

Tesis de Posgrado

Participación de la respuesta inflamatoria en el desarrollo del Síndrome Urémico hemolítico

Fernández, Gabriela C.

2002

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Fernández, Gabriela C.. (2002). Participación de la respuesta inflamatoria en el desarrollo del Síndrome Urémico hemolítico. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3482_Fernandez.pdf

Cita tipo Chicago:

Fernández, Gabriela C.. "Participación de la respuesta inflamatoria en el desarrollo del Síndrome Urémico hemolítico". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2002. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3482_Fernandez.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



*Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales*

*“Participación de la respuesta
inflamatoria en el desarrollo del
Síndrome Urémico Hemolítico”*

Autor: Lic. Gabriela C. Fernández

Director: Dra. Marina S. Palermo

*División Inmunología
Instituto de Investigaciones Hematológicas
Academia Nacional de Medicina*

Agosto del 2002

Nº 3 4 8 2

*"El mundo, desafortunadamente, rara vez se ajusta a nuestras esperanzas
y se niega, sistemáticamente, a comportarse de un modo razonable."*

Stephen Jay Gould



Agradecimientos

En muchos momentos de la vida uno se cuestiona si tomó la decisión correcta. Creo no equivocarme al pensar que cuando elegí trabajar en este grupo de investigación, no sólo tomé la decisión correcta sino que encontré personas increíbles con las que formé lazos de respeto y cariño que espero mantener para siempre. Porque no sólo considero que este es mi trabajo sino que el ambiente y la buena onda hace que me den ganas de levantarme y venir al lab, un lugar en el que encuentro un excelente ámbito científico y un grupo que me brinda contención, comprensión y la posibilidad de crecer personal y profesionalmente. A todos ellos les brindo mi agradecimiento y los quiero mucho.

Por eso, gracias totales a:

mi directora, la Dra. Marina S. Palermo, quien sabiamente una vez me escribió en esos momentos de desesperación, en los cuales uno se cuestiona el sentido y la relevancia de las cosas que hace: "Lo más sincero o creíble es que uno vaya cambiando de opinión a medida que sigue trabajando, de lo contrario querría decir que uno ya sabe todo antes de empezar"
mi co-director: el Dr. Martín A. Isturiz, quien con su experiencia soberana contesta todas nuestras preguntas con una paciencia infinita (menos los lunes a la mañana), quien una vez me dijo: "No desfallezcas ante las contradicciones, si todavía las contradicciones no existen"
mis fieles amigas y compañeras de mesada, que me bancan siempre y me ayudan en todo: la leal Caro Rubel, la explosiva Sonia Gómez, la sensible Colo Dran..... las re-quiero!!!!
mis amigas las chicas Isturiz: la transparente futura mamá Paulita Barrionuevo, la querible Fernandita Alves-Rosa y la objetiva Maca Beigier-Bompadre
nuestra querida Nelly
toda la Sección Leucemia Experimental: Isabel Piazzon e Irene Nepomnaschy y su grupo, al grupo de Edith Kordon, y un especial gracias a Juan Portaluppi, Antonio Morales y Tito. A Oscar Bustuobad por su genialidad y su generosidad de ideas
al grupo de Mirta Giordano y Jorge Geffner por su siempre amable colaboración, pero sobre todo a Moni Vermeulen por su buena onda y su compañerismo
toda la gente del primer piso
Faby y Emilse de la Sección Hemostasia
Martita Felippo, Nora Galassi y Norma Riera de citometría de flujo
los chicos del Cemic: Sergio Fridman, Viviana Pressiani y Antonio Fernández
Ernesto Crocitto y Romina Fraiman de fotografía
los Dres Mario Díaz, Laura López y Flavia Ramírez del Hospital Garrahan y a los Dres. Ranón Exeni e Irene Grimoldi del Hospital del Niño
mi familia, amigas de siempre Pil, Guada y Flory y a mi novio Maxi.

<i>Abreviatura</i>	<i>Nombre completo</i>
A/E	Lesiones "attaching and effacing"
AA	Acido araquidónico
ADP	Adenosina difosfato
AG	Aminoguadaína
anti-plq	Anticuerpo anti-plaquetas
anti-PMNs	Anticuerpo anti-neutrófilos
cONS	Forma constitutiva de la óxido nítrico sintetasa
D+SUH	Forma epidémica del SUH (diarrea positiva)
EPEC	<i>E. Coli</i> enteropatógenicas
ES	Error estándar
FcγR	Receptor para la porción Fc de las inmunoglobulinas G
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	perfil de tamaño
FvW	Factor von Willebrand
Gb ₃	Globotriaosilceramida
Gb ₄	Globotetraosilceramida
G-CSF	Factor estimulador de colonias de la serie granulocítica
GRP	Glóbulos rojos de pollo
Hb	Hemoglobina
HUVEC	Células endoteliales de cordón umbilical humano
IL-10	Interleuquina 10
IL-1β	Interleuquina 1 beta
IL1-Ra	Antagonista del receptor para la interleuquina 1
IL-6	Interleuquina 6
IL-8	Interleuquina 8
IMF	Intensidad media de fluorescencia
iONS	Forma inducible de la óxido nítrico sintetasa
IROs	Intermediarios reactivos del oxígeno
L-ARG	L-arginina
LEE	"locus for enterocyte effacement"
L-NAME	NG-nitro-L-arginina metil ester
L-NIL	L-N ⁶ -(1-imino-etil)-lisina
LPS	Lipopolisacáridos

<i>Abreviatura</i>	<i>Nombre completo</i>
mARN	Acido ribonucleico mensajero
MAT	Microangiopatía trombótica
MCP-1	Proteína tipo 1 quimioattractante de monocitos
M-CSF	Factor estimulatorio de colonias de la serie monocítica
MoAc	Anticuerpo monoclonal
MPC	Mepacrina
MPO	Mieloperoxidasa
ON	Oxido nítrico
OVA	Ovoalbúmina
PAI-1	Inhibidor tipo 1 del activador del plasminógeno
PBS	Buffer fosfato salino
PE	Ficoeritrina
PMNs	Neutrófilos
PPPs	Plasma pobre en plaquetas
PRPs	Plasma rico en plaquetas
rARN	Acido ribonucleico ribosomal
RE	Retículo endoplasmático
SFB	Suero fetal bovino
SSC	Perfil de complejidad
STEC	<i>E. Coli</i> productora de Stx
Stx	Toxina Shiga
SUH	Síndrome Urémico Hemolítico
TG	Tioglicolato
TNF- α	Factor de necrosis tubular alfa
t-PA	Activador del plasminógeno tisular

Índice

	<i>Página</i>
<i>Resumen</i>	<i>1</i>
<i>1- Breve introducción general y objetivos</i>	<i>3</i>
<i>2-Introducción</i>	
2.1- Aspectos clínicos del D+SUH	8
2.2- Presencia de citoquinas en los pacientes con D+SUH	9
2.3- Factores pronóstico del D+SUH	10
2.4- Fisiopatología del D+SUH	10
2.5- Tratamiento	11
2.6- Epidemiología	12
2.7- Estructura de la Stx	13
2.8- Transporte retrógrado de la Stx	15
2.9- Receptores de la Stx	17
2.10- Curso de la infección	19
2.10.1- Interacción con el epitelio intestinal	19
2.10.2- Translocación de la Stx	20
2.10.3- Transporte de la Stx en la circulación. Interacción con distintos tipos celulares.	21
2.10.3.1- Polimorfonucleares neutrófilos (PMNs)	22
2.10.3.2- Monocitos	23
2.10.3.3- Plaquetas	24
2.10.3.4- Glóbulos rojos	25
2.10.3.5- Linfocitos	26
2.10.4- Interacción de la Stx con células endoteliales.	26
2.10.5- Interacción de la Stx con los tipos celulares del riñón	27
2.10.5.1- Células endoteliales glomerulares	27
2.10.5.2- Células mesangiales	28
2.10.5.3- Células epiteliales glomerulares	28
2.10.5.4- Células epiteliales del túbulo renal	29
2.11- Relación con otros componentes bacterianos y de la respuesta inflamatoria	29
2.11.1- Óxido nítrico (NO)	29
2.11.2- Lipopolisacáridos	32
2.12- Infecciones naturales con E.Coli y modelos animales de SUH	33
2.12.1- Modelo murino	33
2.12.2- Otros modelos animales de SUH	34
<i>3- Materiales y Métodos</i>	
3.1- Reactivos y técnicas generales	35
3.1.1- Anticuerpos	35
3.1.2- Preparación de la Stx2	35
3.1.3- Ensayos de toxicidad en células Vero	36
3.1.4- Obtención de muestras de sangre	36
3.1.5- Recuento y fórmula de leucocitos de sangre periférica	37
3.1.6- Aislamiento de PMNs	37

3.1.7- Citometría de flujo.	37
3.1.8- Citotoxicidad dependiente de anticuerpos (CCDA)	38
3.1.9- Citotoxicidad dependiente de intermediarios reactivos del oxígeno (IROs) desencadenada por complejos inmunes.	38
3.2- Estudios en ratones	39
3.2.1- Animales.	39
3.2.2- Estudios in vivo	39
3.2.2.1- Tratamiento con Stx2	39
3.2.2.2- Tratamiento con endotoxina	39
3.2.2.3- Modulación de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS)	40
3.2.2.4- Estudios de depleción	40
3.2.2.4.1- Obtención de anticuerpos policlonales anti-plaquetas (anti-plq) y anti-PMNs (anti-PMN) de ratón en conejo	40
3.2.2.4.2- Tratamiento con anti-plq y anti-PMN	41
3.2.2.5- Estudios de migración	41
3.2.3- Estudios ex vivo	42
3.2.3.1- Obtención de células de médula ósea	42
3.2.3.2- Determinación de la actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO) en médula ósea y pulmón	42
3.2.3.3- Medición de urea en plasma	43
3.2.3.4- Determinación de óxido nítrico (NO) en plasma	43
3.2.3.5- Obtención y recuento de plaquetas de sangre periférica	43
3.2.3.6- Estudios de agregación plaquetaria	43
3.2.3.7- Estudios de degranulación de plaquetas en ratón	44
3.2.4- Estudios histológicos en riñón	44
3.2.4.1- Procesamiento del tejido y tinciones de rutina	44
3.2.4.2- Inmunohistoquímica para fibrinógeno	45
3.3- Estudios en humanos	45
3.3.1- Pacientes	45
3.3.1.1- Características generales de los pacientes y controles	45
3.3.1.2- Degranulación de los PMNs en pacientes con D+SUH	48
3.3.1.3- Medición del aumento en membrana de los marcadores CD11b y CD66b (respuesta de degranulación) en respuesta a la estimulación con distintas citoquinas: TNF- α , IL-8 y G-CSF	48
3.3.2- Estudios in vitro en PMNs humanos de donadores normales adultos	49
3.3.2.1- Efectos directos de la urea.	49
3.3.2.2- Efectos directos de la Stx	49
3.3.2.3- Cuantificación de la apoptosis de PMNs por tinción con Ioduro de Propidio	50
3.4- Estadística	50
4- Resultados	
4.1- Estudio de la importancia de los neutrófilos (PMNs) en el modelo murino de SUH	51
4.1.1- Efecto de la Stx2 en leucocitos circulantes	51
4.1.2- Cinética de la neutrofilia inducida por la Stx2	53
4.1.3- Expresión del marcador CD11b en los PMNs circulantes	54
4.1.4- Efectos de la Stx2 en la adherencia y migración de los PMNs	55

4.1.5- Efectos de la Stx2 sobre la citotoxicidad de los PMNs.	56
4.1.6- Correlación entre el porcentaje de PMNs y el daño renal inducido por la Stx2.	57
4.1.7- Efecto de la depleción de PMNs en la mortalidad inducida por Stx2	58
Resumen capítulo 4.1	60
4.2- Estudio de la importancia de los PMNs en pacientes con D+SUH.	61
4.2.1- Recuento absoluto de leucocitos en sangre periférica	61
4.2.2- Expresión de marcadores de activación en PMNs de sangre periférica	61
4.2.3- Degranulación de los PMNs.	64
4.2.4- Estudios funcionales	66
4.2.5- Efectos directos de la urea	67
4.2.6- Parámetros fenotípicos y funcionales en niños neutrofílicos	68
4.2.7- Respuesta de los PMNs periféricos de pacientes a distintas citoquinas	69
4.2.8- Correlaciones	71
4.2.9- Efectos directos de la Stx2 sobre los PMNs humanos	71
4.2.10- Estudios fenotípicos y funcionales en monocitos de pacientes con D+SUH	73
Resumen capítulo 4.2	76
4.3- Estudio del papel del óxido nítrico (NO) y las plaquetas en el modelo murino de SUH	77
4.3.1- Efecto del NO como modulador de la mortalidad inducida por la Stx2	77
4.3.2- Niveles de urea en plasma	78
4.3.3- Efectos del tratamiento con Stx2 y L-NAME sobre la activación plaquetaria	79
4.3.4- La inhibición de la NOS potencia la degranulación de las plaquetas inducida por Stx2	81
4.3.5- Examen histológico	83
4.3.6- Generación de metabolitos derivados del NO inducidos por la Stx2	86
4.3.7- Participación de las plaquetas en la acción de la Stx2 y el L-NAME	86
4.3.8- Efecto de la inhibición de la producción de NO sobre la neutrofilia inducida por la Stx2	87
Resumen capítulo 4.3	89
5- Discusión	90
Referencias	102

Resumen



La forma típica del síndrome urémico hemolítico (D+SUH) es una microangiopatía trombótica caracterizada por anemia hemolítica con fragmentación de eritrocitos, trombocitopenia con agotamiento de la función plaquetaria y daño renal agudo. Esta enfermedad es la principal causa de daño renal en la población pediátrica y nuestro país presenta la mayor incidencia del mundo. Si bien la mortalidad es baja debido a las terapias de soporte empleadas en el tratamiento de los síntomas, existe una alta proporción de niños (hasta un 50%) que puede presentar secuelas renales y neurológicas. El D+SUH se desarrolla luego de la ingestión de alimentos o bebidas contaminadas con bacterias productoras de una exotoxina denominada toxina Shiga (Stx). La bacteria coloniza el intestino, y comienza a producir la toxina que pasa a la circulación y se une a un receptor (Gb₃) en los tejidos blanco (principalmente el riñón), donde se internaliza e inhibe la síntesis de proteínas. Si bien la Stx es absolutamente necesaria para el desarrollo de la enfermedad, existen evidencias que demuestran que el sistema inflamatorio puede influenciar el curso del D+SUH. El objetivo de esta tesis fue determinar la importancia de distintos componentes centrales de la respuesta inflamatoria como los neutrófilos (PMNs), las plaquetas y el óxido nítrico (NO) en la fisiopatología del SUH en un modelo murino por inyección endovenosa de la variante tipo 2 de la Stx (Stx2) pura. Asimismo, se investigó el estado de activación y funcionalidad de los PMNs periféricos de pacientes cursando el período agudo del D+SUH y luego de la recuperación clínica.

