulación, resultando en una cepa incapaz de formar esporas [5]. Adicionalmente, se utilizó un control químico de inhibición de la esporulación, para esto se emplearon suplementos en el cultivo de la cepa R20291 para inhibir la vía de esporulación. Específicamente, se utilizaron fructosa y glucosa, azúcares que han demostrado tener un efecto inhibitorio sobre dicho proceso ya que su presencia induce la regulación de hasta el 18% del transcriptoma de *Clostridioides difficile*, de los cuales el 50% está regulado por CcpA, una proteína que forma parte de un regulón responsable de controlar la captación de azúcares y la regulación génica [66]. Estudios previos han evidenciado que CcpA reprime la expresión de Spo0A y SigF, que son reguladores cruciales en las primeras etapas de la esporulación [67]. Además, se incorporó taurocolato, ya que al ser un ácido biliar [68] actúa como surfactante que se produce en el hígado a partir del colesterol y el que es detectado por la pseudoproteasa CspC, lo que desencadena una cascada de señales a través de CsbB para activar la hidrolasa lítica de la corteza, SleC, que inicia el proceso de germinación [67]. Establecido esto, se procedió a evaluar la forma de enriquecer el cultivo de células persistentes, como se explicó previamente la tecnica "*gold standard*" para evaluar la presencia de esta población bacteriana, es el *cell sorting* [64]pero por el largo temporal del experimento nos imposibilita el replicarlo en *C. difficile*, puesto que lo que se ha reportado para este patógeno es una tolerancia al oxígeno de hasta 30 minutos, durante la fase estacionaria de crecimiento, pero el protocolo para realizar un *cell sorting* dura aproximadamente 8 horas [49]. Es por esta razón que se tomó la decisión de evaluar un tratamiento alternativo que nos permitiera enriquecer el cultivo de bacterias persistentes, el cual corresponde al tratamiento de lisis (TL). Al evaluar el TL seleccionado, se logró identificar el *plateau* de persistencia en aproximadamente 15 minutos (Figura 7). Cabe destacar que el estudio previo de Cañas-Duarte 2014 no especifica con detalle el contenido ni la actividad molecular del tratamiento aplicado, además no utilizó una curva de bacterias revividas, asumiendo simplemente el enriquecimiento de células persistentes [50]. Este último aspecto fue abordado en el presente estudio, al aplicar el tratamiento de lisis durante la fase exponencial y estacionaria una vez que las bacterias fueran revividas, lo que nos permitió corroborar que el fenómeno correspondía a células persistentes y no un fenómeno de resistencia. Además, al aplicar el tratamiento de lisis durante la fase exponencial de crecimiento, después de exponer previamente los cultivos a vancomicina o metronidazol (Figuras 9 y 12, respectivamente), también se observó la presencia de un *plateau* de células persistentes, fenómeno que se repitió en la fase estacionaria (Figuras 10 y 14). Este fenómeno de formación de *plateau* de células persistentes se ha replicado por otros autores con distintos métodos, por ejemplo, Rowe 2016, realizó ensayos de células persistentes agregando una concentración letal de los antibióticos bactericidas (ampicilina y ciprofloxacina) a un cultivo de *E. coli*, estos tratamientos le permitieron observar la formación de una curva bifásica de muerte en respuesta a los tratamientos con antibióticos, lo que sugiere la presencia del subcultivo persistente [69]. Por otra parte, en *Bacillus subtilis*, una

bacteria más cercana a *C. difficile,* ambas pertenecientes al filo firmicutes, demostró formar esta sub población, y además fue posible evaluarla por medio de una citometría de flujo y posterior cell sorting [49].

Para evaluar si las células recolectadas con el tratamiento de lisis se encontraban viables, como en el artículo mencionado de *Bacillus subtilis,* [49] se propuso el uso de Ioduro de Propidio (PI), además se utilizó con una combinación de un marcador de metabolismo de ARN, la Tioflavina-T, como herramientas para evidenciar el estado de dormancia de la subpoblación de células persistentes. La Tioflavina-T es una tinción fluorescente comúnmente empleada para detectar la presencia de fibrillas amiloides, ya que al unirse a estas estructuras, su intensidad de fluorescencia se incrementa varios órdenes de magnitud [70]. Sin embargo, investigaciones recientes han demostrado que la Tioflavina-T puede ser utilizada para monitorear en tiempo real el metabolismo del ARN, permitiendo visualizar las transiciones entre células con metabolismo de ARN activo y células persistentes con metabolismo disminuido en *E. coli*. [51] Es importante señalar que la cepa de estudio R20291 no presenta autofluorescencia ni roja ni verde, ya que de ser así, el ensayo se hubiera visto comprometido (Figura 16 y 17, primera fila). Aunque las tinciones no habían sido previamente utilizadas en nuestra cepa de estudio, demostraron funcionar adecuadamente, permitiendo distinguir entre células con ARN metabólicamente activo y células con ARN metabólicamente disminuido o inactivo. Generalmente, para aislar el cultivo de células persistentes se utiliza citometría de flujo y posterior clasificación celular con doble tinción, como por ejemplo diacetato de 5-(y-6)-carboxifluoresceína (5(6)-CFDA) y Ioduro de Propidio (PI) [49]. Pero en ensayos realizados en nuestro laboratorio no fue posible observar fluorescencia verde asociada a CFDA en *C. difficile* R20291 WT (datos no mostrados). Cabe destacar que el CFDA no emite fluorescencia por si mismo, si no que utiliza las enzimas esterasas de las células para modificarse y emitir la fluorescencia, sirviendo como marcador de células vivas [49]. Gracias a las tinciones de Tioflavina-T y PI, se logró observar cómo el tratamiento de lisis enriquece el cultivo de células persistentes tanto en fase estacionaria como en fase exponencial (Figuras 18, 19, 20 y 21). Todas las muestras con tratamiento de lisis presentaban un verde tenue, o una combinación de células con verde fuerte y verde tenue, indicando un metabolismo disminuido para el primer caso y una mezcla de poblaciones para el segundo. Además, se observó un fenómeno no reportado anteriormente: el tamaño del bacilo de *C. difficile* disminuye sustancialmente después del tratamiento de lisis, este efecto no se observó cuando el cultivo fue expuesto únicamente a vancomicina (Figura 18, segunda fila) o metronidazol (Figura 20, segunda fila), donde el tamaño de *C. difficile* permaneció alargado. Esto sugiere, que la población que estaría enriqueciendo el tratamiento de lisis corresponde a una población con menor complejidad o más pequeña, en morfología, lo que se correlaciona con otros estudios asociados a morfologías de células persistentes. Por ejemplo, en el estudio de Wood 2019 [71] se evaluó la complejidad por medio de la densidad electrónica de las células persistentes, por medio de microscopia electrónica, esto demostró que las células persistentes de *E. coli*

