

EFFECTOS DEL TRATAMIENTO CON ALOE VERA SOBRE EL CULTIVO DE CLOSTRIDIODES DIFFICILE

Trabajo Final de Grado
de la alumna



**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.**

Junín, 22 de noviembre del 2024

**EFFECTOS DEL TRATAMIENTO CON ALOE VERA SOBRE EL CULTIVO DE
CLOSTRIDIODES DIFFICILE**

Trabajo Final de Grado

de la alumna

MARÍA DEL MAR AGOSTI

Aprobada por el Tribunal Evaluador

(Nombre y Apellido)
Evaluador/a

(Nombre y Apellido)
Evaluador/a

(Nombre y Apellido)
Evaluador/a



Dra. Virginia Pasquinelli
Co-Director/a



Dra. Sabina Palma
Director/a

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Junín, 22 de noviembre del 2024

AGRADECIMIENTOS

En 2019 inicié un camino que, en ese entonces, me parecía largo e incierto. No podía imaginar que algún día estaría escribiendo mi trabajo final de grado. Al comenzar la licenciatura, no estaba segura si realmente me apasionaría este camino, o si me veía trabajando en un laboratorio en el futuro. Sin embargo, siendo de Pergamino, la UNNOBA me ofreció una oportunidad invaluable: la posibilidad de estudiar Genética sin tener que mudarme a otra localidad o provincia. Esta comodidad fue el primer paso en un recorrido que, aunque lleno de desafíos, también estuvo repleto de mates, amistades y momentos que hicieron que mi experiencia universitaria fuera mucho más que académica.

Con el paso de los días, los cuatrimestres y los exámenes, me fueron gustando más y más los temas que aprendía y cómo iba encontrando respuestas para la curiosidad que siempre me acompañó. Recuerdo cómo de pequeña, atormentaba a mi mamá con preguntas interminables, y cómo ella, cansada de mis inquietudes, a veces solo me respondía: "Nunca me lo había preguntado" o simplemente "Eso es así, porque sí". Hoy, recordamos esos momentos y nos reímos porque gracias a esta carrera pude responder muchas de aquellas preguntas que me intrigaban en mi infancia, y para las nuevas, basta con buscar algún artículo científico que me las resuelva. Por eso, estaré eternamente agradecida por haber tenido la oportunidad de transitar este camino en mi ciudad, siendo una carrera que se encuentra en muy pocas universidades y que te llena de conocimientos y herramientas para crecer día a día. Yo no me encontraría en este momento de mi vida si no fuera por la UNNOBA, una universidad pública de gran calidad, que permite que personas como yo, que no hubiesen podido afrontar los costos de otro tipo de educación, hoy se esté sumando al plantel de profesionales que ofrece este país. Personas con ganas constantes de superarse y de sumar conocimiento y renombre a lo que se hace en Argentina, cada uno aportando desde su ámbito y con gran esfuerzo.

A lo largo de estos cinco años, tuve la fortuna de aprender de muchos docentes, pero aquellos que más me marcaron fueron los que enseñan con verdadera pasión. Aquellos que repiten y explican hasta que logramos comprender, y que logran transmitirnos ese amor por lo que enseñan. Una de ellas fue Virginia Pasquinelli, quien nos entretenía con el funcionamiento del sistema inmunológico. Su entusiasmo era tal que parecía que todo tuviera sentido y fuera fácil de comprender. Fue esa búsqueda de mi propia pasión la que me llevó a preguntarle si podría hacer mi trabajo final de grado en alguna de sus líneas de investigación. Así fue como me habló de una propuesta que combinaba plantas medicinales y ensayos microbiológicos, lo cual me interesó desde el primer momento que lo escuché. Estoy profundamente agradecida con Vir por haber confiado en mí y darme la oportunidad de sumarme a su equipo, como también por haber estado siempre a disposición nuestra cuando lo necesitamos.

Sabi fue un pilar en este proceso. Estuvo a mi lado en cada experimento, aclarando cada duda, enseñándome a manejar equipos y técnicas, y siempre con una paciencia y dedicación enormes. No solo fue mi guía en el laboratorio, sino también una consejera en cada charla y una gran confidente, por lo que le estaré eternamente agradecida. Fue una gran directora que me mostró lo lindo de trabajar en un laboratorio y lo entusiasmante de hacer investigación. Su apoyo fue clave para que hoy pueda sentir orgullo de este trabajo y siempre estará en mi recuerdo este tiempo transcurrido en el laboratorio.

Agradezco también a Rodri, An, Nico y Agos, quienes hicieron que cada jornada en el laboratorio estuviera llena de risas y aprendizaje. Gracias por estar siempre dispuestos a ayudarme y por compartir tantos mates y charlas que hicieron que el trabajo fuera mucho más ameno. Son grandes personas que agradezco el haber podido conocer y compartir a su lado. A Andy, que aunque solo compartimos unos pocos meses, su ocurrencia y habilidad para encontrar soluciones a cualquier problema me enseñó mucho. Un agradecimiento especial por su generosidad a Mariana Bracco, que siempre estuvo

dispuesta a acompañarnos al campo experimental y a compartir su conocimiento sobre las plantas para que el invernadero se mantenga en pie. Agradecerles también a Nati y a Gasti, grandes profesionales que siempre están a disposición para ayudarnos en el laboratorio y resolver cada duda.

Mis compañeros de cursada, Agos, Ire y Fran, fueron clave en cada momento de estudio y tardes de mateadas que se convirtieron en recuerdos que guardaré por siempre. Juntos cumplimos con nuestras responsabilidades, pero también compartimos risas, frustraciones y momentos que nos unieron más allá del aula. Hoy atesoro esos momentos compartidos con gran cariño. A Agos, además, le agradezco por este año de convivencia, donde comenzamos una nueva etapa y crecimos juntas, donde después de un día agotador de laboratorio, podíamos tener charlas de cualquier estilo, mediadas con unos mates y haciendo que toda la vecindad conozca nuestros problemas.

A todas mis amigas: Ori, Cata, Lu, Valen, Sofo, Eve, Cami, Pau, Juli S, Terri, Coty, Pau Z, Belu y Juli L. Ustedes son parte esencial de mi vida. Gracias por estar siempre, por cada consejo y por compartir tantos momentos. Siempre fueron uno de los motivos por los que volvía a Pergamino los fines de semana, con ganas de compartir y reírme como solo hago con ustedes. Espero que la vida nos siga regalando más risas y momentos juntas. Las elijo hoy y siempre.

Mi familia ha sido mi mayor sostén desde que tengo memoria. Mi abuela Mirta, quien siempre me mima a la distancia cuando no puede prepararme una rica torta para compartir unos mates. Mis tíos Caro, Leo, Javier, Celeste, Ale y Jhonny quienes estuvieron en cada momento que me tocó transitar y siempre dispuestos a escucharme y ayudarme. Mis primos Lu, Pato, Tomi, Mate, Sere, Beni, Ori y Cami, quienes con sus distintas intervenciones, me han enseñado que las risas mejoran cada momento. Mi hermano Matías y mi cuñada Jime, con los que siempre puedo contar para lo que necesite y compartimos tan lindos momentos. A todos ellos les agradezco profundamente

por su constante apoyo y amor incondicional.

Pero, sobre todo, le agradezco a mis padres, Amorina y Daniel. Nada de esto hubiera sido posible sin ustedes. Desde el primer día, me apoyaron incondicionalmente, aconsejándome en los momentos de incertidumbre y celebrando cada uno de mis logros. Son mi mayor ejemplo, no solo por lo maravillosas personas que son, sino por los valores que me inculcaron. Los amo con todo mi corazón, no podría estar más agradecida de tenerlos a mi lado.

El camino fue largo, pero cada persona que me acompañó en él ha dejado una huella imborrable. A todos y cada uno, gracias, porque de una forma u otra, contribuyeron a que hoy esté cumpliendo este sueño.

¡Gracias!

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
<i>Clostridioides difficile</i> : epidemiología y factores de riesgo	1
Factores de virulencia de <i>C. difficile</i>	2
Tratamiento de la CDI	8
<i>C. difficile</i> y el epitelio intestinal	9
Aloe Vera	11
Actividad antimicrobiana	14
Actividad protectora intestinal	16
Administración como tratamiento en patologías intestinales	16
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	18
Hipótesis	18
Objetivo General	18
Objetivos Específicos	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
Extractos de AV	19
Cultivo de <i>C. difficile</i>	20
Efecto anti-bacteriano del AV sobre <i>C. difficile</i>	21
Viabilidad bacteriana por citometría de flujo	22
Ensayo de XTT	23
Concentración Bactericida Mínima	23
Efecto combinado del AV y de Vancomicina/Metronidazol sobre <i>C. difficile</i>	24
Efecto del AV sobre la formación de biofilm de <i>C. difficile</i>	25
Obtención del secretoma de <i>C. difficile</i>	25
Crecimiento de la línea celular Caco-2	26
Tinción con Hematoxilina y Eosina de las Caco-2.....	26

Viabilidad de la línea celular Caco-2 por citometría de flujo	27
Expresión de Claudina-1 evaluada por microscopía de fluorescencia	27
Análisis estadísticos	28
RESULTADOS.....	29
El AV inhibe el crecimiento de <i>C. difficile</i>	29
<i>Aloe saponaria</i> potencia el efecto de la Vancomicina y del Metronidazol frente a <i>C. difficile</i>	31
Efecto de <i>Aloe saponaria</i> frente a la formación de biofilm de <i>C. difficile</i>	32
<i>Aloe saponaria</i> protege <i>in vitro</i> la integridad del epitelio intestinal.....	33
<i>Aloe saponaria</i> preserva las uniones estrechas entre células adyacentes	36
DISCUSIÓN	38
CONCLUSIÓN	44
BIBLIOGRAFÍA	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura génica de las toxinas de <i>C. difficile</i>	4
Figura 2. Efectos de las toxinas de <i>C. difficile</i> sobre las células epiteliales del intestino	5
Figura 3. Modelo de biofilm de <i>C. difficile</i> durante la infección	7
Figura 4. Esquematación de la mucosa intestinal	10
Figura 5. Representación de las plantas de AV	13
Figura 6. Efectos farmacológicos de los principales componentes del AV	15
Figura 7. Flujo de trabajo para el cultivo de <i>C. difficile</i>	21
Figura 8. El extracto de AV afecta el crecimiento de <i>C. difficile</i>	30
Figura 9. <i>Aloe saponaria</i> potencia el efecto de la Vancomicina y del Metronidazol frente a <i>C. difficile</i>	32
Figura 10. Efecto del AV sobre la formación de biofilm de <i>C. difficile</i>	33
Figura 11. Efecto protector de <i>Aloe saponaria</i> sobre la monocapa de las Caco-2 ante el tratamiento con <i>C. difficile</i>	35
Figura 12. <i>Aloe saponaria</i> no afecta la viabilidad celular en las Caco-2 enfrentadas a <i>C. difficile</i>	36
Figura 13. <i>Aloe saponaria</i> incrementa la expresión de Claudina-1 en las células tratadas con <i>C. difficile</i>	37

LISTADO DE ABREVIATURAS

AV: Aloe Vera

ADNe: ADN extracelular

BHI: Infusión cerebro-corazón (del inglés, *Brain Heart Infusion*)

C. *difficile*: *Clostridioides difficile*

CBM: Concentración Bactericida Mínima

CDI: Infección por *Clostridioides difficile*

CDT: *Clostridioides difficile* Transferasa

CIM: Concentración Inhibitoria Mínima

DMEM: Medio Eagle modificado de Dulbecco (del inglés, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DO: Densidad Óptica

DSS: Sulfato de Sodio de Dextrano

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia

IgAs: Inmunoglobulina A Secretoria

IP: Ioduro de Propidio

PBS: Buffer Fosfato Salino

PFA: Paraformaldehído

SFB: Suero Fetal Bovino

TcdA: Toxina A

TcdB: Toxina B

TO: Naranja de Tiazol

UFC: Unidades Formadoras de Colonia

RESUMEN

Clostridioides difficile (*C. difficile*) es un bacilo anaerobio, gram-positivo, productor de toxinas y formador de esporas, que coloniza el intestino humano en condiciones de disbiosis de la microbiota intestinal. La infección por *C. difficile* (CDI) es la causa más frecuente de diarrea intrahospitalaria y provoca desde cuadros leves hasta sepsis e incluso la muerte. Su virulencia se debe a su capacidad de esporular, producir toxinas y formar biofilm. El tratamiento estándar para la CDI en Argentina se basa en la administración de Vancomicina o Metronidazol.

El Aloe Vera (AV), conocido por sus propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y regenerativas, se utiliza como terapia alternativa frente a la disbiosis intestinal. Este trabajo tuvo como principal objetivo, evaluar el efecto del AV sobre el crecimiento de *C. difficile* y su potencial en combinación con los antibióticos Vancomicina y Metronidazol. Los ensayos mostraron que el AV inhibe significativamente el crecimiento de *C. difficile* y potencia la acción de ambos antibióticos ($p < 0,01$).

Por otra parte, se evaluó el efecto del AV sobre la integridad del epitelio intestinal. Para ello, se utilizaron las células Caco-2 diferenciadas a enterocito y se trataron con *C. difficile* y/o su secretoma en presencia/ausencia del extracto acuoso de AV. El AV protegió el epitelio intestinal del daño inducido por *C. difficile* y/o su secretoma ($p < 0,01$), incrementando la expresión de Claudina-1 ($p < 0,01$), clave para la integridad de las uniones.

Estos resultados posicionan al AV como una potencial terapia combinada que permitiría combatir la infección reduciendo las concentraciones de antibióticos administradas y favoreciendo la integridad del epitelio intestinal.

INTRODUCCIÓN

***Clostridioides difficile*: epidemiología y factores de riesgo**

Clostridioides difficile (*C. difficile*) es un bacilo anaerobio, gram-positivo, formador de esporas y productor de toxinas que coloniza el intestino y puede formar parte de la flora intestinal comensal de adultos asintomáticos ya que es ubicuo en el medio natural. La infección por *Clostridioides difficile* (CDI) es la causa más común de diarrea intrahospitalaria. En Europa, el número estimado de casos es de 124.000 al año y *C. difficile* fue el sexto microorganismo más frecuente responsable de infecciones asociadas a la atención sanitaria durante el estudio de prevalencia puntual europeo de 2016 a 2017 (Abad & Safdar, 2021).

En los países en vías de desarrollo, la epidemiología de la CDI se encuentra subestimada debido a las limitaciones en las políticas públicas, los recursos disponibles y los protocolos de vigilancia (Curcio et al., 2019). Sólo se dispone de escasos datos sobre la incidencia y la prevalencia de *C. difficile* como causa de diarrea en la Argentina. Puntualmente, en la Provincia de Buenos Aires, solo se cuenta con un estudio realizado en la ciudad de Junín, por nuestro grupo de trabajo (Barbero et al., 2024). Los resultados obtenidos demostraron a *C. difficile* como el agente causal de la diarrea en 1 de cada 5 pacientes (21,29%) y un tercio de los casos adquiridos en la comunidad (Barbero et al., 2024).

Aunque *C. difficile* se considera un patógeno nosocomial que se manifiesta en pacientes expuestos al tratamiento con antibióticos, se estima que cuatro de cada diez pacientes diagnosticados con CDI, adquieren la infección de individuos no hospitalizados, muchos de los cuales no han sido tratados con antibióticos. Contraer *C. difficile* también

puede ocurrir a través del contacto con animales infectados (Dicks, 2023). Estudios realizados en todo el mundo han notificado la presencia de la bacteria en animales y alimentos. Los animales son una fuente importante de CDI humana, ya sea por contaminación ambiental o contaminación de los alimentos, incluida la contaminación de la carne en el momento del sacrificio o, en el caso de las verduras y otras frutas, por el uso de fertilizantes orgánicos o agua contaminada (Rodríguez et al., 2016). Las esporas de *C. difficile* se transmiten por vía fecal-oral, y el patógeno está ampliamente presente en el medio ambiente. Los reservorios potenciales para *C. difficile* incluyen portadores asintomáticos, pacientes infectados, el medio ambiente contaminado y el tracto intestinal de los animales (caninos, felinos, porcinos, aviares) (Czepiel et al., 2019). Así, *C. difficile* debe considerarse un patógeno zoonótico (Rodríguez et al., 2016).

La CDI asociada a la atención sanitaria tiene tasas más altas de recurrencia y muerte, lo que puede deberse a la cepa norteamericana de tipo 1 (NAP1) que es la más común en esos casos (Kelly et al., 2021). Al considerar los factores de riesgo para la CDI, la genética, la microbiota residente, la edad, la inmunidad y las comorbilidades juegan un papel en la modulación del riesgo en el hospedador (Di Bella et al., 2024). El principal factor de riesgo es el tratamiento antibiótico que provoca un desbalance en la microbiota intestinal y propicia la colonización en condiciones de disbiosis. A su vez, la edad avanzada (69 años o más), la hospitalización previa y los episodios previos de CDI también se presentan como factores determinantes que predisponen al desarrollo de la infección (Hernández Del Pino et al., 2021).

Factores de virulencia de *C. difficile*

La patogenicidad de *C. difficile* depende del efecto sinérgico de múltiples factores de virulencia, entre los que se encuentran las esporas, las toxinas y la capacidad de formar biofilm (Ouyang et al., 2024). Debido a que *C. difficile* es un patógeno anaeróbico

obligado, las células vegetativas no pueden sobrevivir fuera del hospedador en el ambiente aeróbico. Por su parte, las esporas son los cuerpos latentes de *C. difficile* y toleran el oxígeno y los desinfectantes a base de etanol para sobrevivir en el medio ambiente durante meses (Zhu et al., 2018). Además, en respuesta al estrés farmacológico y al ataque del sistema inmune del hospedador, *C. difficile* forma esporas y biofilm, lo que le permite colonizar y persistir en el intestino (Ouyang et al., 2024).

Otro factor de virulencia fundamental es la producción de toxinas: la toxina A (TcdA), la toxina B (TcdB) y la toxina binaria llamada *C. difficile* transferasa (CDT). La mayoría de las cepas de *C. difficile* producen principalmente, TcdA y TcdB, generadas por los genes *tcdA* y *tcdB*, dentro de los *loci* de patogenicidad (PaLoc) (**Figura 1a**) (Anwar et al., 2022). Aproximadamente el 20% de las cepas de *C. difficile* producen la toxina CDT codificada por los genes *cdtA* y *cdtB*, ubicados dentro de una región de 6.2 kb designada como el locus CDT (**Figura 1b**). En cepas epidémicas del ribotipo 027, CdtR regula positivamente la producción de CDT y de TcdA y TcdB. Esta regulación ocurre a nivel transcripcional, posiblemente a través de la regulación indirecta de TcdR, un regulador positivo de la expresión del gen PaLoc (Cruz-López et al., 2022). Por esta razón, se cree que CDT aumenta la toxicidad de TcdA y TcdB y está relacionada con una enfermedad más grave y mayores tasas de esporulación (Cruz-López et al., 2022; Di Bella et al., 2016).