Los resultados mostraron una disminución en la muerte y daño renal de los animales inyectados con Stx2 en ausencia de PMNs. Sin embargo, la depleción de plaquetas no tuvo ninguna influencia en estos aspectos. En los animales inyectados con Stx2 se observó una marcada neutrofilia, la cual correlacionó con el daño renal. Estos PMNs periféricos poseían mayor capacidad citotóxica, adhesión a la vasculatura y expresión del marcador de activación CD11b. Estos datos evidencian una activación de los PMNs luego de la inyección de la Stx2 y demuestran la importancia de este tipo

celular en el desarrollo del SUH como un factor de exacerbación del daño. Por otra parte, también se demostró una activación plaquetaria temprana en respuesta a la Stx2, con una inhibición posterior por agotamiento, similar a la observada en los pacientes. La inhibición de la producción de NO provocó un aumento del daño renal y la mortalidad inducidos por la Stx2. Estos fenómenos fueron mediados, al menos en parte, por una mayor activación plaquetaria en ausencia de NO. Los estudios histológicos apoyaron estos hallazgos y evidenciaron, por primera vez, la formación de coágulos intra-glomerulares en los animales tratados con Stx2. Estos resultados sugieren un papel protector del NO en la fisiopatología del SUH, mediado por su acción antitrombótica e inhibitoria de la activación plaquetaria.

El estudio de los PMNs de los pacientes con D+SUH reveló una disminución en los marcadores de activación FcγRIII (CD16) y CD11b, y en el marcador de degranulación mieloperoxidasa (MPO) y una menor respuesta citotóxica dependiente de anticuerpos y de degranulación con respecto a una población de niños sanos. Los PMNs de los pacientes presentaron una disminución del FcγRIII, la MPO y las respuestas citotóxicas con respecto a una población de niños con neutrofilia no relacionada con el D+SUH, aunque la capacidad de respuesta de degranulación entre ambas poblaciones fue muy similar. El fenotipo y funcionalidad de los PMNs de los pacientes en el momento en que acuden al hospital indica que este tipo celular se encuentra parcialmente agotado, debido a un fenómeno de activación previo. Probablemente, los efectos de la toxina sobre los PMNs sean indirectos y mediados a través de la activación y daño endotelial, ya que en nuestras condiciones y por distintas metodologías, la Stx fue incapaz de unirse y/o de causar ningún efecto en PMNs provenientes de individuos adultos normales.

En conclusión, en este trabajo pudimos demostrar el papel central y modulador de distintos componentes de la respuesta inflamatoria, en la fisiopatología del SUH.

1- Breve introducción general y objetivos



El síndrome urémico hemolítico (SUH) es una enfermedad caracterizada por la triada anemia hemolítica traumática (eritrocitos fragmentados), trombocitopenia y daño renal agudo ¹. La forma típica o epidémica del SUH (también denominada D+SUH) afecta a niños menores de cinco años y es usualmente precedida por un prodromo de diarrea sanguinolenta. Si bien el principal órgano afectado es el riñón, también se observan lesiones severas en la pared del colon, daño en el miocardio por isquemia y alteraciones metabólicas, y oclusión vascular en el sistema nervioso central ¹. La lesión de microangiopatía trombótica (MAT) típica del SUH es debida a la formación de trombos de plaquetas y fibrina que ocluyen la microvasculatura en los órganos afectados. Así, la disfunción endotelial es el factor más importante del proceso microangiopático, que consiste en un engrosamiento de la pared vascular de capilares y arteriolas, con hinchazón y desprendimiento de las células endoteliales de la membrana basal y acumulación de material esponjoso en el subendotelio ². Actualmente no existe tratamiento específico para el D+SUH, sino que los pacientes son tratados con terapias de soporte destinadas a paliar los síntomas. La diálisis peritoneal es el principal tratamiento para eliminar los metabolitos tóxicos y reducir el daño renal agudo. Si bien de esta forma se ha reducido significativamente la mortalidad de esta enfermedad, existe una gran proporción de niños (hasta un 50%) que presentan secuelas renales o neurológicas severas ³⁻⁵.

Si bien en un principio se especuló que el agente etiológico era de origen viral ¹, más tarde Karmali *et al.* demostraron que el agente etiológico del D+SUH es una exotoxina, denominada actualmente toxina Shiga (Stx), producida por ciertas cepas de *E. coli* enterohemorrágicas, siendo el serotipo mayormente asociado al D+SUH el O157:H7 ^{6,7}. Existen diversas variantes de la toxina (Stx1, Stx2, Stx2c, d y e) que se encuentran codificadas en bacteriófagos integrados en el genoma bacteriano y una vez internalizadas en la célula blanco (por endocitosis vía receptor) causan, en general, inhibición de la síntesis proteica y/o muerte celular por apoptosis ^{8,9}. La holotoxina se compone de una subunidad A catalíticamente activa de 32 kDa y cinco subunidades B involucradas en la unión al receptor de 7.7 kDa cada una. Si bien se han descripto distintos receptores glicolipídicos que poseen el disacárido terminal Gal α 1-4 Gal

capaces de unir la Stx, el globotriosilceramida o Gb₃ es el que se encuentra en las células endoteliales y el que posee mayor afinidad por la toxina ¹⁰. Luego de la infección con *E. coli* productoras de toxina Shiga (STEC) sólo el 5-10% de los niños infectados desarrollan el SUH, presentándose un amplio rango de posibilidades con respecto al curso de la infección: portadores sanos, manifestaciones solamente intestinales o alteraciones parciales o formas incompletas de SUH ^{11,12}. Esto implica que factores del huésped y de la bacteria podrían influir en el desarrollo de la enfermedad.

Existen diversas etapas entre la ingestión del alimento contaminado y el desarrollo del SUH (Figura 1.1). La primera involucra la colonización del intestino por la bacteria, la cual comienza a producir la Stx causando diarrea sanguinolenta. Debido a que las STEC no son invasivas, el pasaje de la toxina a la circulación se realiza a través del epitelio intestinal ^{13,14}. Una vez en la sangre, la toxina interacciona con el endotelio vascular y con distintos tipos celulares presentes en la circulación, algunos de los cuales han sido postulados como posibles transportadores de la toxina al riñón ¹⁵⁻¹⁷. En el riñón la toxina causa destrucción de las células epiteliales tubulares y del endotelio glomerular (daño renal agudo) ^{18,19}. Durante todo este proceso existe activación de la cascada de coagulación, con la consecuente formación de trombos de plaquetas y fibrina, y liberación de mediadores inflamatorios. De esta forma se produce obstrucción de la microvasculatura con fragmentación mecánica de los glóbulos rojos (anemia hemolítica) y la característica trombocitopenia.

La relevancia de la respuesta inflamatoria en la fisiopatología del SUH es destacable. Existen diversas evidencias *in vivo* e *in vitro* que demuestran que mediadores inflamatorios como los lipopolisacáridos (LPS), el TNF- α y la IL1- β potencian el daño inducido por la toxina. Las células endoteliales *in vitro* aumentan notablemente su susceptibilidad a la Stx luego de la incubación con los mediadores mencionados ²⁰⁻²² y la mortalidad y el daño renal inducidos por la Stx *in vivo* son exacerbados por el pre-tratamiento con los LPS ^{23,24}.

Por otra parte, existen evidencias provenientes de la clínica que señalan que distintos componentes del sistema inflamatorio podrían ser importantes en la fisiopatología del D+SUH:

- ❖ Los polimorfonucleares neutrófilos (PMNs) constituyen una célula central en la respuesta inflamatoria. Los pacientes con D+SUH presentan una marcada neutrofilia, que ha sido asociada a un mal pronóstico de la enfermedad ^{25,26}. Más aún, en el suero de los pacientes se han encontrado niveles elevados de IL-8, una citoquina con conocidas propiedades moduladoras de la función de los PMNs, y elastasa, una proteasa presente en los PMNs que se libera luego de la activación de los mismos ²⁷⁻³⁰.
- ❖ Las plaquetas participan activamente del proceso de coagulación en respuesta al daño endotelial. Además de la trombocitopenia anteriormente mencionada, los pacientes con D+SUH presentan su función plaquetaria defectuosa, con niveles reducidos de moléculas presentes en sus gránulos ³¹⁻³³.
- ❖ Fisiológicamente, el óxido nítrico (NO) es el encargado del mantenimiento de las propiedades antitrombogénicas del endotelio mediante la inhibición de la agregación plaquetaria e inhibición de la adhesión de PMNs y plaquetas ³⁴⁻³⁷. Sin embargo, la hiperproducción de NO en respuesta a un proceso inflamatorio puede causar daño de las propias células. La concentración en plasma del sustrato de la enzima que produce el NO en los pacientes con D+SUH se encuentra disminuida, mientras que el derivado del NO, el nitrato (NO_3^-), está aumentado. Estos valores retoran a la normalidad luego de la recuperación clínica de los pacientes, sugiriendo la activación de la síntesis del NO en el período agudo del D+SUH ³⁸.

Teniendo en consideración estos antecedentes, el objetivo general de esta tesis es determinar la participación y relevancia de distintos componentes de la respuesta inflamatoria en la fisiopatología del SUH.

Los objetivos particulares incluyen:

A- En el modelo murino por inyección endovenosa de Stx2 pura

- 1- Investigar el papel de los PMNs en el desarrollo del SUH determinando algunos parámetros de activación de los mismos en distintos momentos del curso de la enfermedad y correlacionándolos con parámetros de severidad (mortalidad y daño renal). Asimismo, se determinarán los efectos de la ausencia de esta población celular sobre la toxicidad de la Stx2.
- 2- Estudiar el estado de activación de las plaquetas en el curso de la enfermedad y su relevancia en el desarrollo del SUH mediante la depleción de las mismas por anticuerpos específicos.
- 3- Investigar los efectos moduladores del NO en el curso de la patología a través del uso de inhibidores de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS). En estos animales se analizarán los efectos de la Stx2 sobre la mortalidad, la inducción del daño renal y activación plaquetaria.

B- En humanos

- 1- Investigar el estado de activación de los PMNs periféricos en pacientes con D+SUH cursando el periodo agudo y luego de la recuperación clínica y su correlación con parámetros de severidad del cuadro y/o evolución. Se determinarán las similitudes y diferencias respecto de otras poblaciones de pacientes que padecen enfermedades infecciosas que cursan con neutrofilia o daño renal crónico.
- 2- Determinar los efectos directos de la Stx2 en PMNs de individuos adultos normales midiendo la capacidad de unión de la toxina a este tipo celular y sus efectos moduladores sobre la expresión de marcadores de activación y funcionalidad.