serian menos complejas electrónicamente, que las células en crecimiento exponencial activo. Las diferencias en el tamaño de los bacilos, de *C. difficile* pueden estar dados por la modulación en la expresión de diversos genes involucrados en diferentes procesos celulares. Por ejemplo, la reducción del tamaño en las células persistentes sugiere una posible represión de genes relacionados con la división celular, como *ftsZ.* FtsZ es crucial en la formación de estructuras filamentosas que dirigen la constricción de la membrana celular y la remodelación de la pared celular durante la división celular [72]. Otro gen relevante podría ser *ftsW*, que codifica para una proteína de membrana implicada en la síntesis del peptidoglicano durante la división celular [73]. Sugiriendo de esta forma que las células persistentes observadas en *C. difficile* estarían reprimiendo la expresión de genes relacionados con la división celular, de esta forma acortando el bacilo y disminuyendo su complejidad.

Cuando el cultivo se expuso a la combinación de vancomicina o metronidazol y el tratamiento de lisis, se observó la coexistencia de bacilos de ambos tamaños, incluyendo células persistentes y células con metabolismo activo, este mismo patrón se observó en la fase estacionaria. Cabe destacar que el cultivo persistente corresponde a una población de distintos tipos celulares, entre ellos uno de los mas complejos de estudiar son las células viables, pero no cultivables (VBNC), este subcultivo celular se caracteriza por mantener en ocasiones su metabolismo activo pero carecer de división celular, lo que lo hace pertenecer a esta población de bacterias persistentes [74]. Una diferencia clave entre las células persistentes clásicas y las VBNC, es la capacidad para volver a repoblar el cultivo, además se ha observado que las bacterias que producen la población VBNC suelen estar asociadas a infecciones con formación de biopelícula [75]. En el caso de nuestro trabajo, se ha observado que los tratamientos con vancomicina o metronidazol si son capaces de inducir la formación de biopelículas (en comparación a controles) [37,76,.77] lo que permite especular al respecto de lo encontrado en microscopía, puesto que esto sugiere que además de una población persistente, también estaríamos observando la población VBNC.

Algo interesante que se observó, es la supervivencia frente a los tratamientos con antibióticos. En cuanto a el porcentaje de supervivencia frente a la vancomicina, durante la fase exponencial, es aproximadamente 12% en la cepa WT, mientras que en la cepa mutante *spo0A* es alrededor del 3.5%. Algo similar ocurre en la fase estacionaria, donde la cepa mutante presenta un mayor porcentaje de supervivencia comparado con la fase anterior, y la cepa WT alcanza aproximadamente el 11%. Estos valores no concuerdan con los encontrados en bacterias como *E. coli* y *S. aureus*, donde se suele encontrar entre el 0.001% y un máximo de 1% en la fase estacionaria [50,78]. Sin embargo, los resultados con metronidazol en la fase estacionaria se encuentran dentro de los parámetros mencionados, ya que en ambas cepas el porcentaje de supervivencia varía entre el 0.004% y el 0.02%, lo que sugiere una respuesta adaptativa diferencial frente a los distintos tratamientos. Las células persistentes recolectadas frente a vancomicina es un factor importante a considerar

y de relevancia clínica, ya que sugiere que una de las razones por las que es tan complicado erradicar el patógeno con los tratamientos de vancomicina durante una ICD, aparte de la formación de esporas, seria por la formación de estas células persistentes en cortos periodos de tiempo los que permitan al patógeno sobrevivir. Este hallazgo subraya la necesidad de desarrollar estrategias terapéuticas que aborden específicamente la presencia de células persistentes en *C. difficile*, para mejorar la efectividad de los tratamientos y prevenir recurrencias o reinfecciones [79,80].