Ha sido demostrado que la producción de TcdA y TcdB ocurre en respuesta a varias condiciones ambientales, como la disponibilidad de nutrientes específicos, temperatura, densidad celular y presencia de antibióticos (Majumdar & Govind, 2022). También, se ha propuesto que las toxinas funcionan sinérgicamente para causar la enfermedad: una vez que TcdA ha atravesado el epitelio intestinal, las células inmunes en la lámina propia quedan expuestas a TcdB, lo que desencadena la inflamación y el daño intestinal (Ng et al., 2010).

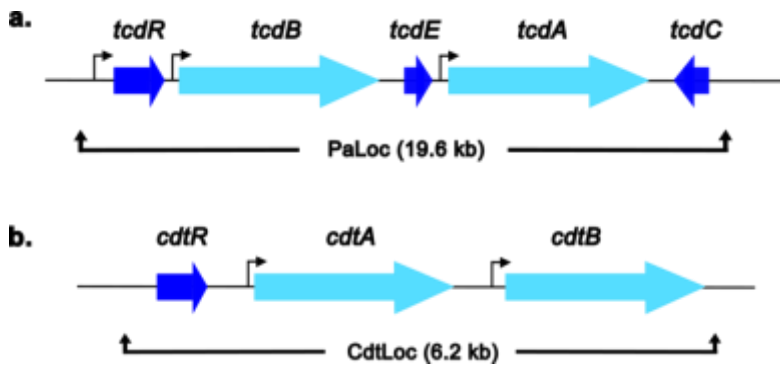


Figura 1. Estructura génica de las toxinas de *C. difficile*. a. Locus PaLoc: los genes que codifican para TcdA y TcdB, *tcdA* y *tcdB*, están en celeste y, los genes reguladores representados en azul. b. Locus binario CdtLoc: los genes que codifican CDT, *cdtA* y *cdtB*, en celeste y el gen regulador en azul. *cdtR* también induce la producción de TcdA y TcdB. Figura tomada y modificada de Alam & Madan, 2024.

TcdA y TcdB, son glucosiltransferasas que se dirigen a las GTPasas de la célula huésped, incluidas Rho, Rac y Cdc42 (**Figura 2a**). Las toxinas de *C. difficile* ingresan a las células epiteliales uniéndose a uno o más receptores presentes en la superficie celular. La unión al receptor es seguida por la endocitosis, que inicia rápidamente múltiples eventos de señalización. Para TcdA y TcdB, la endocitosis de toxinas conduce a la inactivación de Rho GTPasas, lo que resulta en el desmontaje de las fibras de actina y el colapso del citoesqueleto que conlleva al redondeo de las células, la disminución del volumen celular y la pérdida de contactos célula-célula. La endocitosis de CDT evita la elongación del filamento de actina, lo que nuevamente resulta en el colapso del citoesqueleto. Por lo tanto, todas las toxinas de *C. difficile* dan como resultado el redondeo celular (**Figura 2b**) (Engevik et al., 2020). Este proceso conduce a la muerte celular, altera la función de barrera intestinal y desencadena una respuesta inflamatoria en el intestino (Alam & Madan, 2024). Los síntomas se exacerbaban aún más por la respuesta inmune del huésped, que implica una respuesta inflamatoria intestinal aguda e infiltración de neutrófilos, dañando aún más los epitelios (Buddle & Fagan, 2023), causando así una serie de síntomas clínicos como diarrea, colitis pseudomembranosa, megacolon tóxico e incluso la muerte (Anwar et al., 2022).

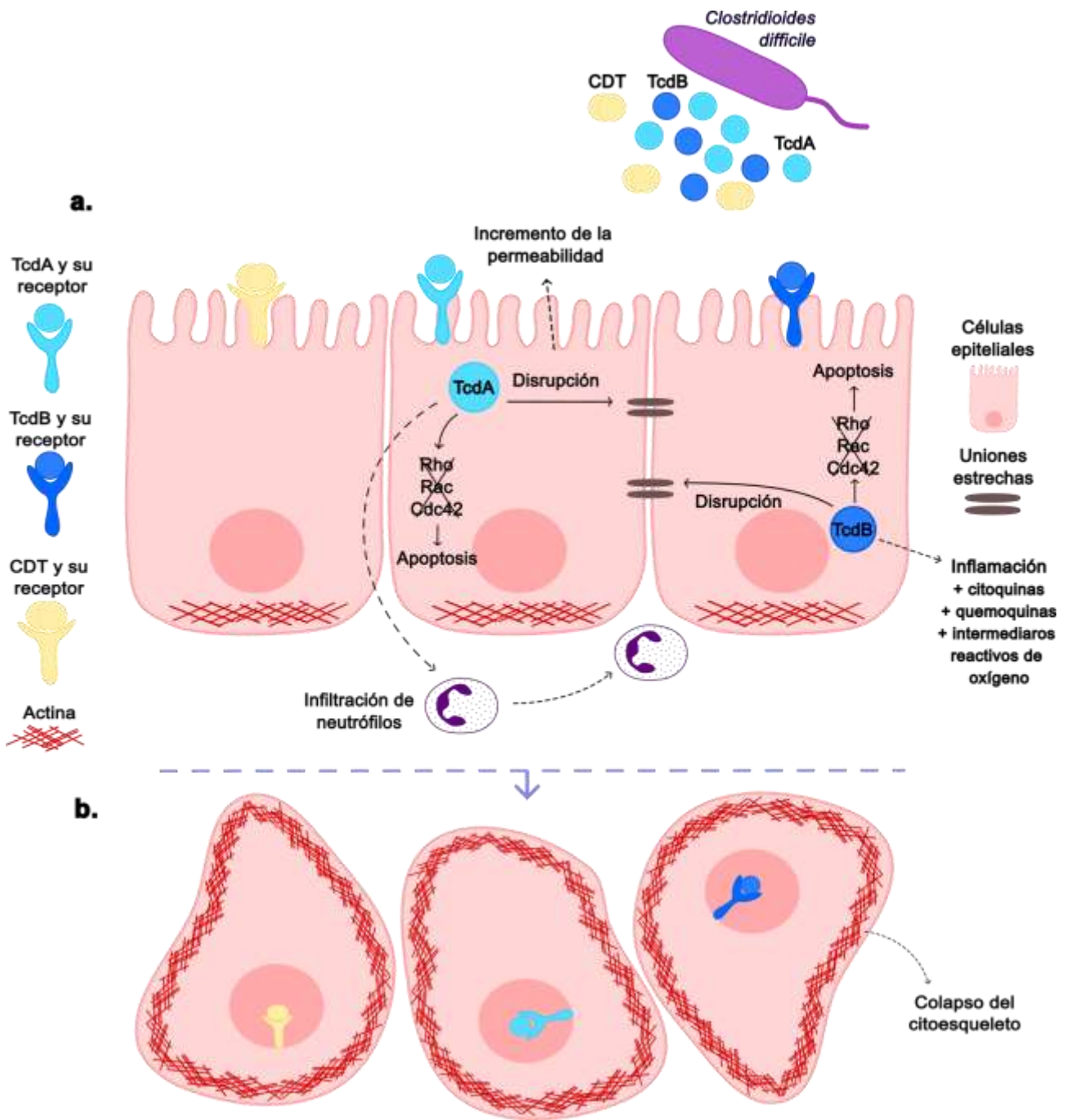


Figura 2. Efectos de las toxinas de *C. difficile* sobre las células epiteliales del intestino. a. Efectos de TcdA y TcdB en células intestinales durante la infección. La exposición de las células epiteliales intestinales a TcdA conduce a la infiltración de neutrófilos, producción de quemoquinas, producción de intermediarios reactivos de oxígeno, alteración de las uniones estrechas y apoptosis. La actividad de TcdB conduce a la alteración de las uniones estrechas y apoptosis. Una combinación de una o más de estas actividades conduce a la acumulación de líquido en el hospedador y a respuestas inflamatorias. Figura tomada y modificada de Voth & Ballard, 2005. **b.** Desmontaje de las fibras de actina y el colapso del citoesqueleto por acción de las toxinas de *C. difficile*. Como resultado se produce el redondeo de las células, la disminución del volumen celular y la pérdida de contactos célula-célula. Figura tomada y modificada de Engevik et al., 2020.

Además de la capacidad de esporular y producir toxinas, otro factor de virulencia de *C. difficile* asociado con la recurrencia de la CDI, es la formación de biofilm. Un biofilm

es una comunidad de bacterias organizadas que incluye una o varias especies que crecen adheridas o no adheridas a una superficie biótica o abiótica (Rubio-Mendoza et al., 2023). Muchas cepas de *C. difficile* clínicamente importantes forman biofilm, que proporciona un reservorio potencial para la persistencia de las esporas. La capacidad de este patógeno para formar endosporas permite a las bacterias evadir los efectos antimicrobianos del tratamiento y causar un alto nivel de recurrencia, ya que las esporas permanecen en el intestino por tiempos prolongados luego de completado el régimen de tratamiento (James et al., 2018). El primer paso en la formación de biofilm implica la adherencia de bacterias planctónicas a superficies anatómicas, como las células epiteliales del hospedador, seguida de su propagación en comunidades celulares complejas. Se identifican cuatro etapas en la formación del biofilm: (1) adhesión bacteriana reversible; (2) unión semi-irreversible; (3) maduración del biofilm; y (4) dispersión bacteriana inducida (Beitelshees et al., 2018). En la **Figura 3**, se describe el modelo propuesto para la formación del biofilm durante la CDI (Frostid et al., 2021). El ADN extracelular (ADNe) es el componente principal de la matriz en un biofilm maduro, mientras que los polisacáridos y las proteínas se encuentran en menor medida. Sin embargo, las proteínas juegan un papel importante durante las primeras etapas de la formación del biofilm. El papel del ADNe en la formación es ayudar a que las células de *C. difficile* se adhieran entre sí en grandes agregados o estructuras (Tremblay & Dupuy, 2022).

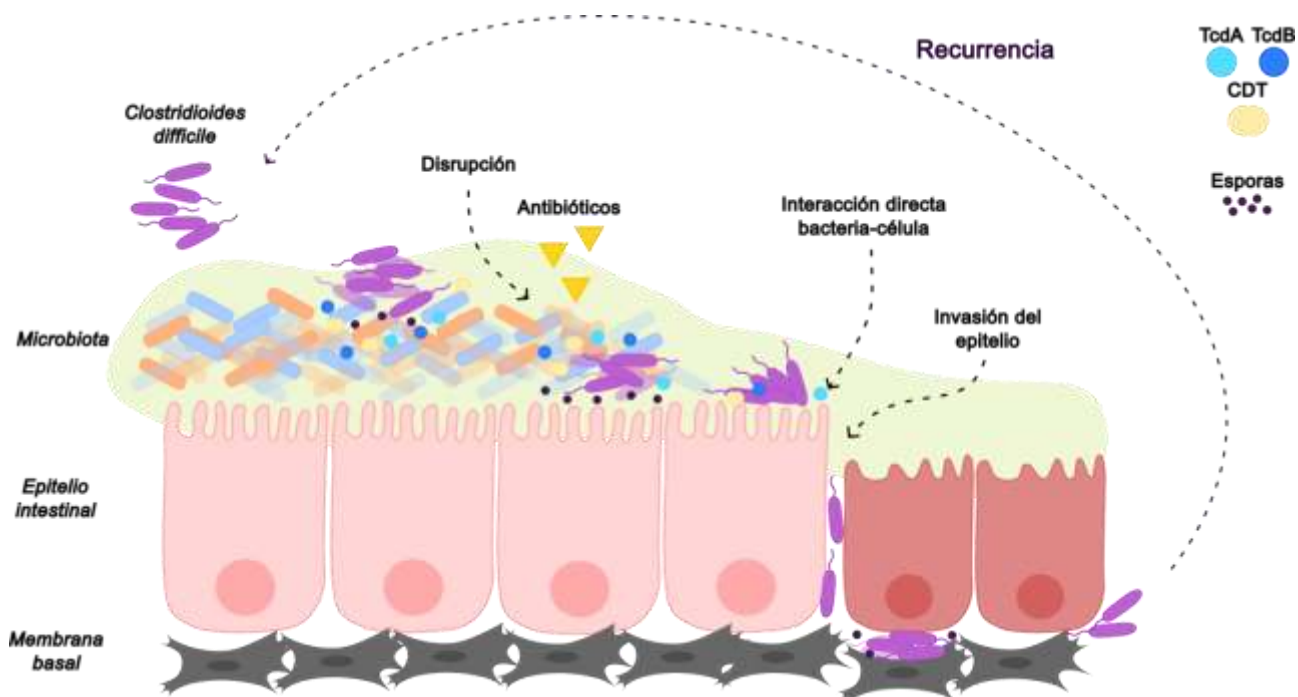


Figura 3. Modelo de biofilm de *C. difficile* durante la infección. *C. difficile* se adhiere inicialmente a las capas mucosas del intestino cuando los antibióticos de amplio espectro alteran la microbiota intestinal nativa. Se forman comunidades que podrían existir como especies individuales o en estrecha asociación con la microbiota intestinal, sirviendo de nicho para la producción de esporas y toxinas (TcdA, TcdB y CDT), y proporcionando protección frente a los antibióticos orales utilizados para el tratamiento (por ejemplo, Vancomicina, Metronidazol). Las interacciones bacterianas directas de *C. difficile* y la acción de las toxinas desencadenan la muerte celular y la alteración de la barrera epitelial, lo que permite a las bacterias penetrar hasta la membrana basal y formar comunidades en el tejido subyacente protegiéndose del oxígeno y de la respuesta inmunitaria. Las comunidades bacterianas en la mucosa intestinal pueden permitir la persistencia bacteriana y, en condiciones propicias, las bacterias pueden dispersarse, lo que conduce a la resiembra y la recurrencia de la infección. Figura tomada y modificada de Frostid et al., 2021.

En la actualidad, se cree que la persistencia y la recurrencia están mediadas por la esporulación, la formación de biofilm o una combinación de ambas. Por un lado, las esporas tienen la capacidad de entrar en las células epiteliales. Por otro lado, *C. difficile* se incorpora al biofilm de múltiples especies presentes en la microbiota intestinal y, se han detectado estructuras similares al biofilm en el epitelio o la capa mucosa de los animales infectados (Tremblay & Dupuy, 2022). Por su parte, las toxinas de *C. difficile*, poseen un potente efecto inflamatorio, activan el inflamasoma y la caspasa-1, e inducen la liberación de IL-1 β y de TNF- α (Kayagaki et al., 2011; Ng et al., 2010). La respuesta inflamatoria excesiva es el mecanismo principal por el cual, el cuadro clínico de la CDI puede evolucionar de leve/moderado a severo (Hernández Del Pino et al., 2021).

Tratamiento de la CDI

La CDI ha sido señalada como una amenaza urgente por su resistencia a los antimicrobianos (Furuya-Kanamori et al., 2015; Postma et al., 2015). La Vancomicina y el Metronidazol son los tratamientos de primera línea (Rubio-Mendoza et al., 2023). El Metronidazol se utiliza para la CDI leve a moderada en la primera instancia de infección, mientras que la Vancomicina se suministra para la enfermedad grave que puede desarrollar complicaciones. La creciente amenaza de la resistencia a los antimicrobianos, junto con la disminución del número de tratamientos disponibles, ha impulsado el interés tanto en los nuevos antimicrobianos como en las terapias alternativas para el tratamiento de la CDI (Buddle & Fagan, 2023; Di Bella et al., 2024).

El Metronidazol es un profármaco que afecta directamente al ADN de la bacteria anaerobia. En condiciones anaeróbicas, los radicales nitrosos que actúan sobre el ADN, se forman a partir de Metronidazol por la enzima bacteriana piruvato-ferridoxin-oxidoreductasa, y forman complejos con pares de bases del ADN, lo que conduce a su ruptura y consecutivamente, a la muerte celular (Tecsolpar S.A.). Por su parte, la Vancomicina es un antibiótico glucopéptido tricíclico que inhibe la síntesis de la pared celular en bacterias sensibles mediante una unión de gran afinidad con el extremo D-alanil-D-alanina de las unidades precursoras de la pared celular. Además, afecta la permeabilidad de la membrana celular bacteriana y la síntesis de ARN (Richet).

En lo que respecta a la resistencia a los antimicrobianos, una de las principales características de *C. difficile* es que la mayoría de los compuestos antimicrobianos tienen una actividad limitada o nula contra las células latentes, como las esporas. Esta resistencia intrínseca conferida por las esporas garantiza que *C. difficile* pueda persistir en presencia de antibióticos. Además, *C. difficile* presenta varios mecanismos de resistencia adquirida (Di Bella et al. 2024). La principal complicación de la CDI, la recurrencia, también se atribuye a la exacerbación de la disbiosis intestinal debido al tratamiento con

antibióticos. Por lo tanto, la resistencia a los antibióticos permite la colonización, la persistencia y la recurrencia, lo que afecta a todos los aspectos de la infección (Buddle & Fagan, 2023).

***C. difficile* y el epitelio intestinal**

La microbiota intestinal comienza a formarse desde el nacimiento y es fundamental para dar forma al sistema inmunológico y el mantenimiento de la salud. Las relaciones tridireccionales entre el microbioma intestinal, el epitelio intestinal y el sistema inmune de las mucosas, contribuyen a la patogénesis de los trastornos relacionados con el intestino. Una microbiota saludable generalmente proporciona resistencia a la patogenicidad de *C. difficile*. Sin embargo, una microbiota disbiótica desencadena la proliferación y la patología de la enfermedad posterior (Chandra et al., 2021).

Las bacterias comensales más abundantes se encuentran en el colon, representando aproximadamente el 70% de todas las bacterias en el cuerpo humano. La mayoría son *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* y *Verrucomicrobia*. Existen grandes diferencias en la flora individual, que están estrechamente relacionadas con los hábitos dietéticos y de vida (Chen et al., 2021).

La mucosa intestinal está compuesta por varios elementos que ayudan a su función como barrera de defensa física e inmunológica. Entre ellos se encuentran principalmente la capa externa de moco con la microbiota intestinal comensal, los péptidos antimicrobianos y la inmunoglobulina A secretoria (IgAs), la capa central de células individuales con células epiteliales especializadas y la lámina propia interna donde residen las células de la inmunidad innata y adaptativa como las células T, las células B, los macrófagos y las células dendríticas. La capa de moco es la primera línea de defensa física que encuentran las moléculas externas cuando llegan al lumen intestinal, y que evita que las bacterias entren en contacto directo con las células epiteliales (**Figura 4**)

(Vancamelbeke & Vermeire, 2017).

Las células caliciformes desempeñan un papel vital, ya que secretan moléculas que cumplen funciones protectoras en el intestino, como las mucinas que son los componentes básicos de la capa de moco (Van der Sluis et al., 2006).