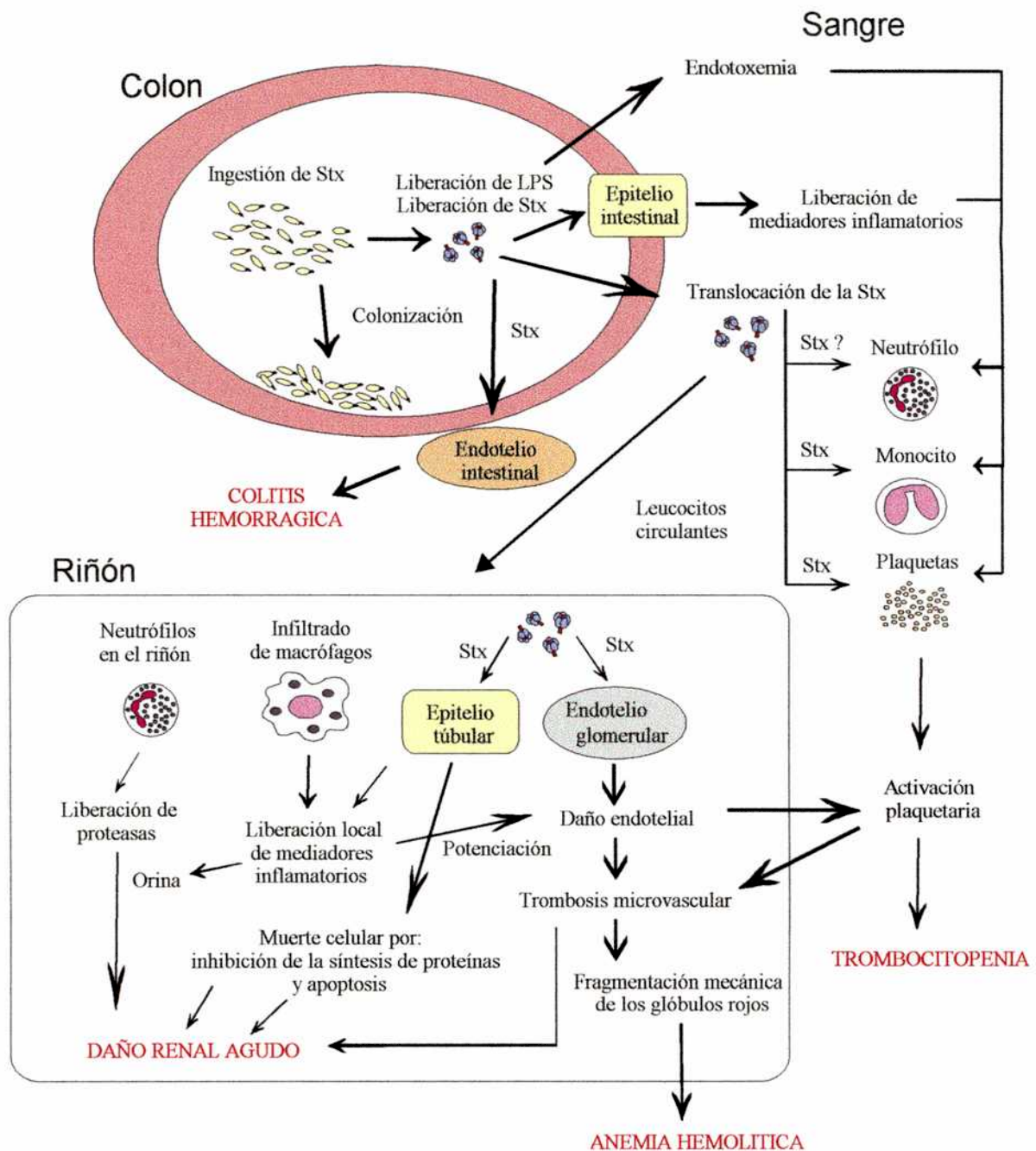


Figura 1.1. Esquema general de los sucesos desencadenados por la toxina en el huésped. Luego de la ingestión de alimentos o bebidas contaminadas, la bacteria coloniza el intestino, donde comienza a producir la toxina causando diarrea sanguinolenta, el primer síntoma del SUH. Por mecanismo no totalmente claros hasta el momento, la toxina pasa a la circulación, donde se ha postulado que interacciona con diversas células del sistema inmune y con el endotelio vascular. Esto desencadena un proceso microangiopático sistémico que lleva a la trombocitopenia y la anemia hemolítica. La interacción de la toxina con diversos tipos celulares presentes en el riñón desencadena una serie de sucesos que culminan en el daño renal agudo.

2- Introducción



2.1- Aspectos clínicos del D+SUH

El D+SUH se caracteriza por un prodromo del tracto digestivo con diarrea sanguinolenta, dolor abdominal y vómitos, aunque en ciertos casos existen manifestaciones prodrómicas del tracto respiratorio y fiebre. Las lesiones en el intestino se localizan principalmente en el colon, donde pueden aparecer infartos colónicos, hemorragias y necrosis intestinales ¹.

La insuficiencia renal aguda se presenta, con diversos grados, en el 100% de los casos, siendo esta enfermedad la principal causa de insuficiencia renal en los pacientes pediátricos. Los pacientes pueden presentar cuadros de hipervolemia por retención hidrosalina debida a la disminución en el filtrado glomerular, que también provoca elevación de los niveles de urea y creatinina en sangre y proteinuria. La oligoanuria y anuria son otras características frecuentes, siendo la duración de ambos fenómenos variable ³⁹.

A nivel microscópico la patología renal del D+SUH en la etapa aguda muestra que las lesiones observadas son debidas a la coagulación intravascular y daño tubular directo, mientras que las lesiones tardías están relacionadas con la isquemia producida por la trombosis vascular y la lisis de los depósitos de fibrina ¹. En general, en biopsias de riñón de niños con D+SUH se observa retracción del glomérulo, desprendimiento del endotelio capilar glomerular de la membrana basal y ocasionalmente, necrosis e hiper celularidad y proliferación mesangial. Las arterias y arteriolas presentan disminución del lumen debido a la expansión del subendotelio, proliferación e hinchazón de la íntima como consecuencia de la acumulación de glóbulos rojos y fibrina, y necrosis y trombosis de la pared. Frecuentemente se observa daño con atrofia y necrosis en los túbulos proximales corticales, así como también una marcada fibrosis intersticial ².

La diálisis peritoneal ha reducido en gran medida las complicaciones de los cuadros clínicos que afectan el sistema muscular, digestivo, nervioso o cardiovascular, como consecuencia de la hipervolemia y el desequilibrio hidro-electrolítico. Sin embargo,

la hipertensión arterial y la acidosis metabólica debida a la insuficiencia renal, son factores importantes que pueden provocar fallo cardíaco y disminución de la contractibilidad cardíaca, respectivamente ³⁹.

Tanto el compromiso cardíaco como el neurológico pueden ser consecuencia de la acidosis, la hiperosmolaridad y el desequilibrio hidro-electrolítico o pueden resultar manifestaciones directas de la MAT presente en la vasculatura del sistema cardiovascular y nervioso central. El compromiso miocárdico puede incluir isquemia cardíaca, mientras que los trastornos neurológicos pueden ser leves (irritabilidad, somnolencia, desorientación y temblores) o severos (convulsiones, obnubilación, estupor, coma, hemiparesis y paro respiratorio) ^{1,39}. En los casos severos el páncreas también puede verse afectado por oclusión trombótica de la microvasculatura pancreática con isquemia y disfunción de los islotes.

La anemia hemolítica se encuentra presente en todos los casos agudos de D+SUH y se caracteriza por la presencia de eritrocitos morfológicamente anormales (fragmentados, triangulares, con forma de casco o con bordes dentados), intensa anisocitosis, reticulocitosis y eritroblastos circulantes. La hemólisis intravascular se debe al daño mecánico que sufren los eritrocitos al atravesar la microvasculatura ocluida por redes de fibrina y plaquetas ^{1,39}.

El aumento en los niveles de leucocitos, particularmente la población de PMNs y la disminución en el número de plaquetas son dos aspectos característicos del D+SUH. La trombocitopenia observada es causa del consumo intravascular de las plaquetas. Por otra parte, la función plaquetaria se encuentra inhibida (fenómeno denominado de plaquetas "exhaustas") y se ha demostrado la disminución de componentes intraplaquetarios ^{32,40}.

2.2- Presencia de citoquinas en los pacientes con D+SUH

La ocurrencia de un proceso inflamatorio asociado al D+SUH puede ser evidenciado por la determinación de citoquinas presentes en el suero de los pacientes. Así, niveles elevados tanto de las citoquinas inflamatorias IL-6 e IL-8, como de las antiinflamatorias IL-10 y el antagonista del receptor para la IL-1 (IL-1Ra) han sido

observados por diversos autores en el suero de pacientes cursando el período agudo del D+SUH comparado con niños normales ⁴¹⁻⁴⁴. Los resultados referentes a la presencia de TNF- α son variables, mientras que la mayoría de los estudios realizados no encuentran niveles alterados de IL-1 β ⁴⁴⁻⁴⁶.

Por otra parte, varios trabajos han reportado un aumento de IL-8, IL-6, TNF- α y de la proteína tipo 1 quimioattractante de monocitos (MCP-1) en la orina de los pacientes con D+SUH ^{43,47,48}, lo que revela una producción local de estos mediadores en el riñón y su secreción en la orina.

2.3- Factores pronóstico del D+SUH

Debido a que el daño renal en el SUH es irreversible, cuanto mayor es el daño mayor es la probabilidad de que existan secuelas que deriven en insuficiencia renal crónica, donde la única posibilidad de recuperación es el trasplante renal. Si bien diversos factores han sido asociados al peor pronóstico de la enfermedad (duración y severidad de la diarrea, daño neurológico severo, alto recuento inicial de neutrófilos), el criterio que mejor refleja el riesgo de presentar consecuencias desfavorables a largo plazo fue propuesto por Gianantonio y confirmado posteriormente por varios autores. Este criterio postula que la prognosis de la enfermedad es dependiente de la magnitud del daño renal asociado, cuyo marcador bioquímico sería la duración de la anuria en el período agudo ^{1,49-51}. La medición de la función renal al año o a los dos años del episodio agudo también es un buen factor de predicción del pronóstico a largo plazo ^{3,49,52}. Por lo tanto, el control de la magnitud del daño renal en el período agudo resulta crucial para la recuperación de las funciones del riñón a largo plazo.

2.4- Fisiopatología del D+SUH

La lesión de las células endoteliales en la microvasculatura, con la subsiguiente agregación de las plaquetas y activación de la cascada de coagulación, es uno de los principales factores en la fisiopatología del SUH. En los casos de D+SUH, la Stx es considerada la iniciadora del daño endotelial, que sería luego amplificado por factores

provenientes de plaquetas activadas o del sistema inflamatorio. En el plasma de los pacientes con D+SUH se encuentran diversos indicadores de daño endotelial y activación de la cascada de coagulación, como por ejemplo el factor von Willebrand ^{53,54}, los fragmentos 1+2 de la protrombina, el complejo trombina-antitrombina, el complejo plasmina-antiplasmina, los dímeros D-D ^{55,56}, la trombomodulina y el inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) ⁵⁷⁻⁶⁰. Si bien algunos trabajos muestran un aumento en los niveles antigénicos del activador del plasminógeno tisular (t-PA) ^{55,60}, Menzel *et al.* demostraron que la actividad del t-PA está disminuida en pacientes cursando el período agudo del D+SUH ⁶¹. Esta disminución podría deberse al aumento en el PAI-1, que a través de la inhibición del sistema fibrinolítico podría contribuir al fenómeno trombótico del SUH.

2.5- Tratamiento

La terapia utilizada actualmente para el D+SUH consiste en el manejo de los síntomas con el fin de mantener la homeostasis y eliminar los metabolitos tóxicos generados. Esto incluye restringir la ingesta de líquidos, sodio, potasio y proteínas y dializar el paciente si fuera necesario. La diálisis peritoneal se inicia cuando los pacientes están oligoanúricos o anúricos por 72 horas. Por otra parte, la anemia es corregida por transfusiones de glóbulos rojos sedimentados.

Los antibióticos como herramienta para combatir la infección bacteriana no son recomendables ya que aumentan el riesgo de contraer el SUH por dos motivos. En primer lugar, se ha demostrado que algunos antibióticos aumentan la producción de la toxina por parte de la bacteria, y en segundo término, la lisis de la bacteria en el intestino provocaría una liberación masiva de Stx, y por lo tanto, aumentaría el pasaje de la misma a la circulación ^{62,63}. De la misma forma, los agentes antimotilantes impiden la eliminación de la bacteria por las heces aumentando el tiempo de exposición a la toxina, por lo que resultan perjudiciales para el paciente ⁶³.

Tratamientos con resinas cubiertas con oligosacáridos administrados oralmente, que captan la toxina en el intestino (por ej, Chromosorb, Synsorb), están siendo

estudiados ^{64,65}. La utilización de estos agentes limitarían la cantidad y el tiempo de exposición a la toxina y podrían ser útiles en epidemias para tratar la población de riesgo expuesta. Sin embargo, cabe destacar que este tipo de tratamiento no sería efectivo en los casos en los que la toxina ya ha sido absorbida al momento de ser administrada la resina y que la mayor eficacia del tratamiento dependería del comienzo temprano del mismo.

La inmunización pasiva o activa también se encuentra en investigación con resultados alentadores. Estudios en cerdos y conejos demostraron que la inmunización con el toxoide de la variante Stx2e protegió a los animales del desafío con una *E. coli* productora de Stx2e ^{66,67}. Similarmente, se demostró que la inmunización de conejos con toxoides de la Stx1, Stx2 o la subunidad A o B, protege de la muerte e inhibe la toma de la toxina marcada con ¹²⁵I por los órganos blanco, siendo la misma depurada por el hígado y bazo ^{68,69}. Por otra parte, un estudio reciente en ratones muestra que un anticuerpo monoclonal anti-Stx, disminuye la mortalidad ante el desafío con STEC, inclusive cuando el mismo es administrado 24 horas luego de la inoculación de la bacteria ⁷⁰.

Agentes antiplaquetarios o antitrombóticos como heparina, prostaciclina, aspirina y estreptoquinasa no resultan beneficiosos y pueden provocar hemorragias ^{71,72}. La infusión o intercambio de plasma fresco puede resultar efectivo en casos no típicos de SUH ⁷² mientras que la administración de gama globulinas endovenosas o glucocorticoides no son eficaces ^{73,74}. Por último, la vitamina E como terapia antioxidante podría resultar beneficiosa aunque no ha sido probada en estudios controlados ⁷².