Como se ha explicado, la generación y supervivencia de células persistentes y tolerantes a los antibióticos involucra una compleja red de mecanismos moleculares [81]. Entre los mecanismos más relevantes se encuentran la respuesta global al estrés, la respuesta SOS frente al daño en el ADN, los sistemas de tolerancia a especies reactivas de oxígeno, los sistemas toxina-antitoxina, el metabolismo energético y las bombas de expulsión de fármacos [40,81-83]. Aunque cada uno de estos mecanismos tiene modulación de la expresión génica, lo que conduce a cambios fenotípicos que favorecen la persistencia frente a los antibióticos. En investigaciones previas con *E. coli* [38], se han identificado vías por las que sería posible inducir la formación de células persistentes, entre ellas, la vía de reparación de ADN, la vía de degradación de ARN y las vías de regulación de división celular y metabolismo basal. Una familia de genes muy estudiada para este fenómeno son los sistemas Toxina-Antitoxina, los cuales corresponden a 2 genes en un operón, donde el producto génico de la toxina produce un efecto detrimental en el crecimiento bacteriano, induciendo la dormancia y la antitoxina se encargaría de inhibir esa función mediante distintos mecanismos [84]. Uno de los mecanismos por los que se activan estos sistemas son las proteasas asociadas a degradación de proteínas mal plegadas durante estrés. Dentro de estas proteasas podemos encontrar las proteasas Lon y ClpP, ambas se han asociado con la formación de células persistentes en distintos patógenos [85-89]. Estos hallazgos en otras especies bacterianas sugieren que en *C. difficile* podrían desempeñar un papel significativo en la formación de células persistentes. Dicho esto, en estudios realizados en nuestro laboratorio, se observó que *C. difficile*, posee sistemas Toxina-Antitoxina tipo II funcionales [90], además se ha observado que *C. difficile* posee las proteasas previamente mencionadas, entre las cuales se encuentran ClpP1 y ClpP2, dos isoformas de la proteína ClpP [91]. Estudios sugieren que ClpP1 es la principal isoforma responsable del crecimiento normal y la virulencia, mientras que se sabe poco sobre la función de ClpP2 [91]. Siguiendo esta idea, se ha observado en múltiples modelos que la actividad de estas peptidasas esta mediada por proteínas chaperonas, las cuales se unen a estas peptidasas abriendo el bolsillo catalítico y otorgándole especificidad a la lisis proteolítica. En *C. difficile* se han encontrado al menos 3 chaperonas, *clpC, clpX* y *clpB,* de las cuales se ha observado que *clpC* podría contribuir al proceso de esporulación y por ende persistencia asociada a espora [89,92] . Esto sugiere fuertemente que la formación de células persistentes de este patógeno podría estar mediada por la expresión de toxinas de sistemas Toxina-Antitoxina y la activación

de estos por medio de las proteasas ClpP, donde los blancos podrían variar desde antitoxina hasta los previamente explicados, relacionados a división celular.

Como se explicó previamente, uno de los mecanismos para inducir la formación de células persistentes es la respuesta SOS frente al daño en el ADN. Dicho esto, los resultados obtenidos en el ensayo cometa para el metronidazol concuerdan con lo reportado en la literatura, donde se ha explicado que este antibiótico tendría como blanco principal el ADN [29]. Esto sugiere fuertemente una relación con el mecanismo de formación de células persistentes ya que esta vía de reparación del ADN es inducible y se encuentra regulada por dos actores claves: LexA y RecA. El primero es un represor y el segundo un inductor de la reparación. Ante la presencia de daño en el material genético, la proteína RecA se activa uniéndose al ADN monocatenario, formando un complejo conocido como filamento de nucleoproteína, este filamento estimula la auto proteólisis de LexA, lo que conduce, en especies como *E. coli* la depresión de más de 50 genes involucrados en la respuesta SOS [93] . A lo comentado se suma un estudio de *E. coli* donde sugieren que la toxina TisB (toxina de sistema Toxina-Antitoxina) inducida por daño en el ADN, estaría controlando la producción de células tolerantes a múltiples fármacos [46]. Esto sugiere fuertemente que es necesario estudiar la expresión de Toxinas de Sistemas Toxina-Antitoxina frente a tratamientos con metronidazol, de esta forma dar con el mecanismo por el cual se estarían formando estas células persistentes. De manera similar y sorprendentemente, el tratamiento con vancomicina también genera este efecto de daño en el ADN, aunque el tamaño del cometa es ligeramente menor en comparación con el observado con metronidazol. A pesar de que la vancomicina es clasificada como un antibiótico betalactámico, conocido por su capacidad para inhibir la síntesis de la pared celular bacteriana [94], Para este tipo de antibióticos, se ha estudiado un mecanismo de muerte celular común basado en la generación de radicales hidroxilos, los cuales son altamente perjudiciales y pueden dañar fácilmente las proteínas y el ADN de la célula [95]. El estudio que indica el mecanismo de muerte se llevó a cabo utilizando diversos grupos de antibióticos bactericidas, incluyendo uno de tipo betalactámico como la ampicilina. Se observó que dentro de una hora después de la administración del antibiótico, se producían radicales hidroxilos [96.] Aunque este proceso no se presenta en bacterias anaerobias debido a la ausencia de oxígeno en su entorno, se ha sugerido que los radicales nitrosativos podrían tener un efecto similar, dado que se ha demostrado su presencia en el ciclo de respiración anaeróbica .La respiración anaeróbica ocurre mediante dos procesos distintos: la reducción disimilatoria de nitrato, que produce nitrito como producto final, y la desnitrificación, que produce gas nitrógeno (N_2) o, menos comúnmente, óxido nitroso (N_2O) [97]. Al igual que los radicales hidroxilos, los radicales nitrosativos también impactan sobre las proteínas y el material genético, como se muestra en la Figura 21C, que ilustra el daño en el ADN, conocido como "cometa". Por lo tanto, aunque el estudio previo se centró en la ampicilina, un antibiótico betalactámico diferente a la vancomicina, los resultados sugieren

que esta última, al ser también un antibiótico bactericida, podría seguir un mecanismo similar de generación de radicales (en este caso, nitrosativos), lo que a su vez podría provocar daño en el ADN en bacterias anaerobias como *Clostridioides difficile* y por tanto inducir la respuesta SOS y sus dos actores claros al igual como se especula ocurre con metronidazol (Figura 23).