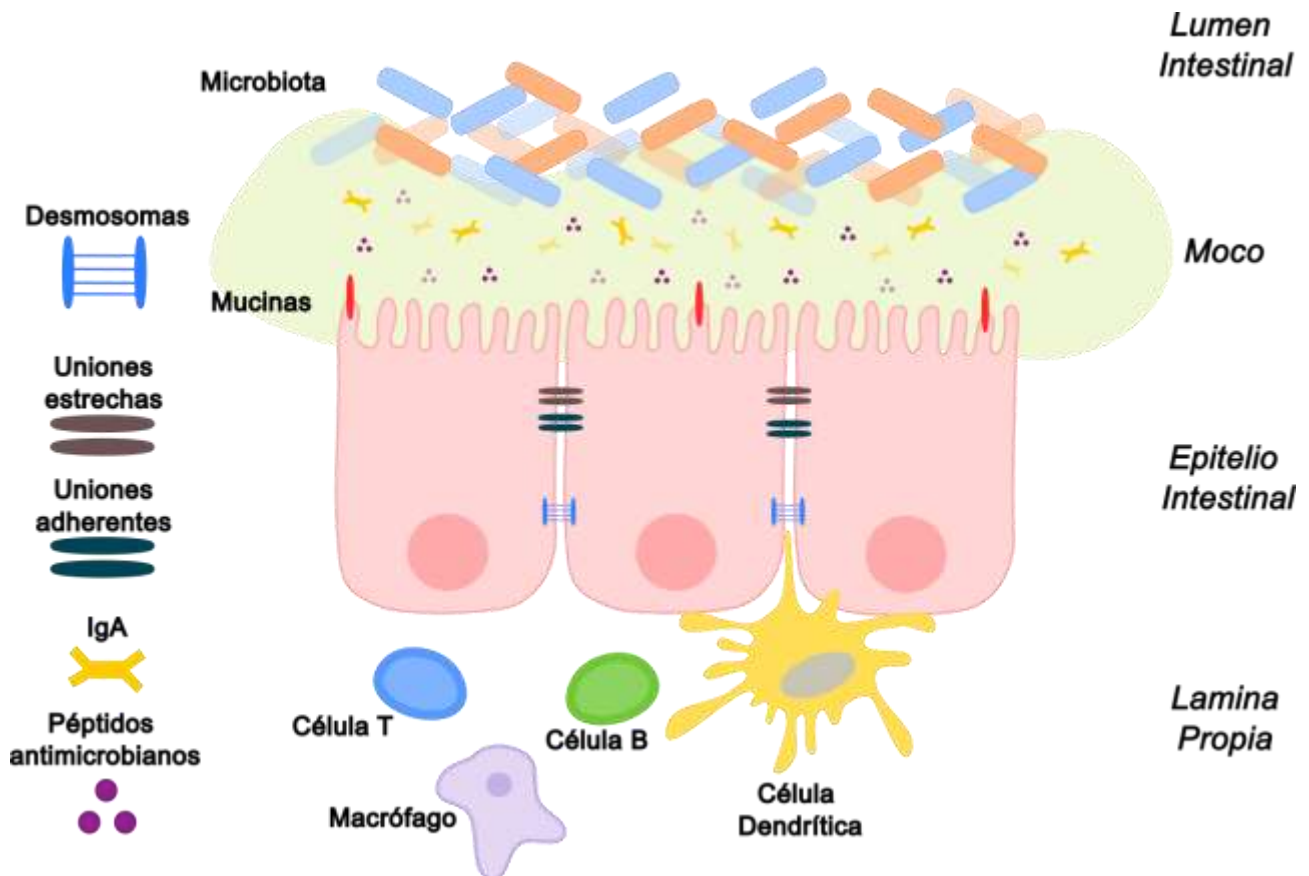


Figura 4. Esquemización de la mucosa intestinal. La barrera intestinal es una estructura semipermeable que permite la absorción de nutrientes esenciales y la detección inmunitaria, al tiempo que es restrictiva frente a moléculas y bacterias patógenas. La capa de moco recubre el epitelio intestinal. Los péptidos antimicrobianos y la IgAs se secretan en la capa mucosa como proteínas inmunodetectoras y reguladoras. Las células epiteliales intestinales forman una monocapa continua y están estrechamente unidas entre sí. Las uniones estrechas están situadas en el lado apical de las células y regulan el transporte de pequeñas moléculas e iones. Las uniones adherentes y los desmosomas proporcionan uniones celulares estrictas y contribuyen al mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal. La lámina propia contiene células de la respuesta inmune innata y adaptativa que participan en los mecanismos de defensa inmunológica de la barrera intestinal. Figura tomada y modificada de Vancamelbeke & Vermeire, 2017.

El sistema de barrera intestinal depende de las interacciones entre varios componentes, incluida la capa mucosa adhesiva, la IgAs, los péptidos antibacterianos y las uniones estrechas intercelulares. Dentro de estos componentes, las uniones

transmembrana constituyen el principal determinante de la barrera física intestinal y se forman mediante el ensamblaje de múltiples proteínas ubicadas cerca de la porción apical de la membrana lateral de las células epiteliales (Suzuki, 2020).

Como se mencionó con anterioridad, la patogenicidad de *C. difficile* depende del efecto sinérgico de múltiples factores de virulencia (Ouyang et al., 2024). Tanto las toxinas TcdA y TcdB, como la toxina CDT presente en algunas cepas hipervirulentas, dañan el epitelio intestinal, iniciando una cascada de eventos que conducen a inflamación, secreción de líquido y mayor daño tisular dentro del colon. A nivel molecular, las toxinas se unen a los receptores de la superficie celular, se internalizan y luego inactivan las proteínas GTPasa, alterando la organización del citoesqueleto y afectando varios procesos celulares dependientes de Rho. Además de actuar sobre el citoesqueleto de actina, la CDT también afecta al sistema de microtúbulos, lo que lleva a un aumento de la adhesión bacteriana, la colonización y la inflamación. En conjunto, las acciones de las toxinas sobre el epitelio, provocan la pérdida de la integridad de la barrera epitelial con inducción de muerte celular (Alam & Madan, 2024).

Aloe Vera

Aloe Vera (AV) es el nombre común para un conjunto de especies suculentas del género *Aloe* pertenecientes a la familia *Asphodelaceae* (*Liliaceae*), que tienen forma arbustiva y un color verde guisante. Los aloes son plantas perennes que, según la evidencia, se originaron en la mitad sur de la Península Arábiga y se extendieron por el norte de África, Sudán y países vecinos. Crecen de forma silvestre en regiones tropicales y subtropicales, prefiriendo suelos franco arenosos bien drenados con una cantidad adecuada de luz solar y materia orgánica. Desde hace mucho tiempo, se cultivan para usos agrícolas, cosméticos y medicinales (Kaur & Bains, 2024; Pressman et al., 2019).

La hoja de *Aloe* consta de tres capas: la capa interna, transparente y gelatinosa,

está compuesta principalmente de agua (99-99,5%) y, el material sólido restante (0,5-1,0%) contiene compuestos potencialmente activos como polisacáridos, vitaminas, aminoácidos, lípidos y esteroides. La capa intermedia, que tiene savia amarilla amarga o látex de aloe, contiene antraquinonas o antraceno (10% a 40%) y sus glucósidos. La capa gruesa externa, llamada cáscara, sintetiza carbohidratos (alrededor del 25%) y proteínas **(Figura 5)**. Sin embargo, la composición química del AV puede variar según la especie, el clima, las condiciones de crecimiento y los factores geográficos (Rahman et al., 2017).

El género *Aloe*, comprende más de 300 especies, entre ellas *Aloe barbadensis* Miller es la más caracterizada y a la cual se le han atribuido la mayoría de las propiedades medicinales (Ahluwalia et al., 2020; Fehrmann-Cartes et al., 2019; Haque et al., 2019; Jain et al., 2016; Langmead et al., 2004; Qiu et al., 2000). Dicha especie, presenta una inflorescencia de color amarillo, se cultiva preferentemente en tierra y genera ejemplares que pueden alcanzar hasta entre 1 y 1,5 metros de alto. En la Argentina, principalmente en la Provincia de Buenos Aires, la especie más distribuida es *Aloe saponaria*, que se diferencia por una inflorescencia de color rojo-anaranjado y crece preferentemente en maceta, aportando mayor facilidad para el cultivo doméstico. Esta, aunque menos caracterizada, también posee propiedades medicinales adjudicadas (Eun et al., 2008; Silva et al., 2014) y, por su disponibilidad y fácil acceso, es frecuentemente utilizada como terapia medicinal en la región. La mayoría de especies de AV como, *Aloe barbadensis* Miller o *Aloe vulgaris* Lam. no toleran temperaturas inferiores a 0 °C. Sin embargo, *Aloe saponaria* parece ser una excepción, ya que puede prosperar en atmósferas con una temperatura mínima de hasta -7 °C, lo que explica su amplia distribución en Argentina (Sampedro et al., 2004). Al igual que otras especies de *Aloe*, *Aloe saponaria* se utiliza para tratar quemaduras en el sur de Brasil, y se ha demostrado que exhibe efectos antinociceptivos y antiinflamatorios en un modelo de quemadura por escaldadura en ratas (Silva et al., 2014). Además, el análisis por HPLC de *Aloe saponaria* mostró varios picos

cromatográficos, lo que indica una amplia diversidad de compuestos químicos. Estos compuestos incluyen algunas sustancias fenólicas, que generalmente presentan efectos antioxidantes (Silva et al., 2013).

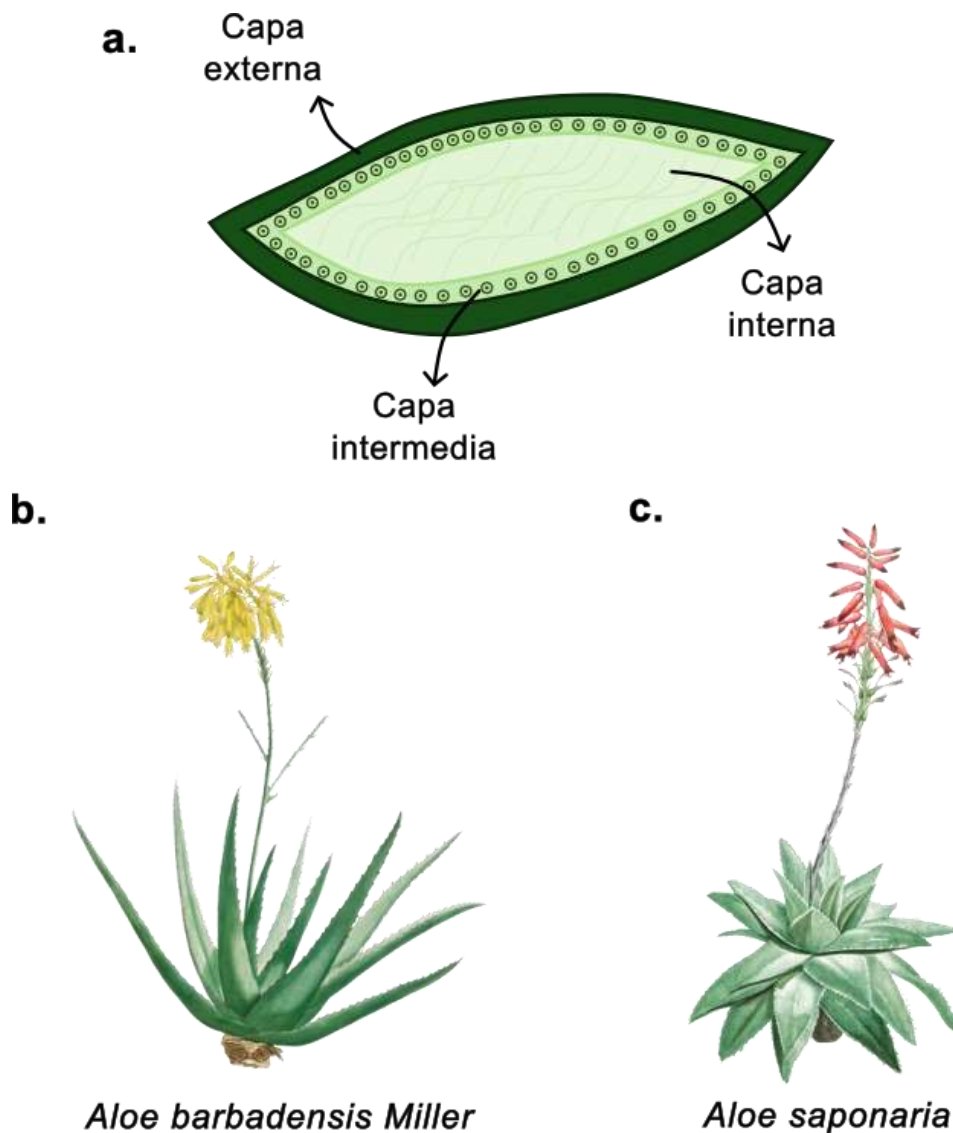


Figura 5. Representación de las plantas de AV. a. Esquematización de un corte transversal de una hoja de *Aloe*: la capa externa o cáscara, es donde se sintetizan los carbohidratos y proteínas; la capa intermedia contiene los haces vasculares por donde circula el xilema y floema y contiene la savia amarilla o látex del AV; en la capa interna, se encuentra el gel traslúcido que está compuesto principalmente por agua y material sólido que contiene los compuestos activos. Figura tomada y modificada de Rahman et al., 2017. b. *Aloe barbadensis* Miller presenta un tallo muy corto y hojas dispuestas en roseta con una ligera inclinación hacia arriba y con forma lanceolada que se afina hacia el extremo. Pueden medir entre 40 y 50 cm de largo y entre 6 y 8 cm de ancho en la base. Son de color verde y presentan márgenes con pequeños dientes de 2 a 3 mm de longitud. La inflorescencia es racimosa y es de color amarillo (Stella Maris Carpano et al., 2009). c. *Aloe saponaria* presenta un tallo muy corto y hojas dispuestas en roseta que pueden ser extendidas o algo curvadas, alcanzando hasta 35 cm de longitud y entre 8 y 12 cm de ancho en la base y con márgenes que presenten dientes de entre 3 y 5 mm de longitud. La parte superior de la hoja, varía de un verde pálido a un verde oscuro y tiene numerosas manchas oblongas claras organizadas en hileras transversales, que pueden ser onduladas o interrumpidas. La parte inferior, es generalmente más clara y no presenta manchas. Las inflorescencias son de un color anaranjado pálido (Stella Maris Carpano et al., 2009).

El *Aloe* ha sido considerado un sanador natural desde que fue descubierto hace miles de años. Ha sido reportado que los componentes bioactivos de *Aloe barbadensis* Miller tienen propiedades antifúngicas (Jasso De Rodríguez et al., 2005; Saniasiaya et al., 2017), antivirales (Athiban et al., 2012), antibacterianas (Banu et al., 2012; Ferro et al., 2003), antiinflamatorias (Langmead et al., 2004), antioxidantes (Boudreau & Beland, 2006; Hu et al., 2003; Ray et al., 2013), cicatrizantes (Davis et al., 1994), anticancerígenas (El-Shemy et al., 2010), inmunomoduladoras (Pugh et al., 2001) y antidiabéticas (Arora et al., 2019).

Aloe barbadensis Miller contiene más de 75 compuestos diferentes, incluidas vitaminas (vitamina A, C, E y B12), enzimas (amilasa, catalasa y peroxidasa), minerales (zinc, cobre, selenio y calcio), azúcares (monosacáridos como manosa-6-fosfato y polisacáridos como glucomananos), antraquinonas (aloína y emodina), ácidos grasos (lupeol y campesterol), hormonas (auxinas y giberelinas) y otros (ácido salicílico, lignina y saponinas) (**Figura 6**) (Sánchez et al., 2020). Si bien varios de los efectos beneficiosos se han atribuido a las acciones de los polisacáridos que se encuentran en la hoja de AV, se considera que las actividades biológicas se deben a la acción combinada de varios compuestos presentes en la planta en lugar de a los efectos individuales (Baruah et al., 2016).

Actividad antimicrobiana

En cuanto a la actividad antimicrobiana, se ha observado que el extracto acuoso de *Aloe barbadensis* Miller reduce el crecimiento y la formación de biofilm de *Enterococcus faecalis* (Ghasemi et al., 2020). Además, en ensayos de microdilución esta bacteria también ha sido inhibida por el gel de *Aloe barbadensis* Miller en concentraciones del 50% y 100%, junto con otros patógenos orales, incluidos *Actinobacillus*

actinomycescomitans, *Clostridium bacilli* y *Streptococcus mutans* (Jain et al., 2016). Por otra parte, concentraciones de hasta 1 mg/ml de extractos acuosos de *Aloe barbadensis* Miller podrían inhibir el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*, agente causal de una de las enfermedades infecciosas más letales en todo el mundo (Arjomandzadegan et al., 2016).

En tanto a los extractos etanólicos del gel de *Aloe barbadensis* Miller, se demostró efecto antibacteriano contra cepas estándar de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* (Haque et al., 2019). También se ha demostrado el efecto de *Aloe arborescens* Miller sobre *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Staphylococcus epidermidis* y *Saccharomices boulardii* concluyendo que tanto el extracto acuoso del gel como los extractos alcohólicos poseían los mayores efectos antimicrobianos, y que los microorganismos gram-positivos eran más susceptibles que los gram-negativos (Singab et al., 2015). Estos antecedentes demuestran el efecto antibacteriano del extracto del AV sobre un amplio conjunto de patógenos, sin embargo, su capacidad antimicrobiana sobre *C. difficile* aún no ha sido determinada.

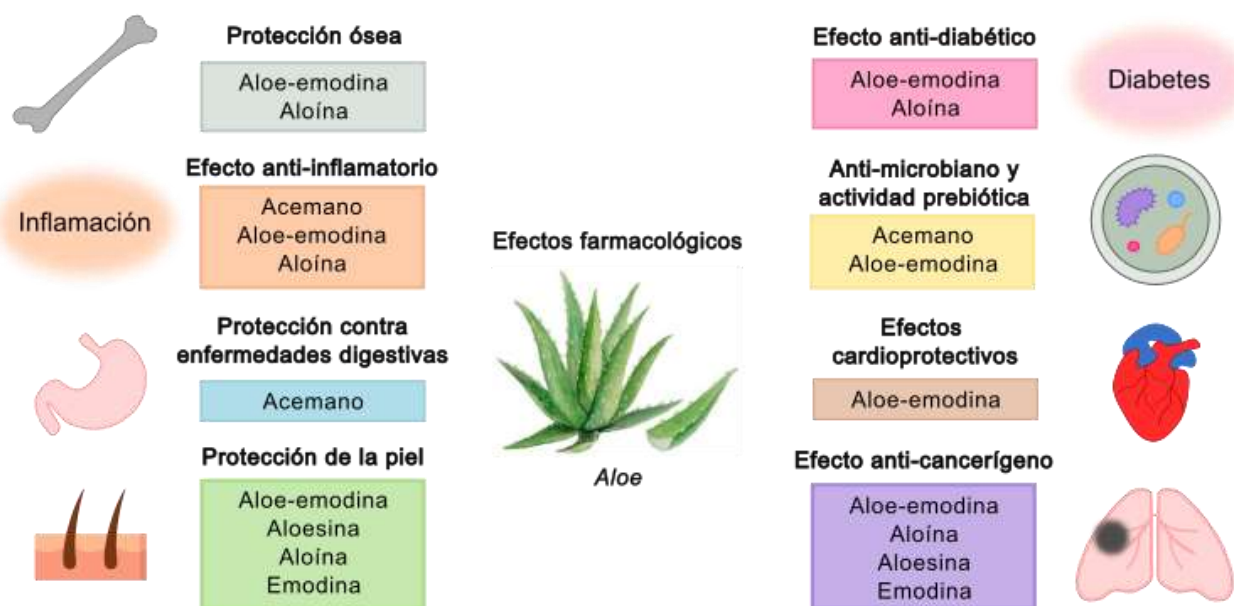


Figura 6. Efectos farmacológicos de los principales componentes de *Aloe barbadensis* Miller. Entre los principales compuestos activos, en los últimos años se ha centrado la investigación en la aloe-emodina, la aloína, la aloesina, la emodina y el acemanano. La aloe-emodina ha resultado ser un agente prometedor

como compuesto antimicrobiano, antidiabético, citotóxico, cardioprotector y protector óseo (en estudios *in vitro*), así como antiinflamatorio y protector de la piel (en estudios *in vivo*). La aloína ha demostrado ser eficaz en procesos inflamatorios y enfermedades óseas (estudios *in vitro*) y en cáncer y enfermedades cardiovasculares (estudios *in vivo*). Figura tomada y modificada de Sánchez et al., 2020.