2.6- Epidemiología

El serotipo *E. coli* O157:H7 ha sido ampliamente asociado al desarrollo del D-SUH. Sin embargo, existen más de 100 serotipos capaces de causar la enfermedad en el humano (O26, O91, O111, O113, O121, O145, entre otros) ^{63,75}. Cabe destacar que la facilidad en el aislamiento del serotipo O157:H7, por su incapacidad de fermentar sorbitol, probablemente haya contribuido a una sobreestimación en la prevalencia del

mismo. En Norte América y Europa aproximadamente el 70% de los casos ha sido atribuido a este serotipo ². En nuestro país, sin embargo, la incidencia del O157:H7 es mucho menor ^{76,77}.

La incidencia del D+SUH varía según el año y el país. En los últimos años se han reportado incidencias de 0.2-4 casos/100.000 habitantes en Sudáfrica, Europa y Norte América, mientras que nuestro país presenta la incidencia más alta con 7-20 casos/100.000 habitantes ^{11,75}. El modo más frecuente de transmisión es a través del consumo de comida o agua contaminada con cepas STEC, principalmente carne mal cocida o productos no pasteurizados. Sin embargo, la transmisión persona a persona también es posible ⁶³. El ganado vacuno y el ovino son reservorios de *E. coli* O157:H7 y otras cepas patógenas ⁷⁸⁻⁸⁰. Es decir, estos animales naturalmente portan las STEC pero permanecen sin síntomas y liberan estos organismos al ambiente mediante las heces, siendo la magnitud de esta liberación dependiente de la edad, la dieta, el stress y la estación del año ⁷⁹. Por otra parte, diversas STEC han sido aisladas de las heces de otros animales domésticos como cerdos, perros y gatos, constituyendo una fuente adicional de posible transmisión ^{81,82}.

Luego de una infección con una STEC entre un 5-10% de los casos desarrollan D+SUH, mientras que el resto presenta distintos efectos como resultado de la infección: niños que permanecen sin síntomas, con manifestaciones exclusivamente intestinales o formas incompletas de SUH, como se mencionó anteriormente. Con el manejo de los síntomas y la introducción de la diálisis peritoneal, la mortalidad del D+SUH se ha reducido considerablemente y es, en la actualidad, del 0 al 5%. Sin embargo, existe una proporción importante de niños (hasta un 50%) que pueden presentar secuelas renales de distintos grados, o nerviosas ³⁻⁵.

2.7- Estructura de la Stx

La variante 1 de la toxina Shiga (Stx1) es esencialmente idéntica a la toxina Shiga proveniente de *Shigella dysenteriae* tipo 1 ⁸³. La toxina Shiga tipo 2 (Stx2) se diferenció inicialmente de la Stx1 por la incapacidad de anticuerpos policlonales dirigidos contra la Stx1 de inhibir la actividad citotóxica de la Stx2 ⁸⁴. Más tarde, el análisis de la

secuencia de los genes de las variantes de la toxina reveló que la homología aminoacídica entre la Stx2 y la Stx1 es de 56% ⁸⁵. Si bien estas variantes son antigénicamente diferentes, comparten algunas características biológicas importantes: ambas son holotoxinas compuestas de una subunidad A activa de 32 kDa y cinco subunidades B asociadas no covalentemente de 7.7 kDa cada una, que intervienen en la unión al receptor (**Figura 2.1**); ambas se unen al mismo receptor glicolipídico, el globotriaosilceramida (Gb₃); ambas toxinas poseen actividad de *N*-glicosidasa, y actúan depurinando un residuo específico de adenina del rRNA 28S de los ribosomas de las células eucariotas, inhibiendo la síntesis de proteínas. Por otra parte, si bien el gen de la Stx1 aislado de las bacterias de distintos brotes epidémicos parece estar conservado, existen variantes génicas que codifican para la Stx2. Entre ellas encontramos la Stx2c, Stx2d y la Stx2e, que es la responsable de la enfermedad de edema en cerdos, que difiere de las otras variantes en dos aminoácidos en la subunidad B y se une a un receptor glicolipídico diferente, el globotetraosilceramida (Gb₄) ⁹.

Los genes para las subunidades A y B están codificados en un operón presente en uno o más bacteriófagos lisogénicos de la bacteria y se denominan *stxA* y *stxB*. El gen para la subunidad B posee un sitio de unión al ribosoma más fuerte que el de la subunidad A y esto resulta en un aumento en la traducción de las subunidades B, satisfaciendo la relación 1 subunidad A:5 subunidades B de la holotoxina ⁶³. La holotoxina es ensamblada en el espacio periplásmico de la bacteria ⁹.

Estudios epidemiológicos indican que la probabilidad de contraer D+SUH en niños infectados con STEC productoras de Stx1 y 2 o sólo Stx2 es mayor que en niños infectados con bacterias productoras sólo de Stx1 ^{77,86,87}. Por otra parte, estudios *in vivo* en ratones demostraron que la dosis letal 50 (DL₅₀) de la Stx2 es 400 veces menor que para la Stx1 ⁸⁸. Esto implica que las propiedades tóxicas de la Stx1 y 2 podrían diferir aunque se desconoce el mecanismo involucrado en este fenómeno. En este sentido, estudios de los efectos de la temperatura y el pH sobre la toxicidad de ambas variantes revelaron que la Stx2 es más estable que la Stx1, aunque la Stx1 posee 10 veces más afinidad por el Gb₃ que la Stx2. Sin embargo, la capacidad de inhibir la síntesis de proteínas de ambas toxinas es equivalente ⁸⁸.

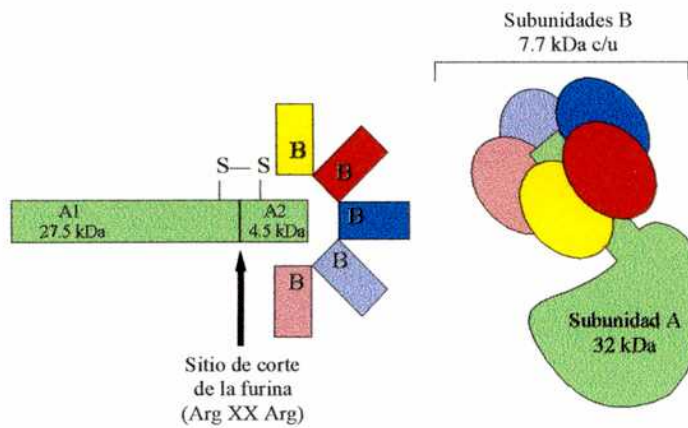


Figura 2.1. Representación esquemática de la estructura y disposición espacial de la Stx. Se muestra el sitio de corte de la furina con su secuencia consenso.

2.8- Transporte retrógrado de la Stx

Luego de unirse a su receptor, la Stx es internalizada vía vesículas cubiertas con clatrina, y sufre un transporte denominado retrógrado, que la conduce desde los endosomas al Golgi, de allí al retículo endoplasmático (RE), y finalmente al citoplasma ⁸⁹ (**Figura 2.2**). Para mediar su actividad de glicosidasa, la subunidad A debe separarse de las subunidades B y sufrir un corte proteolítico que da lugar a dos péptidos unidos por un puente disulfuro (A1 de 27.5 kDa y A2 de 4.5 kDa, ver **Figura 2.1**). Si bien se ha determinado que este corte es realizado por la enzima furina presente en el Golgi y en los endosomas ⁹⁰, el lugar y el momento de la separación de la subunidad A de las subunidades B no se conoce. La reducción posterior del puente disulfuro que conecta ambas cadenas de la subunidad A, probablemente mediado por proteínas isomerasas de disulfuros en el lumen del RE, libera la cadena A1 catalíticamente activa, la cual se transloca al citoplasma para interactuar con el ribosoma e inhibir la síntesis de proteínas.

Poco se conoce de los mecanismos que median el transporte retrógrado de la Stx. El transporte desde los endosomas hacia el Golgi ocurre vía el compartimiento de reciclaje endocítico, que transporta a la Stx al Golgi en estructuras cubiertas con clatrina que contienen AP1 ^{8,91}. Secuencias KDEL, involucradas en el transporte de otras proteínas hacia el RE, se encuentran ausentes en la Stx y en este caso, la GTPasa asociada al Golgi, Rab6, parecería estar involucrada ⁹². Por otra parte, sería posible que la Stx interactuara con otra proteína que sí tuviera secuencias KDEL u otras secuencias de señales de transporte al RE. En el pasaje de la Stx al citoplasma de la célula no

intervienen los transportadores TAP implicados en el procesamiento antigénico, y se especula con la participación del translocón Sec61p, el cual normalmente transloca las proteínas mal plegadas desde el Golgi al citoplasma para su degradación en los proteasomas. La disociación de las subunidades B y el corte realizado por la furina en la subunidad A podrían provocar cambios en el plegamiento que resultarían en la exportación al citoplasma vía el translocón Sec61p^{8,91}.

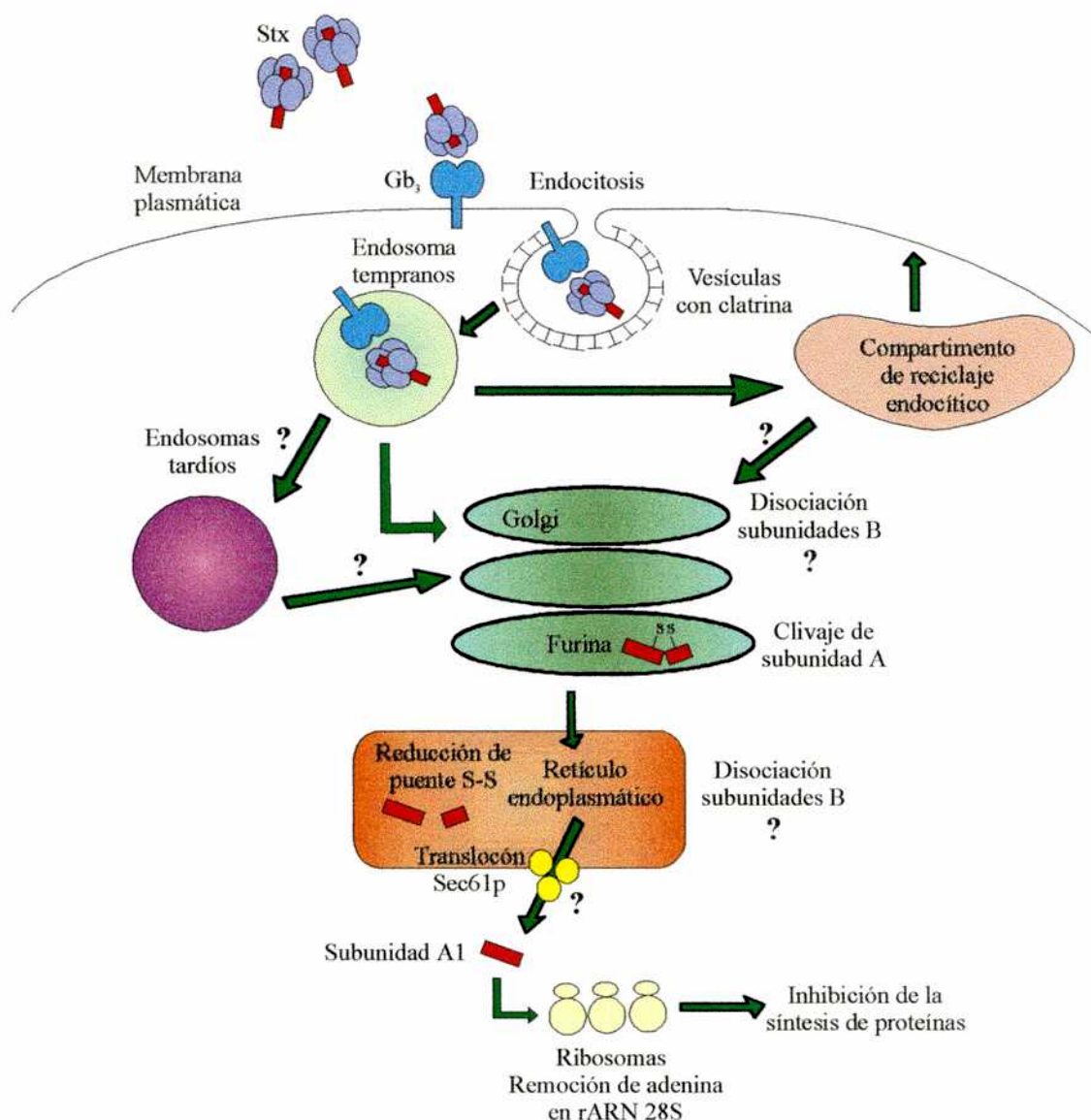


Figura 2.2. Transporte retrógrado de la Stx en la célula. La Stx es internalizada y transportada al Golgi, RE y finalmente al citoplasma, donde la subunidad A, disociada de las subunidades B y clivada por la furina, inhibe la síntesis de proteínas por clivaje de una adenina en el rRNA 28S de los ribosomas. Los signos de interrogación representan vías todavía no demostradas.