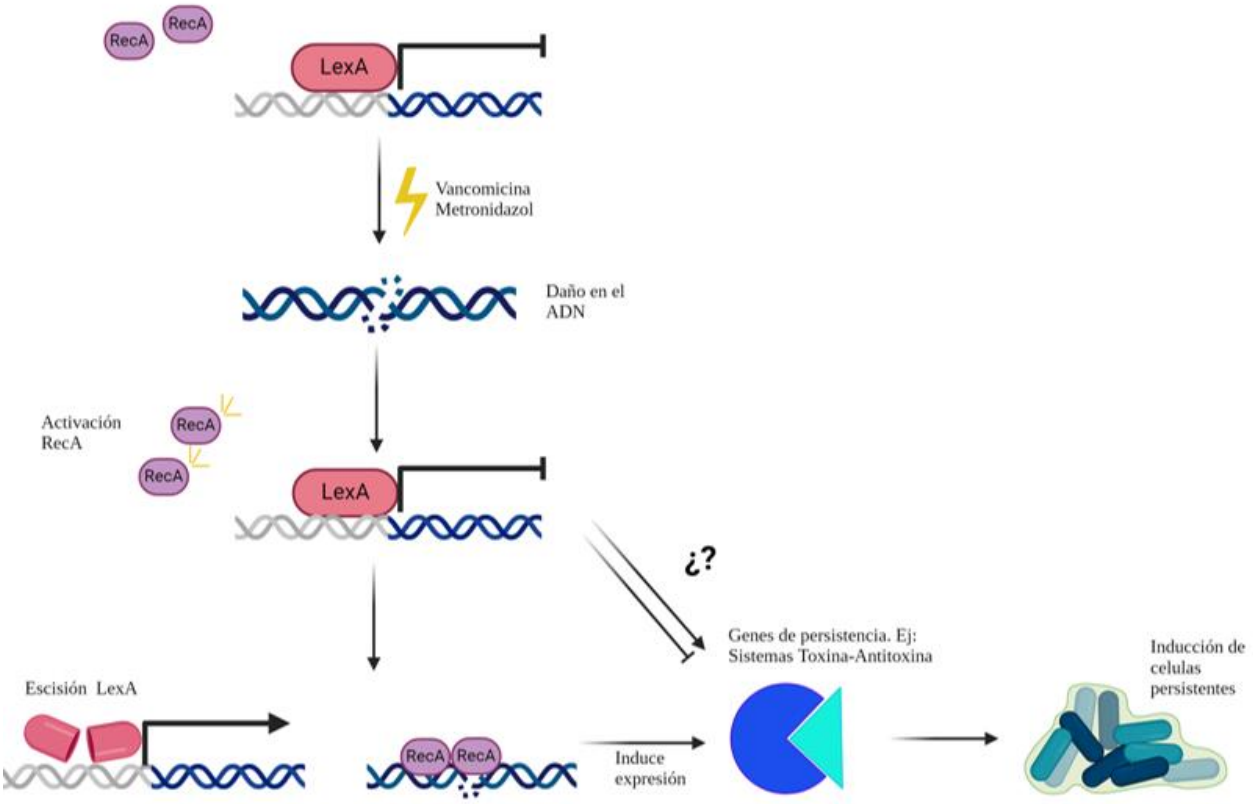


Figura 23. Posible mecanismo de formación de células persistentes por Vancomicina y Metronidazol en *C. difficile*. Mecanismo propuesto donde ambos antibióticos causan daño en el ADN activando la respuesta SOS. Esta respuesta comienza con el reconocimiento del ADN de cadena simple por la proteína RecA uniéndose a este y a su vez facilitando la auto proteólisis del represor LexA que induce expresión en genes asociados a la persistencia como sistemas toxinas-antitoxinas induciendo de esta manera la formación de células persistentes.

5. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

1. Se determinó el *plateau* de células persistentes de *Clostridioides difficile* con los tratamientos con vancomicina y metronidazol y enriqueciendo el cultivo con el tratamiento de lisis.

2. Se demostró que el tratamiento de lisis es capaz de enriquecer el cultivo con células viables de metabolismo de ARN disminuido y las células inducidas con vancomicina y metronidazol generan una mezcla de bacterias con metabolismo de ARN disminuido y activo.

3. Se observó que las células persistentes enriquecidas mediante el tratamiento de lisis eran más cortas en comparación con las células de cultivo con metabolismo activo. Además, las células inducidas con vancomicina y metronidazol mostraron una mezcla de tamaños de bacilos largos y cortos.

4. Se corroboró que el tratamiento con metronidazol induce daño en el ADN de *Clostridioides difficile* el cual fue evaluado mediante el ensayo cometa.

5. Por primera vez se observó que el antibiótico vancomicina induce daño en el ADN de *Clostridioides difficile*.

Proyección: Estos hallazgos abren nuevas oportunidades para futuras investigaciones biotecnológicas orientadas a identificar nuevos blancos terapéuticos contra las infecciones por *C. difficile*, con el fin de desarrollar tratamientos más efectivos. Al entender mejor los mecanismos que conducen a la formación de células persistentes en respuesta a los antibióticos, los esfuerzos de investigación podrán enfocarse en el desarrollo de terapias más específicas y eficaces. El descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas podría permitir el diseño de tratamientos que no solo erradiquen la infección de manera más efectiva, sino que también sean menos propensos a inducir la formación de células persistentes, reduciendo así la capacidad de este patógeno para tolerar y persistir a los tratamientos.

6. REFERENCIAS

1. Saujet L, Pereira FC, Serrano M, Soutourina O, Monot M, Shelyakin PV, et al. Genome-Wide Analysis of Cell Type-Specific Gene Transcription during Spore Formation in Clostridium difficile. PLoS Genet [Internet]. 2013;9(10):e1003756. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1003756

2. Denève C, Janoir C, Poilane I, Fantinato C, Collignon A. New trends in Clostridium difficile virulence and pathogenesis. Int J Antimicrob Agents [Internet]. 2009;33:S24–8. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/s0924-8579(09)70012-3

3. He M, Miyajima F, Roberts P, Ellison L, Pickard DJ, Martin MJ, et al. Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated Clostridium difficile. Nat Genet [Internet]. 2013;45(1):109–13. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1038/ng.2478

4. Cartman ST, Heap JT, Kuehne SA, Cockayne A, Minton NP. The emergence of 'hypervirulence' in Clostridium difficile. Int J Med Microbiol [Internet]. 2010;300(6):387–95. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.04.008