Actividad protectora intestinal

La integridad de la barrera intestinal se mantiene gracias a las proteínas de unión estrecha, como la ZO-1 y las Claudinas y Ocludinas, que desempeñan un papel importante en la función de barrera de las células epiteliales debido a que sellan el espacio entre las células epiteliales, impidiendo así la difusión paracelular de microorganismos y otros antígenos a través del epitelio. En consecuencia, la disminución de la expresión de las proteínas de unión estrecha puede conducir a un aumento de la permeabilidad intestinal a los ligandos microbianos y metabolitos nocivos, lo que resulta en reacciones inflamatorias sistémicas y la alteración de las barreras intestinales que causan infección, diarrea, fiebre y sepsis. Se ha demostrado que, nanovesículas derivadas de *Aloe barbadensis* Miller, *Aloe arborescens* Miller y *Aloe saponaria*, son capaces de aliviar los síntomas en un modelo de colitis inducida por DSS al 5%. Este efecto, se atribuyó a la supresión de TNF- α , y al aumento de la expresión de proteínas de unión estrecha y de unión adherente para disminuir la permeabilidad epitelial intestinal (Choi et al., 2023). Por otra parte, se observó que el gel de *Aloe barbadensis* Miller podría atenuar la lesión del intestino delgado inducida por indometacina al mejorar la expresión de mucina y el grosor de la capa de moco del intestino y, en última instancia, reducir la exposición de la pared del colon a bacterias y otras sustancias peligrosas (Shi et al., 2021).

Administración como tratamiento en patologías intestinales

Actualmente, *Aloe barbadensis* Miller se administra como un tratamiento alternativo ante la disbiosis intestinal, la inflamación y en la enfermedad inflamatoria intestinal,

pudiendo adquirirse como un producto de venta libre. Su utilización se basa en sus efectos inmuno-moduladores y su actividad prebiótica sobre la microbiota intestinal benéfica (Ahluwalia et al., 2020; Ried et al., 2020). Recientemente se ha demostrado que, luego de la administración de *Aloe barbadensis* Miller, el contenido de ácidos grasos de cadena corta, derivados de la fermentación fecal de polisacáridos vegetales, aumenta significativamente. Además, la abundancia de microbiota benéfica también se vio incrementada, como lo demostró la presencia de *Prevotella*, *Catenibacterium*, *Lachnospiraceae* y *Coprococcus* y la reducción simultánea de microbiota dañina, incluyendo *Escherichia*, *Shigella* y *Veillonella* (Maiuolo et al., 2022).

En el contexto de búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas para la CDI, planteamos que, por sus efectos activos, el AV podría ser un excelente candidato para mejorar el control de la infección, promover el balance de la microbiota y reducir la inflamación aguda sobre el epitelio intestinal.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

El extracto acuoso de *Aloe saponaria*, afecta el crecimiento y la virulencia de *C. difficile*, y podría ser utilizado como una terapia adyuvante de manera combinada con los antibióticos actualmente empleados para el tratamiento de la infección.

Objetivo General

Evaluar el efecto del AV sobre el crecimiento de *C. difficile*, su potencial como terapia combinada con los antibióticos actualmente utilizados (Vancomicina y Metronidazol) y su capacidad como protector del epitelio intestinal.

Objetivos Específicos

- Determinar la capacidad inhibitoria del extracto de AV sobre el crecimiento de *C. difficile*.
- Evaluar el efecto del extracto de AV en combinación con Vancomicina o Metronidazol sobre el crecimiento de *C. difficile*.
- Establecer si el extracto de AV afecta la formación de biofilm por *C. difficile*.
- Evaluar *in vitro* el efecto del AV sobre la integridad del epitelio intestinal en presencia de *C. difficile*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extractos de AV

En el presente trabajo final de grado, se utilizó principalmente la especie de AV, *Aloe saponaria*. Sin embargo, también se realizó un experimento con *Aloe barbadensis* Miller con la finalidad de comparar los resultados con esta especie, que es la más caracterizada y a la que se adjudican la mayoría de las propiedades medicinales.

Las plantas fueron cultivadas en invernadero, y mantenidas con riego por goteo en el campo experimental “Las Magnolias” de la UNNOBA. Cabe destacar que las hojas frescas de AV utilizadas para realizar los extractos, provenían de plantas que poseen un tiempo de cultivo no menor a dos años.

Una vez en el laboratorio, las hojas del AV fueron lavadas primeramente con abundante agua, y luego rociadas con alcohol 70%. Luego de cortada la base y la punta de la hoja, la misma es dejada en reposo por 40 minutos en posición vertical en un vaso de precipitado, con la finalidad de escurrir la aloína presente en la hoja. La aloína no puede ser metabolizada por las plantas y algunas bacterias pero, las bacterias en el tracto gastrointestinal humano, metabolizan la aloína en aloe-emodina, lo que resulta en la pérdida del equilibrio normal en las poblaciones de la microflora colonial y en un estado proinflamatorio subclínico (Jangra et al., 2022).

El gel traslúcido del interior de la hoja, es tomado raspando con un bisturí y se coloca en un recipiente limpio y seco. Dependiendo del volumen obtenido de gel, se adiciona el mismo volumen de agua destilada con el objetivo de llegar a una proporción 1:1 (Farahnejad et al., 2011). La solución se agita suavemente con la finalidad de homogeneizar la misma. Luego se centrifuga a 14000g durante 15 minutos, y el pellet

obtenido que contiene el material que no se solubilizó, se descarta. Los sobrenadantes se esterilizan utilizando un filtro de 0.7µm y luego, un segundo filtro de 0.45µm. Posteriormente, los extractos obtenidos se almacenan a -20°C.

Cultivo de *C. difficile*

Para todos los experimentos, se utilizó la cepa NAP1/BI/027 de *C. difficile*, provista por el Servicio de Bacteriología Sanitaria del Instituto Carlos Malbrán-ANLIS. La cepa NAP1/BI/027 de *C. difficile* es la más prevalente, caracterizada por su hipervirulencia, su resistencia a múltiples antibióticos y su asociación al desarrollo de enfermedad severa; provoca brotes a escala mundial, y es responsable de la mayor morbilidad y mortalidad asociada a la infección (Elliott et al., 2017). También se caracteriza por una mayor producción de TcdA y TcdB, así como de la toxina binaria CDT (Kelesidis & Pothoulakis, 2024).

Las esporas de *C. difficile*, se sembraron en placas de CHROMagar™ *C. difficile* y se dejaron crecer durante 48 horas a 37°C, en oscuridad y anaerobiosis. La atmósfera anaeróbica se consiguió mediante la utilización de bolsas de anaerobiosis (Mitsubishi), donde se colocaron las placas junto con un parche generador de atmósfera anaeróbica (AnaeroPouch, Mitsubishi). Luego de 48 horas, se sembraron las bacterias en caldos de cultivo de BHI líquido a 37°C durante 48 horas y en agitación. Para generar la atmósfera anaeróbica, los tubos se colocaron en jarras con cierre hermético, en las cuales se introdujo un parche generador de anaerobiosis (AnaeroPack, Mitsubishi). Luego, se realizó un repique que se dejó crecer durante 24 horas para obtener un cultivo en fase de crecimiento exponencial. Este flujo de trabajo, fue el que se utilizó para realizar todos los experimentos y, a partir de aquí, tomar bacterias en crecimiento exponencial para sembrar los ensayos.

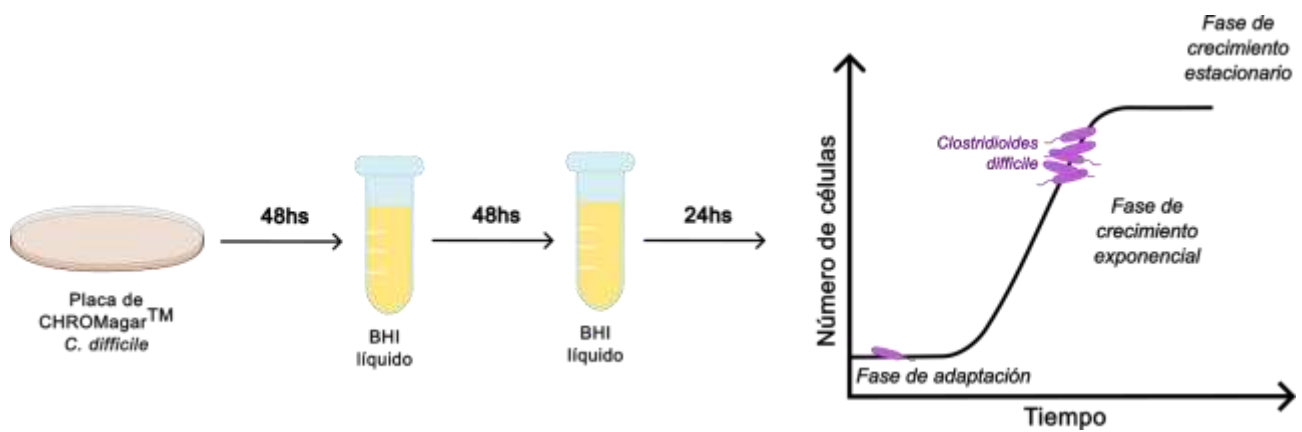


Figura 7. Flujo de trabajo para el cultivo de *C. difficile*. Se sembraron las esporas en placa de CHROMagar™ *C. difficile* y se incubaron por 48 horas a 37°C en anaerobiosis. Luego, se picó una colonia y se pasó a BHI líquido, y se cultivó en agitación durante 48 horas. Se realizó un repique que se dejó crecer durante 24 horas para obtener a las bacterias en fase de crecimiento exponencial.

Efecto anti-bacteriano del AV sobre *C. difficile*

El efecto anti-bacteriano del AV sobre la cepa NAP1/BI/027 de *C. difficile* se evaluó mediante ensayos de microdilución en medio líquido. La bacteria fue cultivada como se mencionó previamente y luego, sembrada en placa de 96 wells fondo redondo (Tissue-culture) con medio BHI, en ausencia o presencia del extracto de AV en concentraciones finales del 1%, 5%, 10% y 20%. El inóculo utilizado de la bacteria fue de 5µl por well proveniente del cultivo en fase exponencial con Densidad Óptica (DO) igual a 1, lo que corresponde a 100.000.000 bacterias por mililitro y resulta en el sembrado final de 500.000 bacterias por well, aproximadamente. Las distintas concentraciones de AV ensayadas, se lograron calculando el volumen necesario de la solución madre de AV al 50% para obtener el porcentaje requerido en el well, teniendo en cuenta un volumen final de 200µl y los 5µl del inóculo de la bacteria. Estas concentraciones de bacteria y AV fueron utilizadas en todos los ensayos de microdilución en placa de 96 wells.

La placa fue incubada durante 48 horas a 37°C en anaerobiosis con agitación. Transcurrido ese tiempo, se evaluó la carga bacteriana por medio de la observación de la turbidez del medio y medición de densidad óptica (DO) a 595nm. Se llevaron adelante

cinco experimentos independientes por triplicado.

Viabilidad bacteriana por citometría de flujo

La citometría de flujo con tubos Trucount (BD Trucount™ Tubes) es una técnica ampliamente utilizada para evaluar la viabilidad de una muestra bacteriana. Los tubos de Trucount contienen un número conocido de microesferas fluorescentes por lote (BD Biosciences). El número total de bacterias por microlitro se calcula con la siguiente fórmula: $(\text{Número de bacterias vivas} / \text{Número de microesferas adquiridas}) \times (\text{Número de microesferas por lote} / \text{Volumen evaluado}) \times \text{Factor de dilución} = \text{Bacterias/microlitro}$. El número de bacterias vivas se determina como se describe a continuación.

Se llevó a cabo el crecimiento bacteriano hasta obtener el cultivo líquido en crecimiento exponencial. A continuación, se sembró en placas de 96 wells fondo redondo (Tissue-culture) con medio BHI y en presencia o ausencia del extracto de AV. Las concentraciones finales de AV utilizadas fueron del 1%, 5%, 10% y 20%. La placa fue incubada durante 48 horas a 37°C en anaerobiosis con agitación. Se tomó 150µl de cada well en tubos eppendorf y se añadió 850µl de solución fisiológica estéril. Se centrifugó y se descartó el sobrenadante. El pellet fue resuspendido en 100µl de solución fisiológica estéril, se agregaron 900µl de buffer de tinción (PBS, Pluronic™ F-68, EDTA, Azida sódica) y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se tomaron 500µl y se pasaron a un tubo Trucount. Se añadió 5µl de yoduro de propidio (IP) y 5µl de naranja de tiazol (TO) (BD™ Cell Viability Kit) durante 5 minutos, para evaluar la viabilidad. Las muestras fueron adquiridas en un citómetro de flujo FACSCanto II (BD).

El TO es un colorante permeable a las células que tiñe tanto las células vivas como las muertas. Por su parte, el IP es impermeable a las células sanas con membranas intactas, pero ingresa a las células con membranas comprometidas como las células muertas (BD Biosciences). En combinación, estos colorantes permiten la detección rápida

de bacterias vivas y muertas. El número de bacterias vivas corresponde a la cantidad de eventos TO positivos/IP negativos.

Ensayo de XTT

La detección de células metabólicamente activas se puede realizar mediante métodos colorimétricos simples, como el ensayo de sal de tetrazolio donde se utiliza XTT (2,3-bis [2-metiloxi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolio-5-carboxanilida). El fundamento del ensayo es que solo las células activas reducirán el XTT a compuestos de formazán. La cantidad de productos de formazán es directamente proporcional al número de células activas y se puede cuantificar espectrofotométricamente. La sal de tetrazolio se reduce a un tinte naranja soluble. Este método es utilizado para evaluar la viabilidad bacteriana en diferentes condiciones, como probar agentes antimicobacterianos, efectos citotóxicos y crecimiento microbiano (Magaña-Montiel et al., 2024).

Se llevó a cabo el crecimiento de *C. difficile* como se describió con anterioridad y, una vez conseguido el crecimiento en fase exponencial, se sembraron las bacterias en placas de 96 wells fondo redondo (Tissue-culture) en BHI líquido y en ausencia o presencia de AV. Las concentraciones de AV utilizadas para el tratamiento fueron 1%, 5%, 10% y 20%. Se descongeló el reactivo XTT y la solución de activación, se llevó a 37°C y se agitaron hasta obtener una solución clara. Se preparó una mezcla XTT en una proporción 1:50 (reactivo XTT: solución de activación). Se añadió 50µl de la mezcla de XTT a cada well y se incubó durante 3 horas. La absorbancia se midió a 590 nm. Se realizaron tres ensayos independientes por triplicado.

Concentración Bactericida Mínima

Para realizar este ensayo, la bacteria se creció como se describió con anterioridad

hasta obtener un cultivo líquido en fase exponencial de crecimiento. Luego, se sembró por triplicado en placas de 96 wells fondo redondo (Tissue-culture) en medio BHI y en presencia o ausencia del extracto de AV. Las concentraciones finales de AV utilizadas fueron del 1%, 5%, 10% y 20%. Las placas fueron incubadas durante 48 horas a 37°C en anaerobiosis con agitación. Una vez cumplido el tiempo de inoculación, se utilizaron placas de BHI agar sin taurocolato, en las que se sembraron diluciones seriadas (de 0 a - 5) del cultivo líquido de la bacteria frente al tratamiento con AV. Se dejó crecer durante 24 horas a 37°C y en anaerobiosis. Luego, se realizó el recuento de colonias crecidas en cada placa, y se calculó la cantidad de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/ml). El punto final de Concentración Bactericida Mínima (CBM) del AV, se estableció cuando se erradicó el 99,9% del inóculo inicial de la población bacteriana con la concentración más baja del agente antimicrobiano (Mahale & Sharma, 2024). Se realizaron tres experimentos independientes.

Efecto combinado del AV y de Vancomicina/Metronidazol sobre *C. difficile*

Se utilizaron las drogas Vancomicina y Metronidazol por ser los antibióticos actualmente disponibles y administrados para el tratamiento de la infección por *C. difficile* en la Argentina. Primeramente, se estableció la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de cada antibiótico frente a *C. difficile*. Para ello, se creció la bacteria como se describió con anterioridad y, una vez conseguido el cultivo en fase exponencial, se sembró en placas de 96 wells fondo redondo (Tissue-culture) enfrentándola a diferentes concentraciones de los antibióticos durante 48 horas, en anaerobiosis y agitación. La CIM del Metronidazol se estableció en 2µg/ml y la de la Vancomicina en 4µg/ml.

Se realizaron ensayos de microdilución en medio líquido para evaluar el efecto del extracto acuoso de *Aloe saponaria* en combinación con concentraciones menores a la

CIM establecida para cada antibiótico. Las concentraciones que se utilizaron de Metronidazol fueron desde 0,125 a 1µg/ml y para Vancomicina, las concentraciones fueron de 0,25 a 2µg/ml, mientras que las concentraciones utilizadas de AV fueron del 1%, 5%, 10% y 20%. Los ensayos se realizaron nuevamente por triplicado en placas de 96 wells fondo redondo (Tissue-culture), y se incubaron durante 48 horas, en anaerobiosis y con agitación. Luego, se midió la DO a 595nm y se graficaron los valores obtenidos.