2.9- Receptores de la Stx

La subunidad B de la Stx se une específicamente a receptores de la familia de los glicosfingolípidos, componentes importantes de todas las membranas de las células eucariotas. La estructura general de los glicosfingolípidos consiste en una cabeza polar con una o más azúcares y una porción no polar de ceramida, compuesta por una cadena de ácido graso unida a una base de esfingosina por un puente amino (Tabla 2.1).

La Stx1 y Stx2 se unen a glicosfingolípidos que constituyen el sistema antigénico del grupo sanguíneo P y poseen el disacárido terminal Gal α 1-4 Gal, principalmente al globotriosilceramida (Gb₃, CD77 o P^k) (Figura 2.3), y en menor grado al galabiosilceramida y galactosilneolactotetraglicosilceramida (P1) ^{93,94}. La variante Stx2e se une al globotetraosilceramida (Gb₄ o P) que posee un residuo terminal N-acetilgalactosamina y se encuentra principalmente en eritrocitos ⁹⁵. El Gb₃ ha sido identificado en el humano en los túbulos proximales del tejido renal, linfocitos, eritrocitos y células endoteliales ^{96,97}. Dentro del tejido renal, Lingwood *et al.* han detectado unión de la toxina tanto en la corteza como en la médula, principalmente en túbulos distales y colectores en adultos y niños y en los glomérulos de niños ^{98,99}. Este hecho ha llevado a la especulación de que la razón por la que el D+SUH afecta principalmente a niños radicaría en la expresión glomerular del receptor en la población pediátrica. Cabe destacar que las biopsias utilizadas en los estudios de Lingwood provenían de pacientes pediátricos con síndrome nefrotóxico de lesiones mínimas, donde se han encontrado niveles elevados de citoquinas en circulación. De esta forma, la expresión del receptor en el glomérulo podría estar inducida en estas condiciones. En este sentido, Van Setten *et al.* encuentran en biopsias de pacientes pediátricos con distintos diagnósticos, que la unión de la Stx a los glomérulos es negativa o débilmente positiva, a excepción de las biopsias provenientes de pacientes con síndrome nefrotóxico de lesiones mínimas y un paciente con sepsis, donde encuentran una elevada unión de la toxina en glomérulo ¹⁰⁰. Estos datos sugieren la posible inducción del receptor en el glomérulo como consecuencia de factores inflamatorios liberados localmente. Coincidente con esta línea, la inyección de Stx en ratones transgénicos para una construcción con un gen “reporter”

bajo el promotor del TNF- α , provocó la estimulación de este promotor en el riñón exclusivamente, y no en otros tejidos ¹⁰¹.

No sólo los residuos de azúcares son importantes en la unión de la toxina. La composición de los ácidos grasos, en especial el largo de las cadenas, altera el transporte intracelular y actividad biológica de la Stx ^{102,103}. Esto podría explicar porqué algunas células expresan Gb₃ pero no son sensibles a la acción de la Stx. En estos casos se ha demostrado que el transporte de la toxina en la célula es diferente, y que después de internalizada es confinada a los lisosomas ¹⁰⁴. El tratamiento de las células insensibles con el agente de diferenciación butirato de sodio, induce el transporte retrógrado de la toxina y el cambio en la composición de ácidos grasos en el Gb₃, influenciando la susceptibilidad a la Stx ¹⁰⁵.

Tabla 2.1. Nombres y estructuras de los glicosfingolípidos relacionados con la Stx.

Familia GLS*	Nombre GLS	Estructura GLS
gala	Galabiosilceramida	Gal α 1 $\rightarrow$ 4 Gal β 1 $\rightarrow$ 1' Cer
globo	Globotriosilceramida (Gb ₃ , Cd77, P ^k)	Gal α 1 $\rightarrow$ 4 Gal β 1 $\rightarrow$ 4Glc β 1 $\rightarrow$ 1' Cer
neolacto	IV4- α -Galactosilneolactotetra-glicosilceramida (P1)	Gal α 1 $\rightarrow$ 4 Gal β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc β 1 $\rightarrow$ 3 Gal β 1 $\rightarrow$ 4 Glc β 1 $\rightarrow$ 1' Cer
globo	Globotetraosilceramida (Gb ₄ , P)	GalNAc β 1 $\rightarrow$ 3 Gal α 1 $\rightarrow$ 4Gal β 1 $\rightarrow$ 4Glc β 1 $\rightarrow$ 1' Cer

*GLS: glicosfingolípido

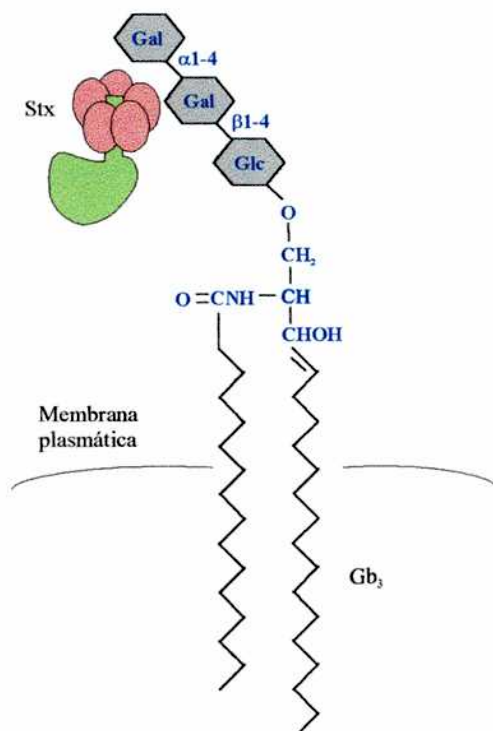


Figura 2.3 Esquema del receptor de la Stx, el globotriosilceramida o Gb₃. Se muestra la Stx uniéndose al disacárido terminal Gal α 1-4 Gal.

2.10- Curso de la infección

2.10.1- Interacción con el epitelio intestinal

Luego de la ingestión de la fuente de STEC, la bacteria se aloja en el intestino, principalmente en el colon en humanos ^{106,107}, donde se adhiere al epitelio y se multiplica. La cantidad de bacterias de las cepas STEC necesarias para producir una infección es muy baja (de 1 a 100 unidades formadoras de colonias), y el período de incubación entre la infección y el desarrollo de la diarrea puede ser desde 1 a 8 días, continuando la eliminación intestinal de la bacteria durante 3 o más semanas. La baja dosis infectiva ha sido asociada a la capacidad de estas cepas bacterianas de resistir las condiciones ácidas del estómago ⁶³.

El primer paso en la infección es la interacción y adherencia de las STEC al epitelio intestinal. Si bien se desconoce la manera en que las STEC median el contacto inicial con la célula intestinal ya que no poseen los genes *bfp* ("bundle-forming pili") presentes en las *E. coli* enteropatógenas (EPEC), la capacidad de ciertas cepas STEC de producir lesiones características denominadas "attaching and effacing" o lesiones A/E, también producidas por las EPEC, está bien caracterizada. El aspecto peculiar de este tipo de lesiones es la formación de un pedestal en las células a las cuales la bacteria se adhiere íntimamente y se reproduce. Durante el proceso de A/E las células epiteliales pierden sus microvellosidades y desarrollan protrusiones ricas en actina. Los genes necesarios para el desarrollo de estas lesiones se encuentran codificados en un islote de patogenicidad de 35.5 kb denominado "locus for enterocyte effacement" o LEE. Este islote codifica para la intimina (producto del gen *eae*), una proteína de membrana involucrada en la adhesión íntima, y para su propio receptor (Tir), el cual es translocado a la membrana de la célula blanco por un sistema de secreción de tipo III, también codificado por el LEE ^{63,108,109}. Si bien la asociación principal causal de la enfermedad en humanos es la presencia de los genes que codifican para la Stx, varios estudios han asociado la virulencia de la bacteria con la presencia del gen *eae* ¹¹⁰⁻¹¹². Sin embargo, cabe destacar que existen cepas STEC asociadas a enfermedades en el humano que no producen lesiones A/E, no poseen el gen de la intimina o no expresan la proteína. Esto

indica que las lesiones A/E no siempre son un requerimiento fundamental en el desarrollo de enfermedades asociadas a STEC y que factores de virulencia adicionales podrían estar involucrados ^{113,114}.

2.10.2- Translocación de la Stx

Debido a que las STEC son incapaces de invadir las células epiteliales intestinales, para llegar a los órganos blancos y causar el daño endotelial y demás manifestaciones clínicas del D+SUH, la Stx producida por la bacteria debe pasar a la circulación desde el intestino. Existen diversas hipótesis para explicar este fenómeno apoyadas en datos experimentales. La ruptura de la mucosa epitelial del intestino por acción directa o indirecta de la Stx podría ser una ruta posible para ganar acceso a la sangre. Si bien la presencia de Gb₃ no se ha determinado en el epitelio intestinal en humanos, distintas líneas celulares de intestino humano, así como el tejido intestinal de mono y conejo, poseen el receptor para la toxina y en consecuencia, es posible la existencia de efectos tóxicos directos de la Stx sobre el epitelio intestinal ^{13,115,116}. Otro mecanismo de pasaje de la toxina podría involucrar lesiones provocadas por la bacteria o por células del sistema inflamatorio, como los PMNs. En este sentido, estudios realizados con líneas celulares intestinales humanas demuestran que las mismas son capaces de producir IL-8 en respuesta a la Stx ¹¹⁷. La IL-8 es un potente quimiotáctico y activador de los PMNs ^{118,119}, que serían reclutados al lugar de la infección, y al activarse liberarían radicales libres del oxígeno, proteasas y otras sustancias proinflamatorias que dañarían la mucosa intestinal y facilitarían el pasaje de la toxina a la circulación. En este sentido, se ha demostrado la presencia de un infiltrado perivascular de PMNs en biopsias de colon de pacientes con D+SUH ¹⁰⁷. Por último, la entrada de la toxina a la circulación podría ocurrir a través de las células intactas o de las uniones entre células (**Figura 2.4**). El primer mecanismo fue demostrado *in vitro* por Acheson *et al.* en líneas intestinales humanas polarizadas, donde se observó transporte transcelular de la Stx1 y 2 desde el lado apical al basolateral, mayoritariamente. Estas células tienen la característica de poseer uniones estrechas y el pasaje no alteró morfológicamente las células ni hubo

disrupción celular. Debido a que una de las líneas utilizadas carecía de Gb₃, el proceso parece involucrar una endocitosis no específica^{13,14}.

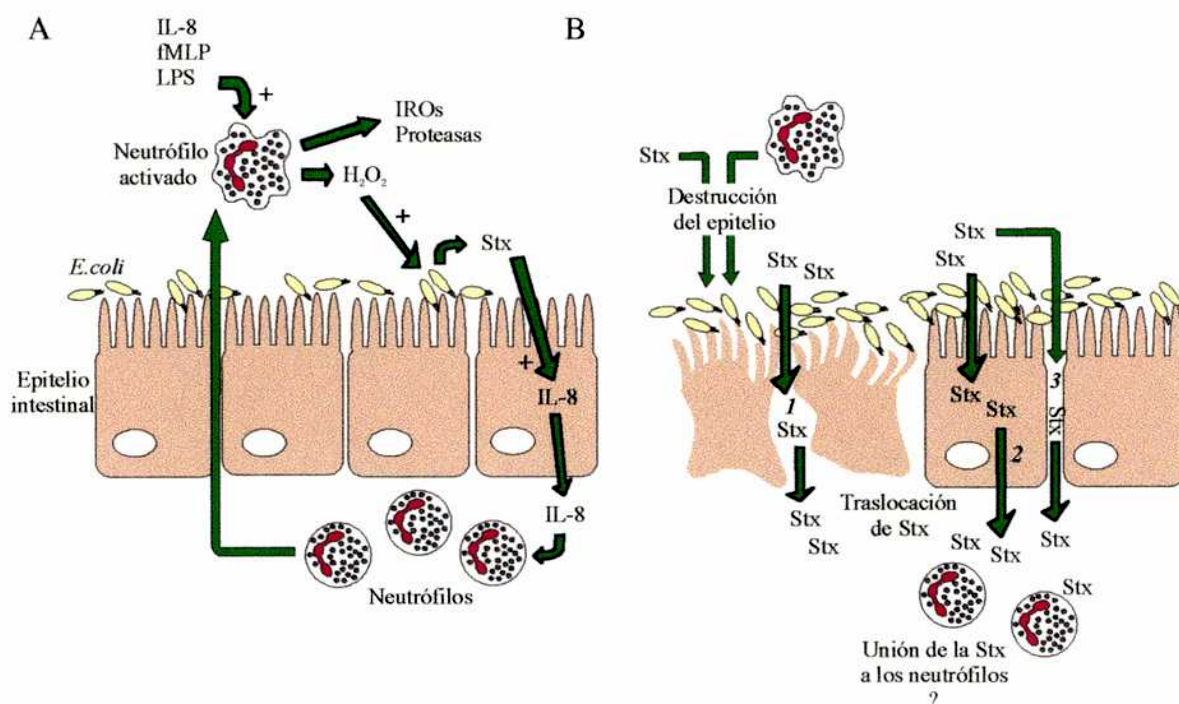


Figura 2.4. Interacción con el epitelio intestinal y translocación de la Stx. A- La Stx producida luego de infección con STEC induce la expresión de IL-8 por parte de la célula epitelial intestinal. Los PMNs son atraídos y activados por la IL-8 y generan intermediarios reactivos del oxígeno (IROs), citoquinas y proteasas. Dentro de estos compuestos el H₂O₂ induce la producción de Stx en la bacteria, lo que amplifica el sistema. B- La translocación de la Stx puede producirse por varios mecanismos: 1- La Stx o los productos derivados de los PMNs activados provocan daño al epitelio con el consecuente pasaje de la toxina; 2- Pasaje de la Stx por las células intactas; 3- Pasaje a través de las uniones celulares.