5. Huang I. Disruption of the gene (spo0A) encoding sporulation transcription factor blocks endospore formation and enterotoxin production in enterotoxigenic Clostridium perfringens type A. FEMS Microbiol Lett [Internet]. 2004;233(2):233–40. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.femsle.2004.02.014

6. difficile. C. BOLETÍN VIGILANCIA DE LABORATORIO [Internet]. Ispch.cl. [citado el 13 de junio de 2024]. Disponible en: https://www.ispch.cl/sites/default/files/Bolet%C3%ADnClostridium-07012020A%20(1).pdf

7. Blanco Pérez Á, Ruiz Morales Ó, Otero Regino W, Gómez Zuleta M. Clostridium difficile infections in elderly patients. Rev Colomb Gastroenterol [Internet]. 2013 [citado el 7 de junio de 2024];28(1):53–63. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-99572013000100007&script=sci_arttext&tlng=en

8. Sunenshine RH, McDonald LC. Clostridium difficile-associated disease: new challenges from an established pathogen. Cleve Clin J Med [Internet]. 2006;73(2):187–97. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3949/ccjm.73.2.187

9. Van Giau V, Lee H, An SSA, Hulme J. Recent advances in the treatment of C. difficile using biotherapeutic agents. Infect Drug Resist [Internet]. 2019;12:1597–615. Disponible en: http://dx.doi.org/10.2147/idr.s207572

10. Smits WK, Lyras D, Lacy DB, Wilcox MH, Kuijper EJ. Clostridium difficile infection. Nat Rev Dis Primers [Internet]. 2016;2(1). Disponible en: http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2016.20

11. Carter GP, Awad MM, Kelly ML, Rood JI, Lyras D. TcdB or not TcdB: A tale of two Clostridium difficile toxins. Future Microbiol [Internet]. 2011;6(2):121–3. Disponible en: http://dx.doi.org/10.2217/fmb.10.169

12. McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, Owens RC Jr, Kazakova SV, Sambol SP, et al. An Epidemic, Toxin Gene–Variant Strain of*Clostridium difficile*. N Engl J Med [Internet]. 2005;353(23):2433–41. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa051590

13. Chandrasekaran R, Lacy DB. The role of toxins in Clostridium difficile infection. FEMS Microbiol Rev [Internet]. 2017;41(6):723–50. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1093/femsre/fux048

14. Jank T, Aktories K. Structure and mode of action of clostridial glucosylating toxins: the ABCD model. Trends Microbiol [Internet]. 2008;16(5):222–9. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2008.01.011

15. Evans CT, Fitzpatrick M, Ramanathan S, Kralovic SM, Burns SP, Goldstein B, et al. Healthcare facility-onset, healthcare facility-associated *Clostridioides difficile* infection in Veterans with spinal cord injury and disorder. J Spinal Cord Med [Internet]. 2020;43(5):642–52. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1080/10790268.2019.1672953

16. Henrich TJ, Krakower D, Bitton A, Yokoe DS. Clinical Risk Factors for Severe*Clostridium difficile*–associated Disease. Emerg Infect Dis [Internet]. 2009;15(3):415–22. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3201/eid1503.080312

17. Theriot CM, Bowman AA, Young VB. Antibiotic-induced alterations of the gut Microbiota alter secondary bile acid production and allow for Clostridium difficile spore germination and outgrowth in the large intestine. mSphere [Internet]. 2016;1(1). Disponible en: http://dx.doi.org/10.1128/msphere.00045-15

18. Buffie CG, Jarchum I, Equinda M, Lipuma L, Gobourne A, Viale A, et al. Profound alterations of intestinal Microbiota following a single dose of clindamycin results in sustained susceptibility to Clostridium difficile-induced colitis. Infect Immun [Internet]. 2012;80(1):62–73. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1128/iai.05496-11

19. Owens RC Jr, Donskey CJ, Gaynes RP, Loo VG, Muto CA. Antimicrobial-associated risk factors forClostridium difficileinfection. Clin Infect Dis [Internet]. 2008;46(s1):S19–31. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1086/521859

20. Pepin J, Saheb N, Coulombe M-A, Alary M-E, Corriveau M-P, Authier S, et al. Emergence of fluoroquinolones as the predominant risk factor for Clostridium difficile-associated diarrhea: A cohort study during an epidemic in Quebec. Clin Infect Dis [Internet]. 2005;41(9):1254–60. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1086/496986

21. Pérez M, Hurtado AI, Couto I, Gutiérrez JM, Seoane L, Suárez JM, et al. Abordaje multidisciplinario de la infección por Clostridium difficile. Rev Chilena Infectol [Internet]. 2013;30(2):165–85. Disponible en: http://dx.doi.org/10.4067/s0716-10182013000200008.

22. Hernando-Gozalo M, Rescalvo-Casas C, Seijas-Pereda L, Cuadros-González J, Pérez-Tanoira R. Comparison of fidaxomicin, metronidazole and vancomycin for initial episode and recurrence of Clostridioides difficile infection - An observational cohort study. Heliyon [Internet]. 2024;10(10):e30742. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e30742

23. Stranges PM, Hutton DW, Collins CD. Cost-effectiveness analysis evaluating fidaxomicin versus oral vancomycin for the treatment of Clostridium difficile infection in the United States. Value Health [Internet]. 2013;16(2):297–304. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.jval.2012.11.004

24. Heleno CT, Tagintsev A, Lasley K, Summerfield D. Fidaxomicin as a Salvage Therapy for Fulminant Clostridioides difficile Infection. Cureus [Internet]. 2021; Disponible en: http://dx.doi.org/10.7759/cureus.16559

25. Patel S, Preuss CV, Bernice F. Vancomycin. StatPearls Publishing; 2023.

26. Stogios PJ, Savchenko A. Molecular mechanisms of vancomycin resistance. Protein Sci [Internet]. 2020;29(3):654–69. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1002/pro.3819