Efecto del AV sobre la formación de biofilm de *C. difficile*

Se cultivó la bacteria como se mencionó con anterioridad hasta obtener el cultivo líquido en fase de crecimiento exponencial. Se sembró la bacteria en placas de 24 y/o 96 wells fondo plano (Tissue-culture) en medio BHI suplementado con D-Dextrosa y en presencia/ausencia de concentraciones crecientes de AV (1%, 5%, 10%, 20%) a 37°C en anaerobiosis, durante seis días de cultivo estático. Luego, se descartó cuidadosamente el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con PBS 1X. Se realizó la tinción con Cristal Violeta al 0,2% para la observación del biofilm formado. Luego, se disolvió el colorante con etanol y acetona en una proporción 1:1 y se midió la DO a 595nm. Se llevaron adelante tres experimentos independientes por triplicado.

Obtención del secretoma de *C. difficile*

Se sembraron las esporas en CHROMagar™ *C. difficile* y se cultivaron durante 48 horas. Se tomaron colonias aisladas y se inocularon en 10ml de BHI líquido durante 5 días, a 37°C, en anaerobiosis y agitación. Luego, se centrifugó a 6000rpm por 5 minutos a 4°C. Se tomó el sobrenadante que contiene el secretoma de *C. difficile* y se descartó el pellet. El sobrenadante se filtró con filtro de jeringa de 0.22µm, manteniendo el mismo en hielo. Las alícuotas estériles fueron almacenadas a -80°C.

Crecimiento de la línea celular Caco-2

La línea celular epitelial humana Caco-2 se ha utilizado ampliamente como modelo de la barrera epitelial intestinal, derivada originalmente de un carcinoma de colon. Los primeros estudios revelaron que las células Caco-2 diferenciadas expresaban varias propiedades morfológicas y funcionales características de los enterocitos del intestino delgado. Hacia la confluencia comienzan a polarizarse adquiriendo un borde en cepillo apical característico con microvellosidades. Se forman uniones estrechas entre células adyacentes y expresan actividades enzimáticas típicas de los enterocitos, es decir, lactasa, aminopeptidasa N, sacarasa-isomaltasa y dipeptidilpeptidasa IV (Lea, 2015).

Con la finalidad de evaluar *in vitro* el efecto del AV sobre la integridad del epitelio intestinal, se cultivó la línea celular Caco-2 en DMEM suplementado con 15% de Suero Fetal Bobino (SFB) y 1% de Penicilina-Estreptomicina a 37°C con 5% de CO₂. Luego de 15 días, se diferenciaron formando una monocapa estable con enterocitos con microvellosidades (Panse & Gerk, 2022). Dicha monocapa fue tratada con *C. difficile*, el secretoma de *C. difficile* o ambos en presencia o ausencia de AV al 5% o 10% por 24 horas. El tratamiento se realizó a razón de 1 bacteria : 1 célula y el secretoma se utilizó en una concentración final de 450ng/μl.

Tinción con Hematoxilina y Eosina de las Caco-2

En placas de 24 wells se colocaron vidrios para microscopía de 12mm (Cover Glass), sobre ellos se llevó a cabo el crecimiento y el tratamiento de la línea celular Caco-2 como se describió previamente. Luego, se fijaron las células con PBS-Formol 4% a 4°C durante 24 horas. Se lavó con PBS 1X por 5 minutos y se incubó con Hematoxilina por el mismo tiempo. A continuación, se lavó con agua de canilla y luego con agua destilada durante 5 minutos. Se repitió el lavado y luego se añadió Eosina durante 2 minutos. Se

procedió a incubar con Etanol 96% por 5 minutos y luego con Xileno durante 10 minutos. Luego de una segunda incubación en Xileno, se realizó el montaje utilizando DPX (DPX Mountant for histology, Sigma-Aldrich) para la posterior observación con el microscopio de campo claro Leica DM750. Las imágenes obtenidas, fueron analizadas con el programa QuPath versión 0.4.4.

Viabilidad de la línea celular Caco-2 por citometría de flujo

Se cultivó la línea celular en las condiciones mencionadas previamente y luego, se realizaron los distintos tratamientos con *C. difficile*, el secretoma de *C. difficile* o ambos, en ausencia o presencia de AV. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se tomaron los sobrenadantes y las células por digestión con tripsina a 37°C. Luego, se levantaron las células con PBS 1X y se pasaron a tubos de citometría. Se centrifugó y se descartó el sobrenadante, para resuspender el pellet en la solución de tinción con Fixable Viability Dye eFluor™ 780 (eBioscience™). Se incubó durante 20 minutos en oscuridad y en la heladera y se centrifugó nuevamente. Se realizó un lavado con 1ml de FACS (PBS, SBF 2%) y se centrifugó nuevamente. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en PFA al 1%. Los tubos fueron adquiridos en un citómetro de flujo FACSCanto II (BD). Los resultados obtenidos por triplicado, fueron analizados utilizando el programa FlowJo 10v.

Expresión de Claudina-1 evaluada por microscopía de fluorescencia

La expresión de Claudina-1 se determinó por microscopía de fluorescencia (anti-Claudin 1 Monoclonal Antibody, 2H10D10, Invitrogen) en la monocapa diferenciada y confluyente de la línea celular Caco-2.

Las células se fijaron en PFA 4% durante 20 minutos y luego se lavó con solución

fisiológica. Se añadió buffer de permeabilización (PBS, SBF 10% y Saponina 10%) y se incubó en oscuridad durante 30 minutos. Luego se lavó con buffer de permeabilización frío y se incubó en presencia del anticuerpo anti-Claudina-1 por 24 horas a 4°C. Se lavó nuevamente con buffer de permeabilización frío y se añadió el anticuerpo secundario conjugado a Alexa Fluor 647 (Alexa Fluor® 647 anti-mouse IgG1 Antibody, Biologend). Se realizaron dos lavados adicionales con buffer de permeabilización y se agregó DAPI como contra-tinción durante 5 minutos. Se realizaron tres lavados con PBS y se dejó secar para realizar el montaje utilizando Aqua-Poly/Mount (Polysciences).

Los vidrios se visualizaron en microscopio de fluorescencia trinocular Axio Imager.A2 (Carl Zeiss, Alemania). Luego, las imágenes fueron analizadas con el software ImageJ.

Análisis estadísticos

La significancia de los ensayos se determinó mediante la prueba t de Student y ANOVA utilizando el software GraphPad Prism. Para comparar los datos entre tres o más grupos se utilizó el post test de Dunnett's. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos.

RESULTADOS

El AV inhibe el crecimiento de *C. difficile*

En primer lugar, para evaluar el efecto anti-microbiano de AV, la cepa NAP1/BI/027 de *C. difficile* fue tratada con el extracto acuoso de *Aloe saponaria* por 48 horas. Los resultados demostraron una disminución significativa del crecimiento de la bacteria en todas las concentraciones evaluadas (1%, 5%, 10% y 20%) (**Figura 8a**). Al llevar a cabo la misma metodología experimental pero utilizando el extracto acuoso de *Aloe barbadensis* Miller, se observó una disminución significativa del crecimiento cuando se trató con 5%, 10% y 20% del extracto (**Figura 8b**).

Para confirmar estos resultados, se evaluó además la viabilidad de *C. difficile* por citometría de flujo. Esta técnica permite no sólo evaluar el porcentaje de células viables, sino también realizar un recuento de las mismas, al utilizar en el mismo tubo de la marcación un estándar de microesferas. En concordancia con los resultados obtenidos por espectrofotometría, observamos una disminución en el número de bacterias vivas frente al tratamiento con 10% y 20% del extracto de *Aloe saponaria* (**Figura 8c**). Asimismo, se observó una disminución significativa de bacterias metabólicamente activas frente al 10% y 20% de *Aloe saponaria* en comparación con el control, determinado por el ensayo de sal de tetrazolio utilizando el reactivo XTT (**Figura 8d**).

Finalmente se evaluó el impacto de AV como agente bacteriostático o bactericida. Convencionalmente, se considera que la CBM es la menor concentración que permite una reducción del microorganismo de al menos un 99,9 % respecto a la población inicial. Para esto, luego de enfrentar las bacterias a *Aloe saponaria* por 48 horas se evaluó el crecimiento en placa en ausencia de AV. Si bien se observó una disminución del

crecimiento de la bacteria a medida que se aumentaba el porcentaje de AV suministrado en las 48 horas previas al cultivo (**Figura 8e**), no se observa un efecto biocida de AV a las concentraciones utilizadas.

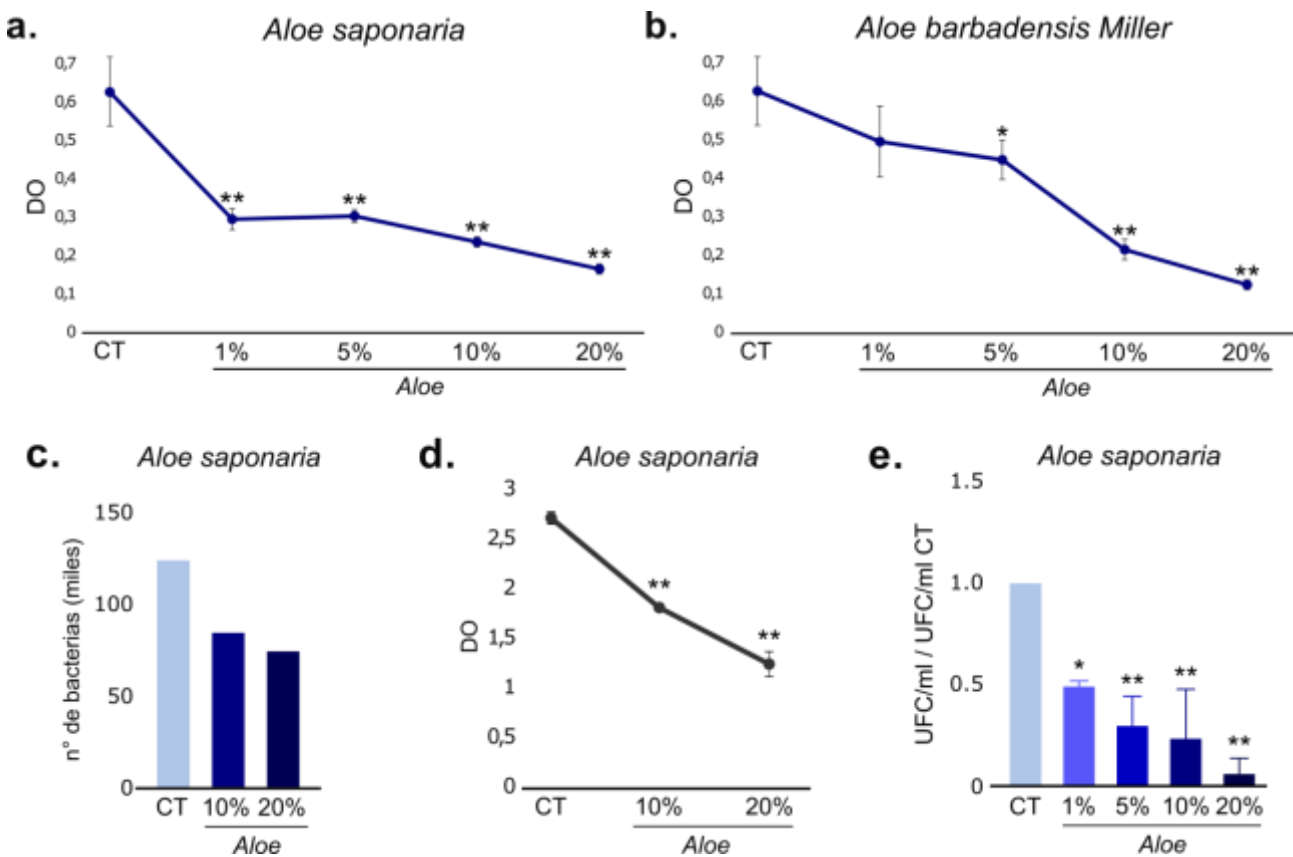


Figura 8. El extracto de AV afecta el crecimiento de *C. difficile*. La cepa NAP1/BI/027 de *C. difficile* fue cultivada en medio BHI en placas de 96 wells en ausencia o presencia del extracto de AV en concentraciones finales de 1%, 5%, 10% y 20%. Luego de 48 horas de cultivo en anaerobiosis se determinó el crecimiento utilizando diferentes metodologías. **a-b.** Ensayos de microdilución en placa. **a.** Extracto de *Aloe saponaria*. **b.** *Aloe barbadensis Miller*. Luego de 48 horas de cultivo en anaerobiosis se determinó la DO a 595nm. Cada punto representa la Media \pm SEM de un experimento independiente realizado por triplicado. **c.** Recuento por citometría de flujo. El número de bacterias viables por mililitro fue determinada utilizando tubos Trucount y un Kit de Viabilidad. Las células TO positivas/IP negativas fueron seleccionadas y relativizadas al número de microsferas. Las barras representan el recuento de un experimento representativo. **d.** Viabilidad y metabolismo celular evaluados mediante ensayo de XTT. Los puntos representan la Media \pm SEM de la absorbancia a 590nm de triplicados de un experimento representativo de los tres realizados. **e.** Recuento de UFC relativas al control de *C. difficile* en medio sólido luego del cultivo en presencia/ausencia de AV. Los datos se analizaron estadísticamente realizando ANNOVA y test de Dunnett's $<^*(p<0.05)$ $<^{**}(p<0.01)$. CT: Control

Aloe saponaria* potencia el efecto de la Vancomicina y del Metronidazol frente a *C. difficile

En Argentina, la Vancomicina y el Metronidazol son los antibióticos utilizados como primera línea frente a la CDI. Para determinar el efecto de *Aloe saponaria* en combinación con los antibióticos, primeramente se estableció la CIM de cada uno de ellos frente a la cepa NAP1/BI/027 de *C. difficile*. Por ensayos de microdilución en placa se obtuvieron valores de CIM de 4µg/ml para Vancomicina y de 2µg/ml para el Metronidazol. Por un lado, cuando combinamos 0,5µg/ml y 1µg/ml de Vancomicina con el extracto de AV, se observó una disminución significativa del crecimiento de *C. difficile* en los porcentajes del 5%, 10% y 20% de AV, e incluso el 1% fue significativo cuando se combinó con el 0,5µg/ml de Vancomicina (**Figura 9a**). Por otro lado, cuando se ensayaron los distintos porcentajes de *Aloe saponaria* con Metronidazol, resultó que todas las concentraciones de AV disminuyeron significativamente el crecimiento de *C. difficile* cuando se combinaban con 0,25µg/ml y 0,125µg/ml del antibiótico. Cabe destacar, que se observó un gran aumento de la acción antimicrobiana del Metronidazol cuando se utilizó 1µg/ml en combinación con el 20% de *Aloe saponaria* (**Figura 9b**).

Así, en conjunto estos resultados demuestran que AV potencia el efecto antimicrobiano de la Vancomicina y del Metronidazol.

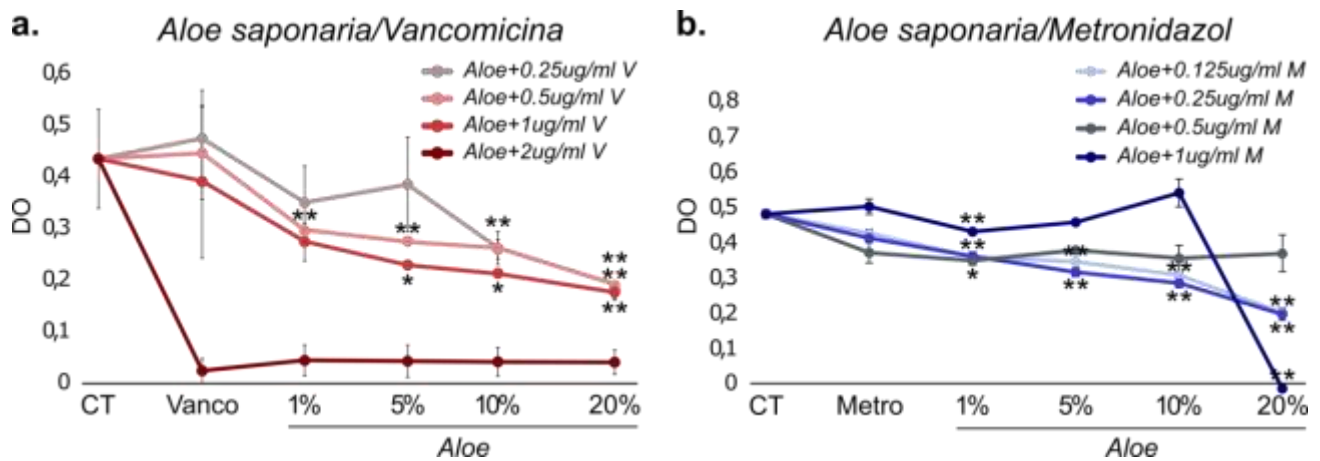


Figura 9. *Aloe saponaria* potencia el efecto de la Vancomicina y del Metronidazol frente a *C. difficile*. La cepa NAP1/BI/027 de *C. difficile* fue cultivada en medio BHI en placas de 96 wells en ausencia (CT) o presencia de diferentes concentraciones de Vancomicina (a) o Metronidazol (b) y en presencia del extracto de AV (concentraciones finales de 1%, 5%, 10% y 20%). Luego de 48 horas de cultivo en anaerobiosis se determinó la DO a 595nm. Los puntos representan la Media \pm SEM de un experimento representativo realizado por triplicado. Los datos se analizaron estadísticamente utilizando el test de Dunnett's $^*(p<0.05)$ $^{**}(p<0.01)$. CT: Control.

Efecto de *Aloe saponaria* frente a la formación de biofilm de *C. difficile*

En los últimos años, la capacidad de formar biofilm de *C. difficile* se ha considerado importante para la persistencia de la bacteria en el intestino y, en consecuencia, en la recurrencia de la infección (Frostid et al., 2021). *C. difficile* es capaz de formar biofilm con aproximadamente el 20% de los integrantes de la microbiota, actuando como reservorio de esporas y protegiéndose de la actividad de los antibióticos (Rubio-Mendoza et al., 2023). A su vez, algunos miembros de la microbiota pueden proporcionar nutrientes o ayudar a la adhesión, promoviendo la formación del biofilm de *C. difficile* (Tremblay & Dupuy, 2022). Teniendo en cuenta estos antecedentes, se evaluó el efecto de *Aloe saponaria* frente a la capacidad de *C. difficile* de desarrollar este factor de virulencia. Para esto, se realizó el ensayo con Cristal Violeta. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias en la formación de biofilm frente a las distintas concentraciones de AV. Sin embargo, se observó una tendencia a disminuir la formación del biofilm cuando se

suministra AV al 1% (**Figura 10**). Serán necesarios realizar más ensayos para reforzar este estudio.