2.10.3- Transporte de la Stx en la circulación. Interacción con distintos tipos celulares.

Diversos tipos celulares tienen la capacidad de unir la Stx en receptores distintos del Gb₃. Más aún, la unión de la toxina, no siempre resulta en la internalización y muerte de la célula. Esto sugiere que la unión de la Stx a moléculas o receptores no funcionales presentes en células como los glóbulos rojos o los PMNs, podría mediar el transporte de la toxina a los tejidos blanco.

2.10.3.1- Polimorfonucleares neutrófilos (PMNs).

Los PMNs juegan un papel importante en los procesos inflamatorios y son esenciales para la defensa del huésped contra infecciones bacterianas. La capacidad tóxica de los PMNs está ligada, no sólo a su importancia como primera línea de defensa antimicrobiana, sino a efectos patológicos secundarios de destrucción celular. Estos procesos se asocian a dos mecanismos principales mediados por los PMNs: 1- el sistema NADPH oxidasa, capaz de producir intermediarios reactivos del oxígeno (IROs), cuya actividad enzimática depende del ensamble de diversas proteínas; 2- las enzimas proteolíticas presentes en gránulos intracelulares. Durante el proceso de degranulación la membrana del gránulo se fusiona con la membrana plasmática de la célula. Esto resulta por un lado, en la liberación del contenido del gránulo al exterior, y por otro en un aumento selectivo en la membrana plasmática de moléculas que se encontraban presentes en la membrana del gránulo y que, en muchos casos, son utilizadas como marcadores de activación celular. Existen distintos tipos de gránulos, cada uno con un contenido determinado de enzimas y otras proteínas. Así, los gránulos azurófilos o primarios contienen mieloperoxidasa, serina proteasas (elastasa, catepsina G, proteinasa 3), defensinas y lisozima; los gránulos específicos o secundarios son reconocidos por su contenido de lactoferrina y proteína de unión a la vitamina B₁₂ y poseen, además, el marcador de activación CD66b; los gránulos terciarios contienen gelatinasa y las vesículas secretorias fosfatasa alcalina, CD14 y el receptor tipo III para la porción Fc de las inmunoglobulinas G (FcγRIII) o CD16¹²⁰⁻¹²².

La mayoría de las evidencias que señalan a los PMNs como células importantes en la patología del D+SUH provienen de la clínica. Los pacientes presentan una marcada neutrofilia en el período agudo de la enfermedad, que ha sido asociada, en algunos estudios, a un mal pronóstico^{25,26}. Además del aumento plasmático de la IL-8 observado en los niños con D+SUH anteriormente mencionado, los niveles de la proteasa proveniente de los PMNs, la elastasa, también se encuentran aumentados en el suero de los pacientes^{27,28,42}. Esta última observación evidencia un aumento en la liberación de esta proteasa, probablemente como consecuencia de la activación de los PMNs^{29,30,123}. En concordancia con estos datos, se demostró que los PMNs de pacientes con D+SUH

presentaron una mayor adhesión a células endoteliales en cultivo, provocando daño endotelial ¹²⁴. Por otra parte, en secciones de riñón provenientes de autopsias de niños con D+SUH, se demostró la presencia de un infiltrado de PMNs por inmunohistoquímica ¹⁸.

Te Loo *et al.* describieron la unión de la Stx a PMNs no estimulados en sangre entera a través de un glicolípido distinto a los receptores actualmente conocidos (unión de baja afinidad: $K_d=10^{-8}$). Más aún, en el mismo trabajo, se demostró la transferencia de la Stx desde los PMNs hacia células endoteliales glomerulares de riñón humano ¹⁶. Estas observaciones llevaron a los autores a postular a los PMNs como posibles transportadores de la toxina en la circulación hacia los tejidos blanco, los cuales presentan receptores de alta afinidad. Los efectos directos de la Stx sobre los PMNs están empezando a ser investigados. Un estudio reportó un aumento de la producción del anión superóxido en PMNs en respuesta a la Stx. Sin embargo, en las células preincubadas con la toxina, la respuesta oxidativa y la fagocitosis se encontraron impedidas ¹²⁵. Si bien en este trabajo no se encontraron diferencias en el porcentaje de apoptosis de los PMNs tratados con la toxina, Liu *et al.* reportaron la disminución de la apoptosis en PMNs incubados en presencia de Stx *in vitro* ¹²⁶. Un aspecto interesante del papel de los PMNs en el SUH salió a la luz en un trabajo reciente, que reporta que productos de los PMNs activados (particularmente peróxido de hidrógeno) provocan un aumento de la síntesis y liberación de la Stx de la bacteria ¹²⁷. Por otra parte, tanto en conejo como en rata, se ha demostrado la infiltración de PMNs en el intestino en infecciones experimentales con STEC o por inoculación endovenosa de Stx ^{128,129}. Esto implicaría que los PMNs que arriban al lugar de la infección, una vez activados por productos bacterianos o inflamatorios, por ejemplo la IL-8 producida por las células epiteliales intestinales en respuesta a la Stx ¹¹⁷, liberarían sustancias capaces de aumentar la síntesis de Stx de la bacteria, incrementando el riesgo de desarrollar un SUH.

2.10.3.2- Monocitos

La incubación de monocitos humanos con Stx *in vitro* induce la síntesis de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 sin afectar la viabilidad o la síntesis de proteínas ¹⁵. Resultados

similares se obtuvieron en macrófagos peritoneales de ratón ¹³⁰. Por otra parte, la caracterización del receptor para la Stx en monocitos humanos demostró que el glicolípido involucrado sería diferente del Gb₃. Si bien la cantidad de receptor presente es baja en condiciones basales, la incubación de los monocitos con LPS aumenta la expresión de este receptor, efecto que desaparece cuando las células son tratadas con cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas ¹⁵. El papel de los monocitos *in vivo* en el SUH podría ser importante, ya que biopsias de pacientes revelaron la presencia de monocitos en el glomérulo ⁴⁸. La producción de citoquinas en el riñón, mediada por los monocitos, podría ser responsable de la inducción de receptores para Stx en las células endoteliales, sensibilizándolas a los efectos tóxicos de la toxina y desencadenando el fenómeno trombótico característico. Por otra parte, la depleción de macrófagos hepáticos u esplénicos en un modelo de SUH en ratón, protege a los animales de la muerte mediada por la inyección de Stx2 ¹³¹. Estos resultados sugieren que las citoquinas producidas por macrófagos en respuesta a la Stx estarían involucradas en los efectos letales de la toxina.

2.10.3.3- Plaquetas

Las plaquetas circulan en la sangre en forma inactiva y se activan rápidamente en respuesta al daño vascular localizado o a agentes liberados por el endotelio injuriado. Esta activación determina cambios estructurales y químicos en la plaqueta que llevan a la activación de las moléculas de adhesión de las mismas, la remodelación del citoesqueleto de manera de permitir la agregación, y la secreción del contenido de sus gránulos. De esta manera, las plaquetas participan en la hemostasia y trombosis al adherirse a la pared vascular injuriada para iniciar la formación del coágulo y detener el sangrado. Sin embargo, en respuesta a un estímulo patológico, la amplificación de los fenómenos de adhesión y agregación plaquetarias pueden generar trombos plaquetarios, con oclusión vascular, isquemia e infarto.

Los pacientes con D+SUH presentan trombocitopenia y defectos en la función plaquetaria, así como también niveles reducidos de moléculas presentes en sus gránulos, como ADP, serotonina y β -tromboglobulina ³¹⁻³³. Lo que aún no ha sido claramente

establecido es si este fenómeno, denominado de plaquetas exhaustas, es consecuencia directa de la Stx y central en la patogénesis del SUH o simplemente un efecto secundario al daño endotelial. Si bien diversos estudios no han encontrado una alteración de la agregación plaquetaria o de la secreción de gránulos α en respuesta directa a la Stx ¹³²⁻¹³⁴, Karpman *et al.* demostraron recientemente, que tanto la Stx como el pentámero de subunidades B, son capaces de inducir activación plaquetaria, evidenciada como formación de agregados y cambios ultramorfológicos, así como también por ensayos funcionales de unión a fibrinógeno y retención plaquetaria ¹³⁵. Por otra parte, en este mismo trabajo, se muestra por inmunofluorescencia, la capacidad de la Stx de unirse directamente a las plaquetas y de ser internalizada, aunque otros trabajos no han podido reproducir estos resultados ^{16,133}. Adicionalmente, existe cierta controversia con respecto a la presencia del receptor para la Stx en plaquetas. Mientras que Cooling *et al.* determinaron la presencia de Gb₃ y otro glicolípido (denominado banda 0.03) en plaquetas, ambos capaces de unir Stx ¹⁷, estudios recientes indican que la presencia de Gb₃ proveniente supuestamente de las plaquetas, sería realmente consecuencia de una contaminación con leucocitos ¹³⁶. Cabe destacar que los autores no descartan el hecho de que las plaquetas activadas puedan expresar Gb₃, pero por otra parte, sus resultados explicarían porqué los trabajos de Cooling *et al.* y Thorpe *et al.* encuentran que sólo una proporción de la población total de plaquetas poseen el receptor o son capaces de unir la Stx, respectivamente.

2.10.3.4- Glóbulos rojos

La presencia de glóbulos rojos crenados es característica del D+SUH. Estos eritrocitos se encuentran más susceptibles al daño oxidativo, presentan peroxidación de lípidos y disminución en la fluidez de membrana ^{137,138}. La anemia y fragmentación de eritrocitos observada en los pacientes con SUH, se asocia a lesiones que sufren estas células al pasar por zonas de la microcirculación donde el fenómeno trombótico se ha desarrollado, y donde las células endoteliales dañadas exponen o liberan sustancias que injurian la membrana de los glóbulos rojos. Por otra parte, las membranas de los eritrocitos presentan diversas combinaciones de glicolípidos capaces de unir la Stx (P1,

P^k o Gb₃, P o Gb₄), fenotipo que varía de individuo en individuo, y la unión de las distintas variantes de Stx a los glóbulos rojos ha sido demostrada *in vitro*⁹⁶. Si bien estas células no serían susceptibles a la acción tóxica de la Stx, por carecer de una activa síntesis de proteínas, se ha postulado que el fenotipo de receptores presente en los eritrocitos podría influir en la susceptibilidad individual de desarrollar D+SUH. Así, Taylor *et al.* encontraron una disminución en la frecuencia del antígeno P1 en niños que desarrollaron D+SUH, y postularon el rol protector de poseer los fenotipos asociado a la presencia de P1¹³⁹. Sin embargo, diversos trabajos posteriores no encontraron ninguna asociación protectora, de severidad o de pronóstico a largo plazo con el antígeno P1¹⁴⁰⁻¹⁴³. Sin embargo, no sólo la presencia o ausencia del receptor para Stx podría ser relevante, sino también la naturaleza de la unidad lipídica del receptor. Así, un estudio reveló que niños que desarrollaron D+SUH presentaban un menor contenido de ácidos grasos no-hidroxilados en el Gb₃ de sus eritrocitos, comparado con controles sanos o niños infectados con STEC que no desarrollaron D+SUH¹⁴⁴.

2.10.3.5- Linfocitos

Las células T parecen no estar involucradas en la toxicidad de la Stx ya que la supervivencia en ratones que carecen de células T en respuesta a la inyección de Stx no se ve afectada¹³¹.

Los linfocitos B de los centros germinales poseen el receptor para la Stx (CD77) y líneas celulares del linaje B en cultivo son sensibles a sus efectos tóxicos¹⁴⁵.

2.10.4- Interacción de la Stx con células endoteliales

El efecto de la Stx sobre las células endoteliales *in vitro* ha sido extensamente estudiado. En las células endoteliales de cordón umbilical humanas (HUVEC) la toxicidad de la Stx, medida como viabilidad o como inhibición de la síntesis de proteínas, sólo se hace evidente luego de la pre-estimulación con factores pro-inflamatorios como TNF- α , IL-1 β , LPS, o con el factor de diferenciación butirato de sodio^{20,21,146,147}. En todos los casos, la sensibilización hacia la Stx es consecuencia de un aumento de la

expresión del Gb₃, aunque los mecanismos por los cuales este fenómeno se produce parece ser diferente para los distintos factores. Si bien el LPS sensibiliza las HUVEC a través de la activación de la proteína quinasa C (PKC) clase I o II, el TNF- α y la IL-1 β actuarían por otra vía, ya que inhibidores de la PCK I o II anulan la sensibilización mediada por LPS pero no modifican los efectos del TNF- α y la IL-1 β ¹⁴⁸. Muchas de las citoquinas pro-inflamatorias actúan activando el factor de transcripción NF- κ B. Sin embargo, la inhibición de la activación del NF- κ B no altera la sensibilización de las HUVEC hacia la Stx mediada por el TNF- α , la IL-1 β o el LPS ¹⁴⁹. Por otra parte, van de Kar *et al.* demostraron que el TNF- α induce el aumento de la actividad de una galactosil-transferasa involucrada en la síntesis del Gb₃ ²¹. El efecto del butirato de sodio parece involucrar un cambio en la composición lipídica del receptor Gb₃ ¹⁵⁰. La composición de los ácidos grasos del receptor afectan la unión de la toxina por lo que además de aumentar la cantidad de Gb₃ en las HUVEC, el butirato de sodio estaría incrementando la afinidad de la Stx por su receptor.