27. Blaskovich MAT, Hansford KA, Butler MS, Jia Z, Mark AE, Cooper MA. Developments in glycopeptide antibiotics. ACS Infect Dis [Internet]. 2018;4(5):715–35. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1021/acsinfecdis.7b00258

28. Dingsdag SA, Hunter N. Metronidazole: an update on metabolism, structure–cytotoxicity and resistance mechanisms. J Antimicrob Chemother [Internet]. 2018;73(2):265–79. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkx351

29. Deshpande A, Wu X, Huo W, Palmer KL, Hurdle JG. Chromosomal resistance to metronidazole in Clostridioides difficile can be mediated by epistasis between iron homeostasis and oxidoreductases. Antimicrob Agents Chemother [Internet]. 2020;64(8). Disponible en: http://dx.doi.org/10.1128/aac.00415-20

30. Paredes F. Acción de los antibióticos. Perspectiva de la medicación antimicrobiana. Offarm. 2004;23(3):116–24.

31. Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. Cell [Internet]. 2007;130(5):797–810. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.049

32. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: Properties, sources, targets, and their implication in various diseases. Indian J Clin Biochem [Internet]. 2015;30(1):11–26. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0

33. Poole K. Bacterial stress responses as determinants of antimicrobial resistance. J Antimicrob Chemother [Internet]. 2012;67(9):2069–89. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks196

34- Edwards AN, Karim ST, Pascual RA, Jowhar LM, Anderson SE, McBride SM. Chemical and stress resistances of Clostridium difficile spores and vegetative cells. Front Microbiol [Internet]. 2016;7. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.01698

35. Nazar C J. Biofilms bacterianos. Rev Otorrinolaringol Cir Cabeza Cuello [Internet]. 2007;67(1). Disponible en: http://dx.doi.org/10.4067/s0718-48162007000100011

36. Landini P. Cross-talk mechanisms in biofilm formation and responses to environmental and physiological stress in Escherichia coli. Res Microbiol [Internet]. 2009;160(4):259–66. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2009.03.001

37. Thapa T, Leuzzi R, Ng YK, Baban ST, Adamo R, Kuehne SA, et al. Multiple factors modulate biofilm formation by the anaerobic pathogen Clostridium difficile. J Bacteriol [Internet]. 2013 [citado el 14 de junio de 2024];195(3):545–55. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23175653/

38. Lewis K. Persister cells. Annu Rev Microbiol [Internet]. 2010;64(1):357–72. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134306

39. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. Antimicrob Agents Chemother [Internet]. 2001;45(4):999–1007. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1128/aac.45.4.999-1007.2001

40. Harms A, Maisonneuve E, Gerdes K. Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. Science [Internet]. 2016 [citado el 14 de junio de 2024];354(6318). Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27980159/

41. Wolfson JS, Hooper DC, McHugh GL, Bozza MA, Swartz MN. Mutants of Escherichia coli K-12 exhibiting reduced killing by both quinolone and beta-lactam antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother [Internet]. 1990;34(10):1938–43. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1128/aac.34.10.1938

42. Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease. Nat Rev Microbiol [Internet]. 2007;5(1):48–56. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1557

43. Patricelli P, Dell'elce A, Weidmann C, Ramirez E, Presa Rossa C, Aguirre MS, et al. Actividad antibacteriana in vitro de Ciprofloxacina sobre una cepa autóctona de Escherichia coli: efecto del pH sobre su potencia y efecto de la persistencia bacteriana sobre su modo de acción. FAVE Secc Cienc Vet [Internet]. 2017;15(1/2):38–47. Disponible en: http://dx.doi.org/10.14409/favecv.v15i1/2.6579

44. Gutierrez A, Jain S, Bhargava P, Hamblin M, Lobritz MA, Collins JJ. Understanding and sensitizing density-dependent persistence to quinolone antibiotics. Mol Cell [Internet]. 2017;68(6):1147-1154.e3. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2017.11.012

45. Vega NM, Allison KR, Khalil AS, Collins JJ. Signaling-mediated bacterial persister formation. Nat Chem Biol [Internet]. 2012 [citado el 14 de junio de 2024];8(5):431–3. Disponible en: https://www.nature.com/articles/nchembio.915

46. Dörr T, Vulić M, Lewis K. Ciprofloxacin Causes Persister Formation by Inducing the TisB toxin in Escherichia coli. PLoS Biol [Internet]. 2010;8(2):e1000317. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1000317

47. Molina-Quiroz RC, Silva-Valenzuela C, Brewster J, Castro-Nallar E, Levy SB, Camilli A. Cyclic AMP regulates bacterial persistence through repression of the oxidative stress response and SOS-dependent DNA repair in uropathogenic Escherichia coli. MBio [Internet]. 2018 [citado el 14 de junio de 2024];9(1). Disponible en: http://dx.doi.org/10.1128/mbio.02144-17

48. Laghmouchi A, Hoogstraten C, Falkenburg JHF, Jedema I. Long-term in vitro persistence of magnetic properties after magnetic bead-based cell separation of T cells. Scand J Immunol [Internet]. 2020;92(3). Disponible en: http://dx.doi.org/10.1111/sji.12924

49. Liu S, Brul S, Zaat SAJ. Isolation of persister cells of Bacillus subtilis and determination of their susceptibility to antimicrobial peptides. Int J Mol Sci [Internet]. 2021;22(18):10059. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/ijms221810059

50. Cañas-Duarte SJ, Restrepo S, Pedraza JM. Novel protocol for persister cells isolation. PLoS One [Internet]. 2014;9(2):e88660. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0088660

51. Sugimoto S, Arita-Morioka K-I, Mizunoe Y, Yamanaka K, Ogura T. Thioflavin T as a fluorescence probe for monitoring RNA metabolism at molecular and cellular levels. Nucleic Acids Res [Internet]. 2015;43(14):e92–e92. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkv338