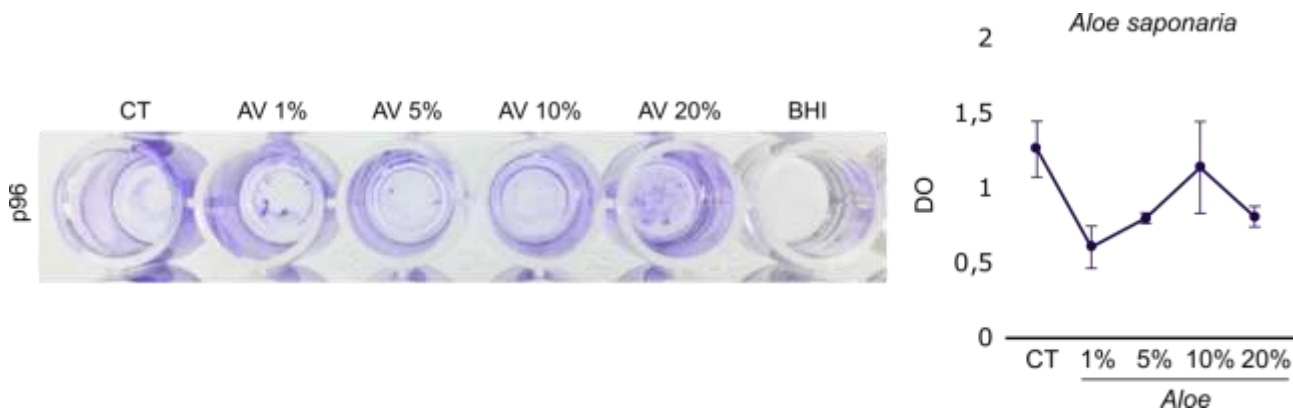


Figura 10. Efecto del AV sobre la formación de biofilm de *C. difficile*. La cepa NAP1/BI/027 de *C. difficile* fue cultivada en medio BHI suplementado con D-Dextrosa en placas de 24 y/o 96 wells fondo plano, en ausencia o presencia del extracto de AV en concentraciones finales de 1%, 5%, 10% y 20%, durante seis días de cultivo estático en anaerobiosis. El biofilm formado se tiñó con Cristal Violeta 0.2% (imagen izquierda tomada de un experimento representativo). Posteriormente, se disolvió el colorante y se midió la DO a 595nm (imagen derecha, los puntos del gráfico representan la Media ± SEM de un experimento representativo realizado por triplicado). Los resultados se analizaron estadísticamente mediante test de Dunnett's.

***Aloe saponaria* protege *in vitro* la integridad del epitelio intestinal**

Con el objetivo de determinar el impacto del extracto de AV sobre el epitelio intestinal se utilizó la línea celular Caco-2. Luego de su diferenciación, la monocapa de células fue tratada por 24 horas con *C. difficile*, su secretoma o ambos en presencia o ausencia del extracto de AV. Luego de la tinción con Hematoxilina y Eosina y su visualización al microscopio se observó que, en ausencia de AV, tanto la bacteria como su secretoma inducen una gran disrupción de la monocapa caracterizada por grandes espacios libres de células (**Figura 11a**). Como puede observarse en los paneles inferiores el tratamiento con AV al 5% y al 10% revierte parcialmente el daño inducido por la bacteria y/o su secretoma. Lo cual se observa como una mayor conservación de la monocapa de células.

Para poder realizar un análisis cuantitativo de los resultados, se analizaron las imágenes con el programa QuPath distinguiendo el área que presentaba células

(monocapa) de las áreas libres de células. Los resultados obtenidos demuestran que frente al tratamiento con la bacteria, el 10% de AV redujo significativamente el área libre de células. Mientras que, cuando se trató tanto con la bacteria como con su secretoma, el área libre de célula disminuyó significativamente con concentraciones de 5% y 10%, lo que indicaría un efecto protector del AV (**Figura 11b**).

A su vez, en las imágenes, se observó un incremento en la mucosidad cuando el AV se encontraba presente en el tratamiento. Por esta razón, se cuantificó con QuPath y se observó un aumento significativo de la zona de mucosidad en presencia del 5% o 10% de AV ante el tratamiento con *C. difficile* (**Figura 11c**). Estos resultados indicarían un posible impacto del AV sobre la expresión y/o producción de mucinas por las células intestinales, lo cual será parte de estudios futuros.

Ante el incremento en la conservación de la estructura de la monocapa observada por el tratamiento con *Aloe saponaria*, se evaluó si este efecto protector era debido a un incremento en la viabilidad de las Caco-2 ante el tratamiento con *C. difficile*, su secretoma o ambos. Para esto, luego del tratamiento, las células fueron incubadas con tripsina para obtener una suspensión de células. Luego, se utilizó un colorante de viabilidad celular (Fixable Viability Dye eFluor™ 780) y se analizó por citometría de flujo. Los resultados obtenidos demostraron que el efecto protector de esta especie de AV no es mediado por un aumento de la viabilidad celular frente a la bacteria (**Figura 12**).

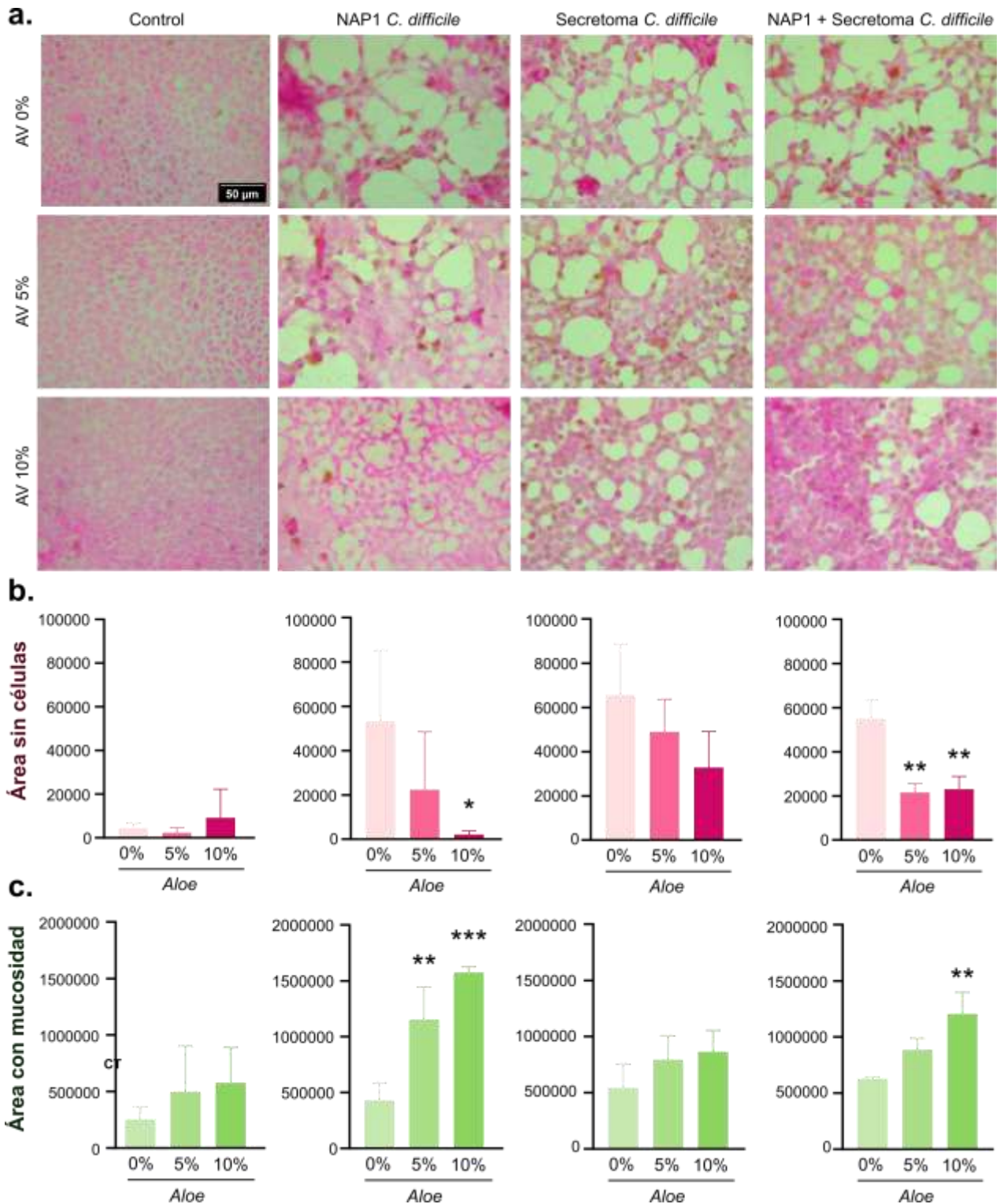


Figura 11. Efecto protector de *Aloe saponaria* sobre la monocapa de las Caco-2 ante el tratamiento con *C. difficile*. Las células Caco-2 diferenciadas fueron tratadas por 24 horas con *C. difficile*, el secretoma o ambas en presencia/ausencia de 5% y 10% de AV. **a.** Tinción con Hematoxilina y Eosina de la monocapa de células Caco-2 obtenidas luego de los diferentes tratamientos. Visualización en microscopio óptico (40X). De cada condición se fotografiaron y analizaron 5 campos representativos e independientes. Todas las imágenes fueron tomadas bajo los mismos parámetros y en simultáneo por lo que la barra de escala se aplica a todas las micrografías. **b.** Cuantificación relativa del área libre de células realizada con el programa QuPath. **c.** Cuantificación relativa del área de mucosidad observada frente a los distintos tratamientos realizada con el programa QuPath. Se graficó un experimento representativo de tres realizados por triplicado. Los datos se analizaron estadísticamente realizando ANNOVA y test de Dunnett's *($p < 0.05$) **($p < 0.01$) ***($p < 0.001$).

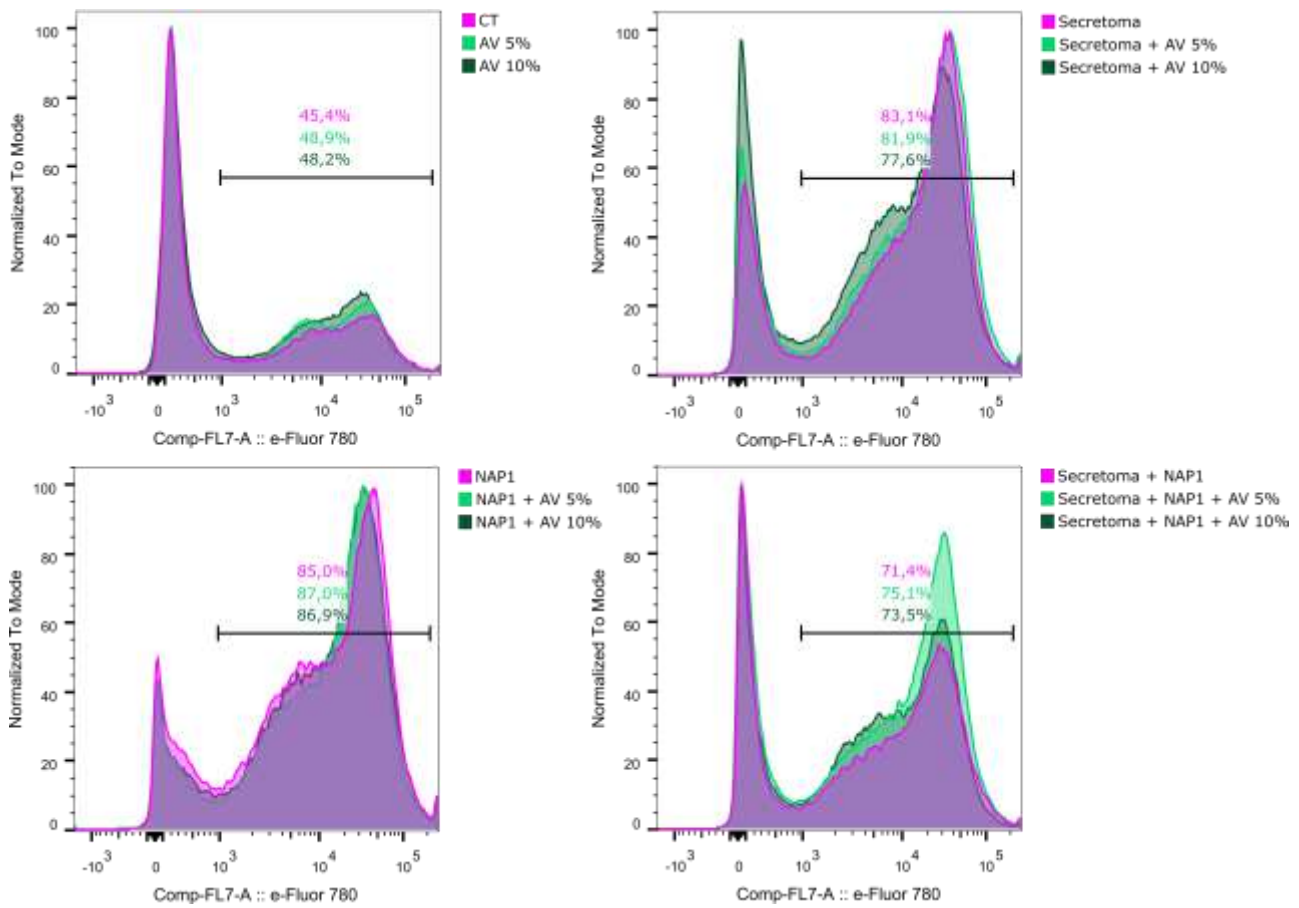


Figura 12. *Aloe saponaria* no afecta la viabilidad celular en las Caco-2 enfrentadas a *C. difficile*. Las células Caco-2 fueron diferenciadas y tratadas con *C. difficile*, su secretoma o ambos en presencia/ausencia de 5% y 10% de AV durante 24 horas. Posteriormente, fueron teñidas con el colorante Fixable Viability Dye eFluor™ 780 (eBioscience™), que se incorpora a las células muertas, y adquiridas en el citómetro de flujo FACSCanto II (BD). Se muestra el análisis de histogramas generado con el programa FlowJo 10v.

***Aloe saponaria* preserva las uniones estrechas entre células adyacentes**

Las uniones estrechas entre las células tienen gran protagonismo al momento de evaluar la integridad del epitelio intestinal. Las uniones estrechas formadas por Claudinas y Ocludinas son cruciales para la integridad de la barrera intestinal. Se ha observado que TcdA, TcdB y CDT modulan las proteínas del citoesqueleto, incluyendo Claudinas y Actina F44 (Engevik et al., 2020). Por lo que se evaluó la expresión de Claudina-1 por microscopía de fluorescencia frente ante el tratamiento con la bacteria y/o su secretoma, en presencia o ausencia de AV en este contexto. Se observó ante las concentraciones del

5% y 10% de *Aloe saponaria*, un aumento significativo de la expresión de Claudina-1 en la monocapa diferenciada de las Caco-2. En conjunto, los resultados sugieren que este efecto podría ser el responsable de la mayor integridad de la monocapa observada en presencia del extracto de AV.

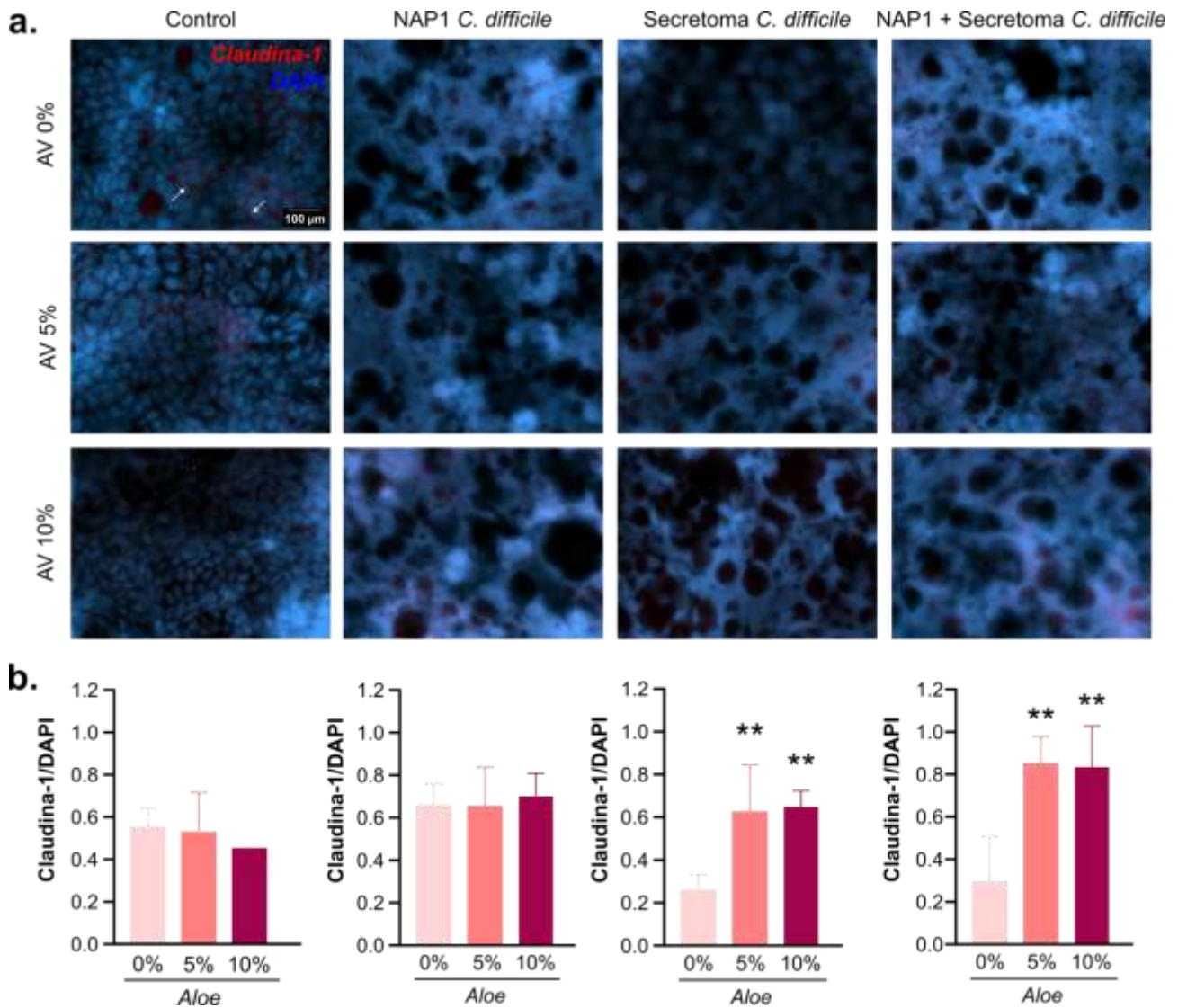


Figura 13. *Aloe saponaria* incrementa la expresión de Claudina-1 en las células tratadas con *C. difficile*. **a.** Las células Caco-2 fueron diferenciadas y luego tratadas con la cepa NAP1 de *C. difficile*, su secretoma o ambos, en presencia/ausencia de AV al 5% o 10% por 24 horas. La expresión de Claudina-1 fue determinada por microscopía de fluorescencia (40X). Se muestra una imagen representativa de 5 campos fotografiados por condición. Todas las imágenes fueron tomadas bajo los mismos parámetros y en simultáneo por lo que la barra de escala se aplica equivalentemente. **b.** Cuantificación relativa de la expresión de Claudina-1 por campo realizada con ImageJ. Significancia estadística según test de Dunnett's *($p < 0.05$) **($p < 0.01$).