2.10.5- Interacción de la Stx con los tipos celulares del riñón

2.10.5.1- Células endoteliales glomerulares

Si bien se suponía que los efectos de la Stx sobre células endoteliales provenientes de la microvasculatura renal podrían ser diferentes con respecto a células endoteliales de otro origen, van Setten *et al.* demostraron que las células endoteliales de glómerulo renal humano responden de la misma forma que las HUVEC ²². Es decir, este tipo celular de microvasculatura es básicamente insensible a la Stx, pero los efectos tóxicos se hacen evidentes luego de la pre-estimulación con los factores pro-inflamatorios anteriormente mencionados. Esta sensibilización también involucra el aumento del Gb₃, y es dependiente del grado de confluencia de las células, siendo las células subconfluentes las más sensibles.

2.10.5.2- Células mesangiales

Las células mesangiales constituyen un componente importante en la regulación de la homeostasis del glómerulo renal y son capaces de producir factores de crecimiento, citoquinas, prostaglandinas y radicales del oxígeno. El efecto de la Stx en cultivos puros de células mesangiales humanas demostró diversos efectos específicos en este tipo celular. Si bien la Stx no afecta la viabilidad ni induce la liberación de citoquinas o quemoquinas de estas células, tanto la síntesis de proteínas como la proliferación se encuentran inhibidas en presencia de Stx. Asimismo, el efecto de inhibición de la mitosis estaría mediado por la subunidad B de la Stx siendo independiente de la inhibición de la síntesis de proteínas. Cuando se caracterizó el receptor glicolipídico por cromatografía de capa delgada, se encontraron tres bandas, dos de las cuales están presentes en las células endoteliales glomerulares y constituyen distintas formas del Gb₃ (distintas en contenido lipídico) y una tercer banda que coincide con la encontrada en los monocitos humanos. La preincubación con TNF- α aumenta la cantidad de receptores para la Stx, así como también potencia los efectos de la Stx en la inhibición de la síntesis de proteínas y mitosis ¹⁵¹.

2.10.5.3- Células epiteliales glomerulares.

Las células epiteliales glomerulares humanas también responden a los efectos tóxicos de la Stx. Estudios de Hughes *et al.* ¹⁵² demostraron la presencia del receptor Gb₃ en este tipo celular. La incubación con la Stx por si misma, produce una marcada inhibición de la síntesis de proteínas en cultivos puros de células epiteliales glomerulares humanas, si bien el efecto en la viabilidad es menor. Por otra parte, y de la misma forma que lo observado en células endoteliales, la toxicidad de la Stx se ve incrementada al preincubar las células epiteliales glomerulares con factores como TNF- α , IL-1 β , LPS o butirato de sodio, efecto mediado por el aumento del contenido de Gb₃. Los efectos específicos de la Stx sobre la producción de citoquinas en estas células no son tan claros, ya que la Stx induce la producción de TNF- α , IL-1 β e IL-6, aunque esta producción es

imitada (incluso en mayor grado) por el inhibidor de la síntesis de proteínas cicloheximida ¹⁵³.

2.10.5.4- Células epiteliales del túbulo renal

El daño inducido por la Stx en el D+SUH se produce principalmente en el riñón, y si bien se supone que la injuria al endotelio glomerular es el principal fenómeno involucrado en la fisiopatología de la enfermedad, biopsias renales revelan un extensivo daño, asociado a apoptosis, en los túbulos proximales ^{18,19}. Estudios *in vivo* en ratones revelan la presencia de células apoptóticas en el epitelio tubular en respuesta a la infección con STEC ¹⁵⁴. Asimismo, pacientes con D+SUH presentan, tempranamente en el curso de la enfermedad, marcadores de daño tubular en la orina ¹⁵⁵ y la unión de la Stx en secciones renales de individuos normales se produce principalmente en los túbulos ^{19,98}. Esto apunta a las células epiteliales tubulares como un blanco importante de la acción de la Stx. Estudios *in vitro* revelan que la Stx es citotóxica para las células epiteliales tubulares humanas, efecto mediado por el receptor Gb₃ y acompañado por la inhibición de la síntesis de proteínas y la apoptosis ^{154,156}. Por otra parte, la incubación con Stx aumenta la liberación y niveles de mRNA del TNF- α y de la IL-1 β , aunque en el caso de la IL-1 β estos efectos serían inespecíficos, ya que también se observan con la cicloheximida ¹⁵⁷. Estos resultados indican que las células epiteliales tubulares podrían ser un temprano blanco de la Stx en el riñón y que la consecuente producción de TNF- α podría sensibilizar a las células endoteliales a los efectos tóxicos de la toxina.

2.11- Relación con otros componentes bacterianos y de la respuesta inflamatoria

2.11.1- Óxido nítrico (NO)

La producción del NO a partir de la L-arginina (L-ARG) está involucrada en diversos mecanismos homeostáticos y procesos inflamatorios. Tres enzimas diferentes son responsables de la síntesis del NO y se denominan óxido nítrico sintetasas (NOS) ¹⁵⁸.

Dos de estas isoformas se expresan constitutivamente (cNOS) y se las denominó de acuerdo al tipo celular donde fueron inicialmente encontradas: la eNOS, aislada de células endoteliales y la nNOS, presente en células neuronales. La tercer forma es inducida por estímulos inflamatorios (iNOS) y fue identificada primariamente en macrófagos ¹⁵⁹. Todas las formas de NOS sintetizan NO cuando se encuentran homodimerizadas y utilizan como cofactores el grupo hemo, la tetrahidrobiopterina, la calmodulina, las flavinas FMN y el FAD. Sin embargo, mientras que las formas constitutivas son absolutamente dependientes de Ca^{++} y generan pequeñas cantidades de NO involucradas en procesos fisiológicos, la iNOS une tan fuertemente la calmodulina que su actividad no depende del agregado de Ca^{++} , y produce grandes cantidades de NO por períodos prolongados en respuesta a estímulos inflamatorios como los LPS y las citoquinas ¹⁵⁸. La localización de las distintas formas de NOS no está restringida a los tipos celulares en los que fueron descritas inicialmente. Así, la eNOS se encuentra presente en distintas partes del cerebro de rata y en plaquetas humanas y la nNOS ha sido detectada en el epitelio bronquial tanto humano como de rata, la tráquea de rata y el músculo esquelético humano ¹⁵⁸. Por otra parte, la iNOS también se encuentra en el epitelio bronquial humano y su presencia ha sido detectada en diversos tipos celulares del riñón de rata como células mesangiales, túbulos proximales y túbulo colector ¹⁶⁰. Más aún, la administración de LPS o citoquinas como $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL1}\beta$ o $\text{INF-}\gamma$, inducen la iNOS en endotelio, células del músculo liso de rata, macrófagos y PMNs humanos, células parenquimales y mesangiales de riñón de rata ¹⁵⁹⁻¹⁶¹.

El NO posee un amplio espectro de funciones: vasodilatación, neurotransmisión, alteración de la permeabilidad vascular, y mantenimiento de las propiedades antitrombogénicas del endotelio mediante la inhibición de la agregación plaquetaria e inhibición de la adhesión de PMNs y plaquetas ³⁴⁻³⁷. Por otra parte, el NO es muy inestable y reacciona en medio acuoso con el oxígeno o sus intermediarios para generar otros radicales (NO_2), aniones más estables como nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-) u otras especies con funciones antimicrobianas. En focos inflamatorios, los intermediarios reactivos del oxígeno producidos por macrófagos o PMNs (O_2^- , H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$, HOCl) reaccionan con el NO (proveniente mayoritariamente de la iNOS) para inactivarlo o convertirlo en un producto de mayor potencia. En este sentido, el peroxinitrito (ONOO^-)

formado a partir de O_2^- y NO se descompone en $\cdot OH$ y $\cdot NO^2$, especies con alta capacidad de oxidar grupos -SH, lípidos, DNA y de nitrar tirosinas ¹⁵⁹. Estos mecanismos antimicrobianos pueden llevar al daño de las propias células, lo que confiere al NO una naturaleza dual de beneficio-perjuicio.

Los pacientes con sepsis presentan cuadros severos de hipotensión y vasodilatación con daño vascular y coagulación intravascular diseminada. Considerando que estos fenómenos podrían involucrar una hiperproducción de NO producido por la iNOS en respuesta al proceso inflamatorio asociado a la presencia de los LPS, la administración de inhibidores del NO como posible terapia podría mejorar el cuadro de los pacientes. Sin embargo, en algunos modelos experimentales de endotoxemia por inyección de LPS, si bien la inhibición del NO puede restablecer la presión sanguínea mejorando las variables hemodinámicas, los fenómenos de daño endotelial y coagulación intravascular glomerular son agravados en ausencia del NO ^{162,163}. Esto implicaría que la producción del NO, es fundamental para la protección contra la trombosis capilar glomerular en este modelo, probablemente actuando en el mantenimiento de las propiedades antitrombogénicas del endotelio. En general, se postula que la naturaleza dual del NO está asociada a una producción de NO fisiológica producida por la cNOS con efectos homeostáticos y beneficiosos mientras que grandes cantidades generadas por la iNOS pueden participar en el daño tisular. En este sentido, el tratamiento con inhibidores de la NOS reduce el grado de inflamación y daño tisular en modelos animales de inflamación aguda ¹⁶⁴, endotoxemia ^{165,166} y artritis ¹⁶⁷.

Las propiedades antitrombogénicas del NO permiten considerarlo como una alternativa clínica hipotética para el D+SUH como fue sugerido por Jaradat y Marquardt ¹⁶⁸. Estos autores propusieron que la administración de L-ARG a los pacientes podría disminuir la agregación plaquetaria y aumentar la vasodilatación disminuyendo la oclusión de los vasos y la hipertensión consecuente. Por otra parte, un estudio realizado en pacientes con D+SUH determinó que la concentración en plasma de la L-ARG se encontraba disminuida, mientras que el derivado del NO, el nitrato (NO_3^-), se encontraba aumentado. Estos valores retornaron a la normalidad luego de la recuperación clínica de los pacientes, sugiriendo la activación de la síntesis del NO en el período agudo del D+SUH ³⁸.

2.11.2- Lipopolisacáridos

Los LPS son componentes naturales de la pared de las bacterias gram negativas que acompañan a la Stx en las infecciones por STEC, y son potentes mediadores inflamatorios. Distintos tipos celulares responden a los LPS con la producción de citoquinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6 como en el caso de monocitos o células endoteliales ^{169,170}, o con la activación de mecanismos citotóxicos y secreción de proteasas e IROs en el caso de los PMNs ¹⁷¹. El rol de los LPS en el curso del SUH ha sido estudiado en ratones normales e hiporespondedores al LPS. En estos últimos, la inoculación de STEC de forma intragástrica no produjo los síntomas tempranos observados en los animales normales, lo que sugiere cierta protección a los efectos de la infección, si bien se observaron manifestaciones tardías, relacionadas con la imposibilidad de deshacerse de la bacteria ¹⁷². Por otra parte, la interacción recíproca de los efectos de los LPS y la Stx varían según el esquema utilizado. En ratones, una dosis no letal de LPS es capaz de aumentar la muerte mediada por la Stx al ser inyectada una hora antes de la toxina, mientras que un efecto protector se observa cuando los LPS son administrados más tempranamente (18 horas antes de la inoculación de la Stx) ²³. Los efectos potenciadores de la toxicidad de la Stx pueden ser interpretados como la coincidencia entre la máxima actividad inflamatoria del LPS y la injuria mediada por la Stx. En cambio, los efectos protectores podrían ser consecuencia de los efectos antagónicos entre una respuesta antiinflamatoria tardía inducida por los LPS y la toxicidad de la Stx ²³.

Por otra parte, los efectos de los LPS en la inducción del receptor de la toxina y potenciación del daño mediado por la Stx *in vitro* en distintos tipos celulares involucrados en la fisiopatogenia del SUH, ya han sido comentados. Estos efectos pueden ser directos o indirectos, como consecuencia de la producción de citoquinas inflamatorias en respuesta a los LPS.

2.12- Infecciones naturales con *E. Coli* y modelos animales de SUH.

Como fue mencionado anteriormente, en la naturaleza existen especies animales que son reservorio de distintas cepas de STEC, pero que permanecen sin síntomas de ningún tipo. Estas especies incluyen el ganado vacuno, las ovejas y las cabras ^{79,80,173}. Cabe destacar que los terneros pueden presentar, en condiciones experimentales, síntomas de tipo intestinales luego de la inoculación de bacterias productoras de Stx, con lesiones A/E y diarreas que pueden llevar a su muerte ¹⁷⁴⁻¹⁷⁶. Sin embargo, a pesar de que se ha detectado la presencia de receptores Gb₃ en los túbulos renales bovinos, este órgano no se encuentra afectado ¹⁷⁷. La susceptibilidad disminuye con la edad y los adultos permanecen sanos tras la infección ¹⁷⁴.