52. Podlesek Z, Žgur Bertok D. The DNA damage inducible SOS response is a key player in the generation of bacterial persister cells and population wide tolerance. Front Microbiol [Internet]. 2020;11. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.01785

53. Olive PL, Banáth JP. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. Nat Protoc [Internet]. 2006 [citado el 14 de junio de 2024];1(1):23–9. Disponible en: https://www.nature.com/articles/nprot.2006.5

54. Álvarez R, Inostroza O, Garavaglia M, Minton NP, Paredes-Sabja D, Gil F. Effect of antibiotic treatment on the formation of non-spore Clostridium difficile persister-like cells. J Antimicrob Chemother [Internet]. 2018;73(9):2396–9. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1093/jac/dky186

55. Edwards AN, Suárez JM, McBride SM. Culturing and Maintaining Clostridium difficile in an Anaerobic Environment. J Vis Exp [Internet]. 2013;(79). Disponible en: http://dx.doi.org/10.3791/50787

56. Solanky D, Haydel SE. Adaptation of the neutral bacterial comet assay to assess antimicrobial-mediated DNA double-strand breaks in Escherichia coli. J Microbiol Methods [Internet]. 2012;91(2):257–61. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2012.08.009

57. SPSS statistics subscription - early access [Internet]. Ibm.com. 2021 [citado el 14 de junio de 2024]. Disponible en: https://www.ibm.com/docs/es/spss-statistics/beta?topic=anova-one-way-post-hoc-tests

58. Crowley LC, Scott AP, Marfell BJ, Boughaba JA, Chojnowski G, Waterhouse NJ. Measuring cell death by propidium iodide uptake and flow cytometry. Cold Spring Harb Protoc [Internet]. 2016;2016(7):db.prot087163. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1101/pdb.prot087163

59. Fernández-Martínez LT, Javelle A, Hoskisson PA. Microbial Primer: Bacterial growth kinetics: This article is part of the Microbial Primers collection. Microbiology [Internet]. 2024;170(2). Disponible en: http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.001428

60. Krishnamurthi VR, Niyonshuti II, Chen J, Wang Y. A new analysis method for evaluating bacterial growth with microplate readers. PLoS One [Internet]. 2021;16(1):e0245205. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0245205

61. Reddy CA, Beveridge TJ, Breznak JA, Marzluf G. Methods for general and molecular microbiology. American Society for Microbiology Press; 2007.

62. Wang L, Fan D, Chen W, Terentjev EM. Bacterial growth, detachment and cell size control on polyethylene terephthalate surfaces. Sci Rep [Internet]. 2015 [citado el 14 de junio de 2024];5(1):1–11. Disponible en: https://www.nature.com/articles/srep15159

63. Traub WH, Spohr M, Bauer D. Growth curves of clostridium perfringens in schaedler and brain heart infusion broths. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A [Internet]. 1987;266(1–2):226–30. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/s0176-6724(87)80035-4

64. Balaban NQ, Helaine S, Lewis K, Ackermann M, Aldridge B, Andersson DI, et al. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. Nat Rev Microbiol [Internet]. 2019 [citado el 14 de junio de 2024];17(7):441–8. Disponible en: https://www.nature.com/articles/s41579-019-0196-3

65. Isidro J, Mendes AL, Serrano M, Henriques AO, Oleastro M. Overview of Clostridium difficile infection: Life cycle, epidemiology, antimicrobial resistance and treatment. En: Clostridium Difficile - A Comprehensive Overview. InTech; 2017.

66. Antunes A, Camiade E, Monot M, Courtois E, Barbut F, Sernova NV, et al. Global transcriptional control by glucose and carbon regulator CcpA in Clostridium difficile. Nucleic Acids Res [Internet]. 2012;40(21):10701–18. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks864

67. Lee CD, Rizvi A, Edwards AN, DiCandia MA, Vargas Cuebas GG, Monteiro MP, et al. Genetic mechanisms governing sporulation initiation in Clostridioides difficile. Curr Opin Microbiol [Internet]. 2022;66:32–8. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2021.12.001

68. Kevorkian Y, Shen A. Revisiting the role of csp family proteins in regulating Clostridium difficile spore germination. J Bacteriol [Internet]. 2017;199(22). Disponible en: http://dx.doi.org/10.1128/jb.00266-17

69. Khare A, Tavazoie S. Extreme antibiotic persistence via heterogeneity-generating mutations targeting translation. mSystems [Internet]. 2020;5(1). Disponible en: http://dx.doi.org/10.1128/msystems.00847-19

70. Biancalana M, Koide S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. Biochim Biophys Acta Proteins Proteom [Internet]. 2010;1804(7):1405–12. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.04.001

71. Wood TK, Song S, Yamasaki R. Ribosome dependence of persister cell formation and resuscitation. J Microbiol [Internet]. 2019;57(3):213–9. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1007/s12275-019-8629-2

72. Wagstaff JM, Tsim M, Oliva MA, García-Sanchez A, Kureisaite-Ciziene D, Andreu JM, et al. A polymerization-associated structural switch in FtsZ that enables treadmilling of model filaments. MBio [Internet]. 2017;8(3). Disponible en: http://dx.doi.org/10.1128/mbio.00254-17

73. Pastoret S, Fraipont C, den Blaauwen T, Wolf B, Aarsman MEG, Piette A, et al. Functional analysis of the cell division protein FtsW ofEscherichia coli. J Bacteriol [Internet]. 2004;186(24):8370–9. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1128/jb.186.24.8370-8379.2004

74. Helaine S, Cheverton AM, Watson KG, Faure LM, Matthews SA, Holden DW. Internalization of Salmonella by macrophages induces formation of nonreplicating persisters. Science [Internet]. 2014 [citado el 14 de junio de 2024];343(6167):204–8. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24408438/