DISCUSIÓN

Desde la antigüedad, las plantas del género *Aloe* se utilizan para el tratamiento de diversas afecciones en la salud humana. Hay una gran cantidad de estudios que demuestran los compuestos activos de *Aloe barbadensis* Miller y que le atribuyen sus propiedades antifúngicas, antivirales, antibacterianas y cicatrizantes, entre otras (Sánchez et al., 2020). La aloe-emodina, uno de sus compuestos activos presentes en el gel, tiene actividad antibacteriana contra varias cepas gram-positivas clínicamente representativas, incluidas algunas cepas bacterianas resistentes a fármacos, como *Staphylococcus epidermidis* resistente a la meticilina (Li et al., 2021). En cuanto a su capacidad antibacteriana, se ha demostrado que, el gel de *Aloe barbadensis* Miller en concentraciones del 50% y 100% inhibe el crecimiento de *Enterococcus faecalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Clostridium bacilli* y *Streptococcus mutans* (Jain et al., 2016). Nuestros resultados permiten sumar a *C. difficile* a esta y otras listas de bacterias sobre las que el AV posee un efecto anti-microbiano. Incluso, concentraciones del 1% para *Aloe saponaria* y del 5% de *Aloe barbadensis* Miller mostraron una reducción significativa del crecimiento de la cepa hipervirulenta NAP1/BI/027 de *C. difficile*.

Sin embargo, cuando se intentó determinar el efecto biocida para el extracto acuoso de *Aloe saponaria*, se vio una tendencia a disminuir la cantidad de células vegetativas que tenían la capacidad de formar una colonia luego del cultivo con AV, pero no se observó una reducción del 99,9% respecto del inóculo inicial. Lo cual indicaría que, a los porcentajes utilizados, el extracto de AV no ejerce una acción bactericida. Por su parte, el ensayo de XTT demostró que, luego del tratamiento con AV, disminuyeron las bacterias metabólicamente activas. Sumado a estos resultados, cuando se evaluó la viabilidad bacteriana por citometría de flujo, se encontró una reducción en el número total de células evaluadas pero no se observó una variación en la marcación con IP. Por lo que,

el tratamiento con AV no indujo la muerte de *C. difficile*, pero sí disminuyó su crecimiento. Los resultados obtenidos, indican que el extracto acuoso de *Aloe saponaria* presentaría una función bacteriostática, inhibiendo el crecimiento de *C. difficile*. Este tipo de efecto de *Aloe barbadensis* Miller ha sido también demostrado frente a otros tipos de patógenos, como *Listeria monocytogenes* (Ramírez Mérida et al., 2012)

La CDI ha sido señalada como una amenaza urgente por su resistencia a los antimicrobianos (Furuya-Kanamori et al., 2015; Postma et al., 2015). La principal complicación de la CDI, la recurrencia, se atribuye a la resistencia a los antibióticos ya que permite la persistencia y re-colonización (Buddle & Fagan, 2023). La Vancomicina y el Metronidazol son los antibióticos de primera línea suministrados ante la CDI, siendo también, los causantes de la disrupción de la microbiota y pudiendo generar nichos para nuevas colonizaciones por *C. difficile*. Nuestros resultados demuestran que el extracto acuoso de *Aloe saponaria* potencia el efecto de ambos antibióticos cuando se suministran en combinación contra la bacteria, lo que abre las puertas para pensar en una nueva estrategia terapéutica ante la CDI, permitiendo reducir las concentraciones administradas de antibióticos a los pacientes con menor disrupción de la microbiota intestinal.

Actualmente, pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, utilizan el gel de AV por vía oral como complemento o incluso como alternativa a la terapia convencional. Se ha demostrado, *in vitro*, que el gel de *Aloe barbadensis* Miller tiene propiedades antioxidantes y efectos inhibidores sobre la producción de prostaglandina E₂ e y sobre la IL-8 (Langmead et al., 2004). Por otro lado, un estudio evaluó *in vivo* los efectos de los polisacáridos de *Aloe barbadensis* Miller sobre la salud general, la bioquímica sérica y la producción de ácidos grasos de cadena corta intestinales en ratones. Los resultados demostraron que los ratones con suplementación durante 14 días tuvieron una buena salud comparable a los del grupo control (Maiuolo et al., 2022). Además, un estudio aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo ofreció evidencias de que la ingesta

oral de 100ml dos veces al día de gel de *Aloe barbadensis* Miller durante cuatro semanas induce de manera segura, la mejoría y la respuesta clínica, así como mejores puntajes histológicos de la colitis ulcerosa, una enfermedad directamente asociada con compromiso de la barrera intestinal comprometida, en pacientes ambulatorios (Le Phan et al., 2021). Estos antecedentes, demuestran la seguridad y los posibles beneficios del consumo del extracto de AV. En general, el estado actual de la aplicación de AV es un tema controvertido. Si bien los beneficios indican que podría tener un alto potencial para ser utilizado como un excelente agente terapéutico para numerosas enfermedades, se han sugerido en algunos casos problemas de seguridad para su implementación. Es necesario realizar una evaluación más exhaustiva de la seguridad, de manera que permita ofrecer una visión más profunda acerca de la toxicidad del AV y facilitar su aplicación (Tong et al., 2021).

Las bacterias emplean una gran cantidad de mecanismos para sobrevivir al tratamiento con antibióticos, siendo uno de ellos la formación de biofilm. Según el antibiótico administrado y las condiciones de crecimiento del biofilm es que varían los mecanismos de resistencia y tolerancia que pueden desarrollar (Hall & Mah, 2017). Ha sido demostrado que concentraciones de Metronidazol y de Vancomicina 100 veces por encima del valor de la CIM no son capaces de reducir el número de esporas viables en el biofilm formado por *C. difficile* (Frostid et al., 2021). Por otro lado, el extracto de *Aloe barbadensis* Miller es capaz de reducir la formación de biofilm de *Enterococcus faecalis* (Ghasemi et al., 2020). En nuestro trabajo cuando evaluamos la influencia del extracto acuoso de *Aloe saponaria* frente a la formación de biofilm de la cepa NAP1/BI/027 de *C. difficile*, se observó una tendencia a la reducción de la formación de biofilm sólo a bajas concentraciones de AV. Por lo que, se deberían desarrollar más ensayos para dilucidar el rol del AV sobre la formación de biofilm de *C. difficile*. Si bien el ensayo de Cristal Violeta es ampliamente utilizado debido a su simplicidad, bajo costo y reproducibilidad, presenta

ciertas limitaciones. Por un lado, ciertos compuestos derivados del gel del AV como los polifenoles, polisacáridos y las proteínas podrían interferir con el ensayo. Más aún, el ensayo permite determinar la cantidad total de biofilm formado, pero no proporciona información acerca de la estructura o funcionalidad del mismo. Por último, es importante tener en cuenta que el Cristal Violeta tiñe tanto bacterias vivas como muertas, así como la matriz extracelular del biofilm, por lo que deberían realizarse ensayos complementarios.

El efecto protector del AV sobre el epitelio intestinal se encuentra ampliamente documentado y estudiado. Nanovesículas derivadas de *Aloe barbadensis* Miller, *Aloe arborescens* Miller y *Aloe saponaria* aumentaron la expresión de proteínas de unión estrecha y de unión adherente disminuyendo así la permeabilidad epitelial intestinal (Choi et al., 2023). Por otro lado, ha sido observado que el gel de *Aloe barbadensis* Miller mejora la expresión de mucinas, promueve la secreción y el grosor de la capa de moco del intestino y, en última instancia, reduce la exposición de la pared del colon a bacterias y otras sustancias peligrosas (Shi et al., 2021). Al utilizar una línea celular como las Caco-2, se pudo observar *in vitro*, el efecto que tiene el extracto acuoso de *Aloe saponaria* sobre la monocapa diferenciada de este linaje que desarrolla características similares a los enterocitos. Este modelo nos permitió evaluar el impacto del tratamiento con *C. difficile*, su secretoma o ambos sobre el epitelio intestinal y el rol del AV como agente protector.

Por un lado, los resultados obtenidos apoyan la hipótesis del AV como un agente protector del epitelio ante la CDI ya que al administrarlo, se observó una disminución del área libre de células, lo que nos indica una mayor conservación de la integridad de la monocapa. Como se mencionó con anterioridad, las tres toxinas TcdA, TcdB y CDT provocan en las células intestinales, la alteración de las uniones estrechas entre células y, a su vez, inducen su apoptosis. También, conlleva al desmontaje de las fibras de actina y al colapso del citoesqueleto de estas células, lo que resulta en una forma redondeada y disminución del volumen celular (Engevik et al., 2020; Voth & Ballard, 2005). Todas esas

características producidas por las toxinas, se pueden visualizar en nuestros resultados, tanto en la **Figura 11** como en la **Figura 13**, donde al comparar los tratamientos con los controles, se presentan zonas libres de células, pérdida del contacto célula-célula y, un cambio en la forma de las células sobrevivientes. Esto se explica ya que el secretoma de la cepa NAP1, incluye a las tres toxinas y otras moléculas que pueda producir la bacteria.

Además, observamos que la zona de mucosidad se incrementa cuando se añade el extracto de *Aloe saponaria*. Cabe destacar que la mucosidad intestinal, cumple una función protectora permitiendo que las células epiteliales no estén en constante contacto con antígenos que puedan encontrarse en el lumen intestinal o con las bacterias constituyentes de la microbiota y desencadenar una respuesta inflamatoria por la activación de las células inmunitarias presente en la lámina propia. Este resultado, sienta las bases para proponer al AV como influyente sobre la capa de moco presente en el intestino y, constituye el punto de partida para continuar con la investigación del AV como inductor de la secreción de mucinas en el epitelio intestinal.

Cuando observamos el efecto protector del AV sobre la monocapa, evaluamos si el extracto tenía un efecto directo en la viabilidad de las Caco-2 ante el tratamiento con *C. difficile*, esperando encontrar una menor proporción de células muertas. Sin embargo, por citometría de flujo, no se observaron diferencias significativas en la viabilidad celular ante el cultivo con AV comparando lo obtenido con la presencia o ausencia de AV. Por esta razón, puede decirse que la menor proporción de espacios libres de células encontrados es independiente de la viabilidad celular.

Las uniones estrechas intestinales son estructuras complejas que contienen varias proteínas de membrana intercelular (como Claudinas y Ocludinas) unidas a las proteínas de andamiaje ZO-1, y a través de ellas, a la actina y miosina del citoesqueleto de las células epiteliales intestinales. Juntas, forman una barrera que dicta la absorción paracelular de electrolitos y macromoléculas, contribuyendo así a salvaguardar nuestro

cuerpo contra un lumen intestinal cargado de bacterias (Le Phan et al., 2021). Al evaluar la expresión de Claudina-1 observamos que el extracto de *Aloe saponaria* incrementa su expresión conservando la integridad de las uniones estrechas existentes en la monocapa diferenciada de Caco-2 ante el tratamiento con la bacteria y/o su secretoma. Estos resultados indicarían que AV protege al epitelio intestinal del efecto producido por las toxinas de *C. difficile* a través de un mecanismo que involucra una expresión sostenida de la Claudina-1, y que entre otros mecanismos posibles, podría contribuir a mantener la integridad del mismo.

En conjunto estos resultados demuestran un amplio espectro de actividades biológicas del extracto de AV frente a *C. difficile* y su secretoma, que van desde efectos bacteriostáticos y co-adyuvantes a propiedades protectoras del epitelio intestinal.

CONCLUSIÓN

Nuestros resultados demuestran que el extracto acuoso de AV inhibe el crecimiento de la cepa NAP1/BI/027 de *C. difficile* y potencia la acción antimicrobiana de los antibióticos suministrados como primera línea ante la CDI. Además, demostramos que el extracto de *Aloe saponaria* tiene un papel clave en la conservación de la integridad del epitelio intestinal potenciando la mucosidad presente en el mismo y conservando las uniones estrechas establecidas entre células vecinas, que mantienen a su vez, la capacidad del epitelio de ser permeable a nutrientes, pero impermeable a patógenos. Estos resultados en conjunto, ponen en evidencia la potencialidad del extracto de AV como una terapia alternativa para el tratamiento de la CDI y otras infecciones intestinales.

ANEXO

Medio BHI:

Preparación para 1 litro:

- BHI = 37 gramos
 - Extracto de levadura = 5 gramos
 - Cisteína al 10% = 10 mililitros
 - Taurocolato al 10% = 10 mililitros
1. Se pesan los compuestos en polvo, el BHI y el extracto de levadura, y se lleva a volumen utilizando agua estéril de sachet.
 2. Se autoclava a 121 °C durante 20 minutos.
 3. Se preparan las soluciones de cisteína y taurocolato al 10% y se esterilizan con filtro de 0,22µm. El taurocolato es sensible a la luz, por lo que se debe manipular con la luz apagada.
 4. Una vez que el medio autoclavado se enfría, se añaden los volúmenes de taurocolato y cisteína.
 5. El medio se almacena a temperatura ambiente o en heladera, cubierto de la luz.

Medio DMEM completo:

Del volumen que se quiera preparar, se debe hacer siguiendo las siguientes proporciones:

- 1% de Penicilina-Estreptomicina
- 15% de suero fetal bovino
- 84% medio DMEM incompleto

BIBLIOGRAFÍA

- Abad, C. L. R., & Safdar, N. (2021). A review of *Clostridioides difficile* infection and antibiotic-associated diarrhea. *Gastroenterology Clinics of North America*, 50(2), 323–340. <https://doi.org/10.1016/J.GTC.2021.02.010>
- Ahluwalia, B., Magnusson, M. K., Böhn, L., Störsrud, S., Larsson, F., Savolainen, O., Ross, A., Simrén, M., & Öhman, L. (2020). Randomized clinical trial: Effects of *Aloe barbadensis* Mill. extract on symptoms, fecal microbiota and fecal metabolite profiles in patients with irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterology and Motility*, 32(8). <https://doi.org/10.1111/NMO.13860>
- Alam, M. Z., & Madan, R. (2024). *Clostridioides difficile* toxins: Host cell interactions and their role in disease pathogenesis. *Toxins*, 16(6). <https://doi.org/10.3390/TOXINS16060241>
- Anwar, F., Roxas, B. A. P., Shehab, K. W., Ampel, N. M., Viswanathan, V. K., & Vedantam, G. (2022). Low-toxin *Clostridioides difficile* RT027 strains exhibit robust virulence. *Emerging Microbes & Infections*, 11(1), 1982. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2105260>
- Arjomandzadegan, M., Emami, N., Habibi, G., Farazi, A. A., Kahbazi, M., Sarmadian, H., Jabbari, M., Hosseini, H., & Ramezani, M. (2016). Antimycobacterial activity assessment of three ethnobotanical plants against *Mycobacterium Tuberculosis*: An *In Vitro* study. *International Journal of Mycobacteriology*, 5, S108–S109. <https://doi.org/10.1016/J.IJMYCO.2016.10.025>
- Arora, M. K., Sarup, Y., Tomar, R., Singh, M., & Kumar, P. (2019). Amelioration of diabetes-induced diabetic nephropathy by Aloe vera: Implication of oxidative stress and hyperlipidemia. *Journal of Dietary Supplements*, 16(2), 227–244. <https://doi.org/10.1080/19390211.2018.1449159>
- Athiban, P., Borthakur, B., Ganesan, S., & Swathika, B. (2012). Evaluation of antimicrobial efficacy of Aloe vera and its effectiveness in decontaminating gutta percha cones. *Journal of Conservative Dentistry : JCD*, 15(3), 246–248. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.97949>
- Banu, A., Sathyanarayana, B. C., & Chattannavar, G. (2012). Efficacy of fresh Aloe vera gel against multi-drug resistant bacteria in infected leg ulcers. *The Australasian Medical Journal*, 5(6), 305. <https://doi.org/10.4066/AMJ.2012.1301>

- Barbero, A. M., Moriconi, N. D., Palma, S., Celano, J., Balbi, M. G., Morro, L. S., Zarlenga, M. M. C., Suárez, J., Martínez, M. G., Machain, M. G., Altamiranda, C. G., Erbiti, G., Pino, R. E. H. Del, & Pasquinelli, V. (2024). Unveiling the threat: Characterization of *Clostridioides difficile* Infection in the Northwest Region of Buenos Aires between 2019-2023 and associated risk factors redefined through a meta-analysis. *MedRxiv*, 2024.04.25.24306385. <https://doi.org/10.1101/2024.04.25.24306385>
- Baruah, A., Bordoloi, M., & Deka Baruah, H. P. (2016). Aloe vera: A multipurpose industrial crop. *Industrial Crops and Products*, 94, 951–963. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2016.08.034>
- Beitelshees, M., Hill, A., Jones, C. H., & Pfeifer, B. A. (2018). Phenotypic variation during biofilm formation: Implications for anti-biofilm therapeutic design. *Materials 2018*, Vol. 11, Page 1086, 11(7), 1086. <https://doi.org/10.3390/MA11071086>
- Boudreau, M. D., & Beland, F. A. (2006). An evaluation of the biological and toxicological properties of *Aloe barbadensis* (Miller), *Aloe vera*. *Journal of Environmental Science and Health. Part C, Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews*, 24(1), 103–154. <https://doi.org/10.1080/10590500600614303>
- Buddle, J. E., & Fagan, R. P. (2023). Pathogenicity and virulence of *Clostridioides difficile*. *Virulence*, 14(1). <https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2150452>
- Chandra, H., Sharma, K. K., Tuovinen, O. H., Sun, X., & Shukla, P. (2021). Pathobionts: mechanisms of survival, expansion, and interaction with host with a focus on *Clostridioides difficile*. *Gut Microbes*, 13(1). <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1979882>
- Chen, Y., Cui, W., Li, X., & Yang, H. (2021). Interaction between commensal bacteria, immune response and the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *Frontiers in Immunology*, 12, 761981. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.761981/BIBTEX>
- Choi, S. H., Eom, J. Y., Kim, H. J., Seo, W., Kwun, H. J., Kim, D. K., Kim, J., & Cho, Y. E. (2023). Aloe-derived nanovesicles attenuate inflammation and enhance tight junction proteins for acute colitis treatment. *Biomaterials Science*, 11(16), 5490–5501. <https://doi.org/10.1039/D3BM00591G>
- Cruz-López, A. ; Morfin-Otero, F. ; Maldonado-Garza, R. ; Garza-González, H. J. ; An, E., Martínez-Meléndez, A., Cruz-López, F., Morfin-Otero, R., Maldonado-Garza, H. J., & Garza-González, E. (2022). An update on *Clostridioides difficile* binary toxin. *Toxins 2022*, Vol. 14, Page 305, 14(5), 305. <https://doi.org/10.3390/TOXINS14050305>

- Curcio, D., Cané, A., Fernández, F. A., & Correa, J. (2019). *Clostridium difficile*-associated diarrhea in developing countries: A systematic review and meta-analysis. *Infectious Diseases and Therapy*, 8(1), 87–103. <https://doi.org/10.1007/S40121-019-0231-8>
- Czepiel, J., Drózdź, M., Pituch, H., Kuijper, E. J., Perucki, W., Mielimonka, A., Goldman, S., Wultańska, D., Garlicki, A., & Biesiada, G. (2019). *Clostridium difficile* infection: review. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 38(7), 1211. <https://doi.org/10.1007/S10096-019-03539-6>
- Davis, R. H., Donato, J. J., Hartman, G. M., & Haas, R. C. (1994). Anti-inflammatory and wound healing activity of a growth substance in Aloe vera. *Journal of the American Podiatric Medical Association*, 84(2), 77–81. <https://doi.org/10.7547/87507315-84-2-77>
- Di Bella, S., Ascenzi, P., Siarakas, S., Petrosillo, N., & di Masi, A. (2016). *Clostridium difficile* toxins A and B: Insights into pathogenic properties and extraintestinal effects. *Toxins* 2016, Vol. 8, Page 134, 8(5), 134. <https://doi.org/10.3390/TOXINS8050134>
- Di Bella, S., Sanson, G., Monticelli, J., Zerbato, V., Principe, L., Giuffrè, M., Pipitone, G., & Luzzati, R. (2024). *Clostridioides difficile* infection: history, epidemiology, risk factors, prevention, clinical manifestations, treatment, and future options. *Clinical Microbiology Reviews*, 37(2). <https://doi.org/10.1128/CMR.00135-23>
- Dicks, L. M. T. (2023). Biofilm Formation of *Clostridioides difficile*, Toxin production and alternatives to conventional antibiotics in the treatment of CDI. *Microorganisms* 2023, Vol. 11, Page 2161, 11(9), 2161. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11092161>
- Elliott, B., Androga, G. O., Knight, D. R., & Riley, T. V. (2017). *Clostridium difficile* infection: Evolution, phylogeny and molecular epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 49, 1–11. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2016.12.018>
- El-Shemy, H., Aboul-Soud, M., Nassr-Allah, A., Aboul-Enein, K., Kabash, A., & Yagi, A. (2010). Antitumor properties and modulation of antioxidant enzymes' activity by Aloe vera leaf active principles isolated via supercritical carbon dioxide extraction. *Current Medicinal Chemistry*, 17(2), 129–138. <https://doi.org/10.2174/092986710790112620>
- Engevik, M. A., Danhof, H. A., Chang-Graham, A. L., Spinler, J. K., Engevik, K. A., Herrmann, B., Endres, B. T., Garey, K. W., Hyser, J. M., Britton, R. A., & Versalovic, J. (2020). Human intestinal enteroids as a model of *Clostridioides difficile*-induced enteritis. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 318(5), G870–G888. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00045.2020>

- Eun, A. Y., Sung, D. K., Whi, M. L., Hwa, J. P., Sang, K. K., Jae, Y. C., Min, W., & Man, H. R. (2008). Evaluation of antioxidant, antinociceptive, and anti-inflammatory activities of ethanol extracts from *Aloe saponaria* Haw. *Phytotherapy Research: PTR*, 22(10), 1389–1395. <https://doi.org/10.1002/PTR.2514>
- Farahnejad, Z., Ghazanfari, T., & Yaraee, R. (2011). Immunomodulatory effects of Aloe vera and its fractions on response of macrophages against *Candida albicans*. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 33(4), 676–681. <https://doi.org/10.3109/08923973.2011.560158>
- Fehrmann-Cartes, K., Coronado, M., Hernández, A. J., Allende, M. L., & Feijoo, C. G. (2019). Anti-inflammatory effects of aloe vera on soy meal-induced intestinal inflammation in zebrafish. *Fish & Shellfish Immunology*, 95, 564–573. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2019.10.075>
- Ferro, V. A., Bradbury, F., Cameron, P., Shakir, E., Rahman, S. R., & Stimson, W. H. (2003). In vitro susceptibilities of *Shigella flexneri* and *Streptococcus pyogenes* to inner gel of *Aloe barbadensis* Miller. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(3), 1137–1139. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.3.1137-1139.2003>
- Frostid, L. R., Chengid, J. K. J., & Unnikrishnanid, M. (2021). *Clostridioides difficile* biofilms: A mechanism of persistence in the gut? *PLOS Pathogens*, 17(3), e1009348. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1009348>
- Furuya-Kanamori, L., Marquess, J., Yakob, L., Riley, T. V., Paterson, D. L., Foster, N. F., Huber, C. A., & Clements, A. C. A. (2015). Asymptomatic *Clostridium difficile* colonization: epidemiology and clinical implications. *BMC Infectious Diseases*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/S12879-015-1258-4>
- Ghasemi, N., Behnezhad, M., Asgharzadeh, M., Zeinalzadeh, E., & Kafil, H. S. (2020). Antibacterial properties of Aloe vera on intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis* biofilm at different stages of development. *International Journal of Dentistry*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8855277>
- Hall, C. W., & Mah, T. F. (2017). Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 276–301. <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUX010>
- Haque, S. D., Saha, S. K., Salma, U., Nishi, M. K., & Rahaman, M. S. (2019). Antibacterial effect of Aloe vera (*Aloe barbadensis*) leaf gel against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Mymensingh Medical Journal : MMJ*, 28(3), 490–496. <https://europepmc.org/article/med/31391416>

- Hernández Del Pino, R. E., Barbero, A. M., Español, L. Á., Morro, L. S., & Pasquinelli, V. (2021). The adaptive immune response to *Clostridioides difficile*: A tricky balance between immunoprotection and immunopathogenesis. *Journal of Leukocyte Biology*, 109(1), 195–210. <https://doi.org/10.1002/JLB.4VMR0720-201R>
- Hu, Y., Xu, J., & Hu, Q. (2003). Evaluation of antioxidant potential of aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(26), 7788–7791. <https://doi.org/10.1021/JF034255I>
- Jain, S., Rathod, N., Nagi, R., Sur, J., Laheji, A., Gupta, N., Agrawal, P., & Prasad, S. (2016). Antibacterial effect of Aloe Vera gel against oral pathogens: An *in-vitro* study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 10(11), ZC41–ZC44. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/21450.8890>
- James, G. A., Chesnel, L., Boegli, L., Pulcini, E. de L., Fisher, S., & Stewart, P. S. (2018). Analysis of *Clostridium difficile* biofilms: imaging and antimicrobial treatment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(1), 102–108. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKX353>
- Jangra, A., Sharma, G., Sihag, S., & Chhokar, V. (2022). The dark side of miracle plant- Aloe vera: a review. *Molecular Biology Reports*, 49(6), 5029–5040. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07176-9>
- Jasso De Rodríguez, D., Hernández-Castillo, D., Rodríguez-García, R., & Angulo-Sánchez, J. L. (2005). Antifungal activity *in vitro* of Aloe vera pulp and liquid fraction against plant pathogenic fungi. *Industrial Crops and Products*, 21(1), 81–87. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2004.01.002>
- Kaur, S., & Bains, K. (2024). *Aloe Barbadensis* Miller (Aloe Vera). *International Journal for Vitamin and Nutrition Research. Internationale Zeitschrift Fur Vitamin- Und Ernährungsforschung. Journal International de Vitaminologie et de Nutrition*, 94(3–4), 308–321. <https://doi.org/10.1024/0300-9831/A000797>
- Kayagaki, N., Warming, S., Lamkanfi, M., Walle, L. Vande, Louie, S., Dong, J., Newton, K., Qu, Y., Liu, J., Heldens, S., Zhang, J., Lee, W. P., Roose-Girma, M., & Dixit, V. M. (2011). Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature* 2011 479:7371, 479(7371), 117–121. <https://doi.org/10.1038/nature10558>
- Kelesidis, T., & Pothoulakis, C. (2024). *Clostridioides difficile* infection. *Gut Instincts: A Clinician's Handbook of Digestive and Liver Diseases*, 179–185. <https://doi.org/10.1201/9781003524489-28>
- Kelly, C. R., Fischer, M., Allegretti, J. R., Laplante, K., Stewart, D. B., Limketkai, B. N., & Stollman, N. H. (2021). ACG Clinical Guidelines: Prevention, Diagnosis, and

- Treatment of *Clostridioides difficile* infections. *American Journal of Gastroenterology*, 116(6), 1124–1147. <https://doi.org/10.14309/AJG.0000000000001278>
- Langmead, L., Makins, R. J., & Rampton, D. S. (2004). Anti-inflammatory effects of aloe vera gel in human colorectal mucosa *in vitro*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 19(5), 521–527. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2036.2004.01874.X>
- Lea, T. (2015). Caco-2 cell line. The impact of food bioactives on health: *In vitro* and *ex vivo* models, 103–111. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_10
- Le Phan, T. H., Park, S. Y., Jung, H. J., Kim, M. W., Cho, E., Shim, K. S., Shin, E., Yoon, J. H., Maeng, H. J., Kang, J. H., & Oh, S. H. (2021). The role of processed Aloe vera gel in Intestinal tight Junction: An *in vivo* and *in vitro* study. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 6515, 22(12), 6515. <https://doi.org/10.3390/IJMS22126515>
- Li, T., Lu, Y., Zhang, H., Wang, L., Beier, R. C., Jin, Y., Wang, W., Li, H., & Hou, X. (2021). Antibacterial activity and membrane-targeting mechanism of Aloe-Emodin against *Staphylococcus epidermidis*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 621866. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.621866/BIBTEX>
- Magaña-Montiel, N., Muriel-Millán, L. F., & Pardo-López, L. (2024). XTT assay for detection of bacterial metabolic activity in water-based polyester polyurethane. *PLOS ONE*, 19(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0303210>
- Mahale, V. D., & Sharma, S. (2024). Evaluation of minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of royal jelly against *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, and *Candida albicans*. *Journal of Conservative Dentistry and Endodontics*, 27(3), 252. https://doi.org/10.4103/JCDE.JCDE_234_23
- Maiuolo, J., Musolino, V., Gliozzi, M., Carresi, C., Scarano, F., Nucera, S., Scicchitano, M., Oppedisano, F., Bosco, F., Macri, R., Palma, E., Muscoli, C., & Mollace, V. (2022). Involvement of the intestinal microbiota in the appearance of multiple sclerosis: Aloe vera and Citrus bergamia as potential candidates for intestinal health. *Nutrients* 2022, Vol. 14, Page 2711, 14(13), 2711. <https://doi.org/10.3390/NU14132711>
- Majumdar, A., & Govind, R. (2022). Regulation of *Clostridioides difficile* toxin production. *Current Opinion in Microbiology*, 65, 95. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2021.10.018>
- Ng, J., Hirota, S. A., Gross, O., Li, Y., Ulke-Lemee, A., Potentier, M. S., Schenck, L. P., Vilaysane, A., Seamone, M. E., Feng, H., Armstrong, G. D., Tschopp, J., MacDonald, J. A., Muruve, D. A., & Beck, P. L. (2010). *Clostridium difficile* toxin-induced inflammation and intestinal injury are mediated by the inflammasome. *Gastroenterology*, 139(2), 542-552.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.04.005>

- Ouyang, Z., Zhao, M., Li, J., Zhang, Y., & Zhao, J. (2024). Cyclic diguanylate differentially regulates the expression of virulence factors and pathogenesis-related phenotypes in *Clostridioides difficile*. *Microbiological Research*, 286, 127811. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2024.127811>
- Panse, N., & Gerk, P. M. (2022). The Caco-2 Model: Modifications and enhancements to improve efficiency and predictive performance. *International Journal of Pharmaceutics*, 624. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2022.122004>
- Postma, N., Kiers, D., & Pickkers, P. (2015). The challenge of *Clostridium difficile* infection: Overview of clinical manifestations, diagnostic tools and therapeutic options. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 46 Suppl 1, S47–S50. <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2015.11.001>
- Pressman, P., Clemens, R., & Hayes, A. W. (2019). Aloe vera at the frontier of glycobiology and integrative medicine: Health implications of an ancient plant. *SAGE Open Medicine*, 7. <https://doi.org/10.1177/2050312119875921>
- Pugh, N., Ross, S. A., ElSohly, M. A., & Pasco, D. S. (2001). Characterization of Aloeride, a new high-molecular-weight polysaccharide from Aloe vera with potent immunostimulatory activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 1030–1034. <https://doi.org/10.1021/JF001036D>
- Qiu, Z., Jones, K., Wylie, M., Jia, Q., & Orndorff, S. (2000). Modified *Aloe barbadensis* polysaccharide with immunoregulatory activity. *Planta Medica*, 66(2), 152–156. <https://doi.org/10.1055/S-2000-11125/ID/5/BIB>
- Rahman, S., Carter, P., Bhattarai, N., & Puoci, F. (2017). Aloe Vera for tissue engineering applications. *Journal of Functional Biomaterials* 2017, Vol. 8, Page 6, 8(1), 6. <https://doi.org/10.3390/JFB8010006>
- Ramírez Mérida, L. G., Morón de Salim, A., Catinella, R., & Castillo, L. (2012). Efecto bacteriostático y/o bactericida del extracto de gel de Aloe vera sobre cultivos de *Listeria monocytogenes* [Bacteriostatic and/or bactericidal extract of Aloe vera gel on cultures of *Listeria monocytogenes*]. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 62(1), 73–78.
- Ray, A., Dutta Gupta, S., & Ghosh, S. (2013). Isolation and characterization of potent bioactive fraction with antioxidant and UV absorbing activity from *Aloe barbadensis* Miller gel. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 22(4), 483–487. <https://doi.org/10.1007/S13562-012-0178-2/METRICS>
- Ried, K., Travica, N., Dorairaj, R., & Sali, A. (2020). Herbal formula improves upper and lower gastrointestinal symptoms and gut health in Australian adults with digestive

disorders. *Nutrition Research (New York, N.Y.)*, 76, 37–51.
<https://doi.org/10.1016/J.NUTRES.2020.02.008>

Rodriguez, C., Taminiau, B., Van Broeck, J., Delmée, M., & Daube, G. (2016). *Clostridium difficile* in food and animals: A comprehensive review. In advances in experimental medicine and biology (Vol. 932, pp. 65–92). Springer New York LLC.
https://doi.org/10.1007/5584_2016_27

Rubio-Mendoza, D., Martínez-Meléndez, A., Maldonado-Garza, H. J., Córdova-Fletes, C., & Garza-González, E. (2023). Review of the impact of biofilm formation on recurrent *Clostridioides difficile* infection. *Microorganisms* 2023, Vol. 11, Page 2525, 11(10), 2525. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11102525>

Sampedro, M. C., Artola, R. L., Murature, M., Murature, D., Ditamo, Y., Roth, G. A., & Kivatinitz, S. (2004). Mannan from *Aloe saponaria* inhibits tumoral cell activation and proliferation. *International Immunopharmacology*, 4(3), 411–418.
<https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2003.12.016>

Sánchez, M., González-Burgos, E., Iglesias, I., & Gómez-Serranillos, M. P. (2020). Pharmacological update properties of Aloe Vera and its major active constituents. *Molecules* 2020, Vol. 25, Page 1324, 25(6), 1324.
<https://doi.org/10.3390/MOLECULES25061324>

Saniasiaya, J., Salim, R., Mohamad, I., & Harun, A. (2017). Antifungal effect of malaysian Aloe vera leaf extract on selected fungal species of pathogenic otomycosis species in *in vitro* culture medium. *Oman Medical Journal*, 32(1), 41–46.
<https://doi.org/10.5001/OMJ.2017.08>

Shi, G., Jiang, H., Feng, J., Zheng, X., Zhang, D., Jiang, C., & Zhang, J. (2021). Aloe vera mitigates dextran sulfate sodium-induced rat ulcerative colitis by potentiating colon mucus barrier. *Journal of Ethnopharmacology*, 279, 114108.
<https://doi.org/10.1016/J.JEP.2021.114108>

Silva, M. A., Trevisan, G., Hoffmeister, C., Rossato, M. F., Boligon, A. A., Walker, C. I. B., Klafke, J. Z., Oliveira, S. M., Silva, C. R., Athayde, M. L., & Ferreira, J. (2014). Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Aloe saponaria* Haw in a model of UVB-induced paw sunburn in rats. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 133, 47–54. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIO.2014.02.019>

Silva, M. A., Trevisan, G., Klafke, J. Z., Rossato, M. F., Walker, C. I. B., Oliveira, S. M., Silva, C. R., Boligon, A. A., Flores, F. C., Silva, C. D. B., Athayde, M. L., & Ferreira, J. (2013). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Aloe saponaria* Haw on

- thermal injury in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 146(1), 393–401.
<https://doi.org/10.1016/J.JEP.2012.12.055>
- Singab, A. N. B., El-Hefnawy, H. M., Esmat, A., Gad, H. A., & Nazeam, J. A. (2015). A systemic review on *Aloe arborescens* pharmacological profile: Biological activities and pilot clinical trials. *Phytotherapy Research: PTR*, 29(12), 1858–1867.
<https://doi.org/10.1002/PTR.5483>
- Stella Maris Carpano, María Teresa Castro, & Etile Dolores Spegazzini. (2009). Caracterización morfoanatómica comparativa entre *Aloe vera* (L.) Burm. F., *Aloe arborescens* Mill., *Aloe saponaria* Haw. y *Aloe ciliaris* Haw. (*Aloeaceae*).
- Suzuki, T. (2020). Regulation of the intestinal barrier by nutrients: The role of tight junctions. *Animal Science Journal = Nihon Chikusan Gakkaiho*, 91(1).
<https://doi.org/10.1111/ASJ.13357>
- Tong, X., Li, M., Li, D., Lao, C., Chen, J., Xu, W., Du, J., Zhang, M., Yang, X., & Li, J. (2021). Aloe vera gel extract: Safety evaluation for acute and chronic oral administration in Sprague-Dawley rats and anticancer activity in breast and lung cancer cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 280, 114434.
<https://doi.org/10.1016/J.JEP.2021.114434>
- Tremblay, Y. D., & Dupuy, B. (2022). The blueprint for building a biofilm the *Clostridioides difficile* way. *Current Opinion in Microbiology*, 66, 39–45.
<https://doi.org/10.1016/J.MIB.2021.12.002>
- Van der Sluis, M., De Koning, B. A. E., De Bruijn, A. C. J. M., Velcich, A., Meijerink, J. P. P., Van Goudoever, J. B., Büller, H. A., Dekker, J., Van Seuningen, I., Renes, I. B., & Einerhand, A. W. C. (2006). Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology*, 131(1), 117–129. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2006.04.020>
- Vancamelbeke, M., & Vermeire, S. (2017). The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 11(9), 821.
<https://doi.org/10.1080/17474124.2017.1343143>
- Voth, D. E., & Ballard, J. D. (2005). *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(2), 247–263.
<https://doi.org/10.1128/CMR.18.2.247-263.2005>
- Zhu, D., Sorg, J. A., & Sun, X. (2018). *Clostridioides difficile* biology: Sporulation, germination, and corresponding therapies for *C. difficile* infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(FEB), 325877.
<https://doi.org/10.3389/FCIMB.2018.00029/BIBTEX>