75. Li J, Zhao X. Effects of quorum sensing on the biofilm formation and viable but non-culturable state. Food Res Int [Internet]. 2020;137(109742):109742. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109742

76. He X, Yuan F, Lu F, Yin Y, Cao J. Vancomycin-induced biofilm formation by methicillin-resistant Staphylococcus aureus is associated with the secretion of membrane vesicles. Microb Pathog [Internet]. 2017;110:225–31. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2017.07.004

77. Doan T-H-D, Bernet-Camard M-F, Hoÿs S, Janoir C, Péchiné S. Impact of subinhibitory concentrations of metronidazole on morphology, motility, biofilm formation and colonization of Clostridioides difficile. Antibiotics (Basel) [Internet]. 2022;11(5):624. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics11050624

78. Conlon BP, Rowe SE, Gandt AB, Nuxoll AS, Donegan NP, Zalis EA, et al. Persister formation in Staphylococcus aureus is associated with ATP depletion. Nat Microbiol [Internet]. 2016 [citado el 14 de junio de 2024];1(5). Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27398229/

79. Gil F, Calderón IL, Fuentes JA, Paredes-Sabja D. Clostridioides (Clostridium) difficile infection: Current and alternative therapeutic strategies. Future Microbiol [Internet]. 2018;13(4):469–82. Disponible en: http://dx.doi.org/10.2217/fmb-2017-0203

80. Walters BA, Roberts R, Stafford R, Seneviratne E. Relapse of antibiotic associated colitis: endogenous persistence of Clostridium difficile during vancomycin therapy. Gut [Internet]. 1983;24(3):206–12. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1136/gut.24.3.206

81. Trastoy R, Manso T, Fernández-García L, Blasco L, Ambroa A, Pérez del Molino ML, et al. Mechanisms of bacterial tolerance and persistence in the gastrointestinal and respiratory environments. Clin Microbiol Rev [Internet]. 2018;31(4). Disponible en: http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00023-18

82. Dörr T, Lewis K, Vulić M. SOS Response Induces Persistence to Fluoroquinolones in Escherichia coli. PLoS Genet [Internet]. 2009;5(12):e1000760. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1000760

83. Kwan BW, Valenta JA, Benedik MJ, Wood TK. Arrested protein synthesis increases persister-like cell formation. Antimicrob Agents Chemother [Internet]. 2013;57(3):1468–73. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1128/aac.02135-12

84. Page R, Peti W. Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. Nat Chem Biol [Internet]. 2016 [citado el 14 de junio de 2024];12(4):208–14. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26991085/

85. Mohiuddin SG, Ghosh S, Ngo HG, Sensenbach S, Karki P, Dewangan NK, et al. Cellular self-digestion and persistence in bacteria. Microorganisms [Internet]. 2021;9(11):2269. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms9112269

86. Leszczynska D, Matuszewska E, Kuczynska-Wisnik D, Furmanek-Blaszk B, Laskowska E. The formation of persister cells in stationary-phase cultures of Escherichia coli is associated with the aggregation of endogenous proteins. PLoS One [Internet]. 2013;8(1):e54737. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0054737

87. Zhang L, Yu W, Tang Y, Li H, Ma X, Liu Z. RNA chaperone hfq mediates persistence to multiple antibiotics in Aeromonas veronii. Microb Pathog [Internet]. 2019;132:124–8. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2019.04.045

88. Aljghami ME, Barghash MM, Majaesic E, Bhandari V, Houry WA. Cellular functions of the ClpP protease impacting bacterial virulence. Front Mol Biosci [Internet]. 2022;9. Disponible en: http://dx.doi.org/10.3389/fmolb.2022.1054408

89. Queraltó C, Álvarez R, Ortega C, Díaz-Yáñez F, Paredes-Sabja D, Gil F. Role and regulation of Clp proteases: A target against Gram-positive bacteria. Bacteria [Internet]. 2023 [citado el 14 de junio de 2024];2(1):21–36. Disponible en: https://www.mdpi.com/2674-1334/2/1/2

90. Álvarez R, Ortega-Fuentes C, Queraltó C, Inostroza O, Díaz-Yáñez F, González R, et al. Evaluation of functionality of type II toxin-antitoxin systems of Clostridioides difficile R20291. Microbiol Res [Internet]. 2020;239(126539):126539. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2020.126539

91. Lavey NP, Shadid T, Ballard JD, Duerfeldt AS. Clostridium difficile ClpP homologues are capable of uncoupled activity and exhibit different levels of susceptibility to acyldepsipeptide modulation. ACS Infect Dis [Internet]. 2019 [citado el 14 de junio de 2024];5(1):79–89. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1021/acsinfecdis.8b00199

92. Queraltó C, Ortega C, Díaz-Yáñez F, Inostroza O, Espinoza G, Álvarez R, et al. The chaperone ClpC participates in sporulation, motility, biofilm, and toxin production of Clostridioides difficile. J Glob Antimicrob Resist [Internet]. 2023;33:328–36. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2023.05.004

93. Maslowska KH, Makiela-Dzbenska K, Fijalkowska IJ. The SOS system: A complex and tightly regulated response to DNA damage. Environ Mol Mutagen [Internet]. 2019;60(4):368–84. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1002/em.22267

94. Suárez C, Gudiol F. Antibióticos betalactámicos. Enferm Infecc Microbiol Clin [Internet]. 2009;27(2):116–29. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001

95. Farr SB, Kogoma T. Oxidative stress responses in Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Microbiol Rev [Internet]. 1991 [citado el 14 de junio de 2024];55(4):561–85. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1128/mr.55.4.561-585.1991

96. Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. Cell [Internet]. 2007;130(5):797–810. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.049

97. Fenchel T, King GM, Blackburn TH. Bacterial metabolism. En: Bacterial Biogeochemistry. Elsevier; 2012. p. 1–34.