También se han aislado diversas STEC de animales domésticos, como perros y gatos, aunque no se ha podido asociar la infección con la presencia de diarrea u otros síntomas en estas especies ^{81,82}. Existen evidencias que sugieren que la presencia de vasculopatías idiopáticas cutáneas y en el glomérulo renal de los perros galgos, podrían estar causadas por la infección con cepas STEC.

Diversos modelos animales de SUH han sido desarrollados y aunque todos poseen sus limitaciones, permiten estudiar distintos aspectos de la patología. En todos estos modelos, la distribución del daño provocado por la Stx coincide con la localización del receptor Gb₃ en los órganos.

2.12.1- Modelo murino

El ratón es un modelo de SUH ampliamente utilizado. La inyección de la Stx por vía endovenosa provoca lesiones en el riñón, principalmente necrosis bilateral aguda en los túbulos proximales corticales ⁸⁸. A diferencia de lo que ocurre en los pacientes con D-SUH, en el ratón no se ha observado, hasta el momento, daño glomerular. Como marcadores bioquímicos de este daño renal, los ratones presentan proteinuria y niveles disminuidos de creatinina y urea en orina, y paralelamente aumento de la urea en plasma. La presencia de letargia, anuria, anorexia y deshidratación son frecuentes. Por otra parte, los síntomas neurológicos más frecuentes que se observan luego de la inoculación de Stx

incluyen: ataxia, temblores, parálisis y coma ²³. Cuando se utilizan cepas bacterianas productoras de Stx administradas en forma oral, se observan además de los mismos síntomas neurológicos, sistémicos y renales que al inyectar la toxina pura, manifestaciones gastrointestinales y fragmentación de glóbulos rojos ^{172,178}. La localización del daño renal observado en los ratones coincide con la presencia del receptor de la Stx. Extractos de lípidos separados por cromatografía de capa delgada provenientes de la corteza y médula renal de ratón revelaron la presencia de Gb₃ en ambas regiones ¹⁷⁸. Más aún, estudios de inmunofluorescencia en secciones de riñones de ratón mostraron que, tanto anticuerpos dirigidos contra el Gb₃ como la toxina, se unen con un patrón similar, correspondiente a las células epiteliales de los túbulos corticales y medulares ⁸⁸.

2.12.2- Otros modelos animales de SUH

La variante Stx2e producida por ciertas cepas STEC es la causante de una enfermedad que involucra daño vascular sistémico en cerdos pequeños, conocida como enfermedad de edema. Los síntomas clínicos de esta enfermedad incluyen diarrea no hemorrágica (no causada por la Stx2e sino por enterotoxinas termoestables de la bacteria), impedimentos neurológicos, coma y muerte. Las lesiones más características son edema en los párpados, mesenterio y tracto intestinal. Las manifestaciones renales de cualquier tipo están ausentes y se ha descrito la unión de la toxina a los glóbulos rojos ^{179,180}.

La infección con STEC o con la Stx pura en conejos produce diarrea, anorexia, parálisis y muerte. La histopatología se caracteriza por edema, hemorragias en el colon y necrosis neuronal con MAT en los órganos afectados. Sin embargo, en este modelo no se observan manifestaciones en el riñón ^{129,181,182}.

3- Materiales y Métodos



3.1- Reactivos y técnicas generales

3.1.1- Anticuerpos

Para los estudios realizados en ratón se utilizaron anticuerpos monoclonales (MoAc) de rata conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) dirigidos contra CD3, CD4, CD8 de ratón y anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón, provistos por Pharmingen (San Diego, CA, USA). El anticuerpo monoclonal anti-CD11b marcado con ficoeritrina (PE) fue provisto por Immunotech (Marseille, Francia).

Para los estudios realizados en pacientes se utilizaron los siguientes anticuerpos provistos por Caltag Laboratories (Burlingame, CA, USA): MoAc de ratón anti-FcγRII humano (CD32) (C1KM5 (IgG₁)) conjugado con PE, MoAc de ratón anti-FcγRIII humano (CD16) (3G8 (IgG₁)) conjugado con PE, MoAc de ratón contra CD11b/CD18 humano (Mac-1) (Bear-1 (IgG₁)) conjugado con FITC, MoAc de ratón anti-CD66b humano (80H3 (IgG₁)) conjugado con FITC; los controles de isotipo de IgG₁ de ratón conjugados con FITC y PE fueron obtenidos de Immunotech. El MoAc de ratón conjugado con FITC H-43-5 (IgG₁) anti-mieloperoxidasa (MPO) y el kit de permeabilización Fix & Perm fueron obtenidos de Caltag Laboratories.

Para evaluar la unión de la Stx1 y/o 2 a los PMNs humanos se utilizaron dos MoAc de ratón anti-Stx (STX2-10E11, específico para la Stx2 y STXPI-1, que reconoce ambas variantes de la toxina) (Toxin Technology, Inc., Sarasota, FL, USA) y un segundo anticuerpo de rata anti-ratón conjugado con PE (Caltag Laboratories).

Para los ensayos de citotoxicidad se utilizaron anticuerpos policlonales anti-glóbulos rojos de pollo (anti-GRP) y anti-ovalbumina (OVA) obtenidos en conejo producidos localmente^{183,184}.

3.1.2- Preparación de la Stx

La Stx1 y 2 fueron provistas amablemente por el Dr. Sugiyama Junichi de Denka Seiken CO Ltd. (Nigata, Japan). La pureza fue determinada por el proveedor mostrando un sólo pico por HPLC. La preparación de ambas variantes de la toxina fue analizada para determinar contaminación con endotoxina (LPS) por el ensayo de “*Limulus amoebocyte lysate*”, por el cual 1 IU/ml es igual a 0.1 ng/ml de LPS estándar de *E. coli*

¹⁸⁵. Los resultados de este ensayo determinaron que la preparación de toxina utilizada para los experimentos contenía menos de 40 pg LPS/ μ g de proteína de Stx.

3.1.3- Ensayos de toxicidad en células Vero

Las células Vero resultan muy útiles para el estudio de la toxicidad de la Stx debido a su alta sensibilidad a la toxina. La actividad citotóxica de la Stx1 y/o 2 en células Vero se analizó como ha sido descrito previamente ⁷. Brevemente, se crecieron las células Vero en placas de 96 pozos (25000 células Vero por pozo) con medio RPMI 1640 (Sigma) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB, GIBCO) y 1% de penicilina-estreptomicina (GIBCO). Alícuotas (100 μ l) de diluciones al medio seriadas de la preparación de Stx se adicionaron a cada pozo y se incubó por dos días a 37°C en 5% CO₂. La dosis citotóxica 50 (CD₅₀) corresponde a la dilución requerida para matar un 50% de células Vero y se determinó por tinción con cristal violeta y medición de la absorbancia resultante a 550 nm. La CD₅₀ determinada de esta forma fue de ~ 1 ng (1.4×10^{-11} M) para la Stx1 y ~ 3 ng (3.0×10^{-10} M) para la Stx2.

Para los ensayos de neutralización, la Stx1 y/o 2 (20 nM) se incubaron previamente con los anticuerpos anti-Stx correspondientes (10 μ g/ml) por 5 min a 37°C. La mezcla se adicionó a las células Vero y se procedió de la misma forma descripta para los ensayos de toxicidad.

3.1.4- Obtención de muestras de sangre

Las muestras de sangre de los pacientes fueron obtenidas por punción venosa. Antes del aislamiento de los PMNs por gradiente de Ficoll-Hypaque, se separaron 400 μ l para realizar los estudios de citometría de flujo en sangre entera.

Las muestras de sangre de ratones fueron obtenidas por punción del plexo retroorbital en tubos de plástico heparinizados a distintos tiempos después de la inoculación de la Stx2 u otros tratamientos.

3.1.5- Recuento y fórmula de leucocitos de sangre periférica

El recuento total de leucocitos fue determinado en una cámara de Neubauer luego de diluir la sangre en una solución de 2% de ácido acético. Adicionalmente, se cuantificó el porcentaje de PMNs en frotis de sangre teñidos con May-Grünwald/Giemsa. Este porcentaje fue confirmado por citometría de flujo.

3.1.6- Aislamiento de PMNs

Tanto en los estudios realizados con ratones o pacientes los PMNs se aislaron por centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque (densidad utilizada para aislar PMNs humanos = 1,077 g/L y para PMNs de ratón = 1,090 g/L) (Ficoll Pharmacia, Uppsala; Hypaque, Winthrop Products, Buenos Aires, Argentina) y posterior sedimentación en dextrán 6% (Sigma), como ha sido descripto previamente ¹⁸⁶. Los eritrocitos contaminantes fueron removidos mediante una lisis hipotónica. Luego de un lavado, las células (>96% de PMNs en preparados teñidos con May-Grunwald/Giemsa) se resuspendieron en medio RPMI 1640 suplementado con 4% de SFB.

3.1.7- Citometría de flujo

La medición de la expresión en membrana de los marcadores de sangre periférica de ratón se realizó por inmunofluorescencia directa en un citómetro de flujo. Luego de la obtención de la sangre, los eritrocitos de los diferentes grupos de ratones fueron lisados por un shock hipotónico, las células lavadas con PBS e incubadas con los MoAc (2 µg/ml para 1×10^6 células) por 30 min a 4°C. Luego de dos lavados con PBS las células se resuspendieron en 0.4 ml de ISOFLOW (International Link, S.A., Buenos Aires, Argentina) y la fluorescencia se midió en un citómetro de flujo Beckton Dickinson FACScan. El análisis se realizó sobre 10000 eventos para cada muestra utilizando el programa Cell Quest (Becton Dickinson).

La expresión de los receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas G (FcγRs), FcγRI, FcγRII y FcγRIII (CD64, CD32 y CD16, respectivamente), CD11b (Mac-1) y CD66b en los PMNs de pacientes con D+SUH y los distintos grupos controles se realizó por inmunofluorescencia directa por citometría de flujo incubando

100 μ l de sangre entera con los anticuerpos específicos 30 min a temperatura ambiente¹⁸⁷. Los controles de isotipo se ensayaron en paralelo. Luego de la incubación, los eritrocitos se lisaron usando la solución de lisis FACS (Becton Dickinson, Immunocytometry System, San Jose, CA) y luego de dos lavados las células se resuspendieron en 0.3 μ l de ISOFLOW. La fluorescencia se midió en el citómetro de flujo y el análisis se realizó en 100000 eventos para cada muestra.

3.1.8- Citotoxicidad dependiente de anticuerpos (CCDA)

Los PMNs purificados de ratones o pacientes se resuspendieron a una concentración de 1×10^6 o 2.5×10^6 células/ml, respectivamente, en medio RPMI 1640 suplementado con 2% de SFB y 50 μ g/ml de gentamicina (Sheering Corporation ESSEX, Argentina). La viabilidad de estas suspensiones celulares (las cuales contenían >97% de PMNs) fue siempre mayor del 90% por el test de exclusión del colorante vital azul tripán. La CCDA se realizó con el sistema de glóbulos rojos de pollo (GRP)-anti-GRP como se ha descripto previamente¹⁸⁸. La reacción se llevó a cabo colocando 100 μ l de las suspensiones de PMNs con 2×10^5 de GRP marcados con ^{51}Cr y sensibilizados con cantidades subaglutinantes de un anticuerpo (IgG) de conejo específico. Luego de una incubación de 18 horas a 37°C, la placa se centrifugó y se midió la radioactividad en los sobrenadantes y pellets. La media del ^{51}Cr liberado se expresó como el porcentaje de radioactividad total. La liberación espontánea fue en todos los casos menor al 5%, y se sustrajo para obtener los valores de citotoxicidad específica, arrojando los valores representados en los gráficos.

3.1.9- Citotoxicidad dependiente de intermediarios reactivos del oxígeno (IROs) desencadenada por complejos inmunes

Los PMNs de pacientes con D+SUH fueron resuspendidos a una concentración de 2.5×10^6 células/ml en medio RPMI 1640 suplementado con 2% de SFB. Cien microlitros de esta suspensión fue incubada con 20 μ g de complejos inmunes precipitantes, formados con OVA y su anticuerpo específico (IgG) de conejo. Luego, se adicionaron 20 μ l de eritrocitos marcados con ^{51}Cr (2.5×10^5) no sensibilizados¹⁸⁹ y se incubó 18 hs a 37°C en 5% CO_2 , tras

lo cual la placa se centrifugó y se midió la radioactividad en los sobrenadantes y pellets en un contador gamma. Se determinó la media de los triplicados del ^{51}Cr liberada a los sobrenadantes y se expresó como el porcentaje de radioactividad total. A este valor se le sustrajo la liberación espontánea en ausencia del complejo, que en todos los casos fue menor al 3%.

3.2- Estudios en ratones

3.2.1- Animales

Los ratones de la cepa BALB/c fueron criados en el bioterio del Departamento de Medicina Experimental de la Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires. Para la totalidad de los experimentos se utilizaron ratones machos de 8-16 semanas de edad y de entre 20-24 g de peso. Los animales fueron mantenidos en un ciclo de luz-oscuridad de 12 hs a una temperatura de $22\pm 2^\circ\text{C}$ y alimentados con una dieta estándar y agua *ad libitum*. Los experimentos fueron realizados siguiendo los principios de la "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (National Institute of Health, 1985).

3.2.2- Estudios in vivo

3.2.2.1- Tratamiento con Stx2

Se utilizó la misma preparación de Stx2 en todos los experimentos. En trabajos previos ^{23,131}, se evaluó la letalidad de la toxina *in vivo* por inyección endovenosa de diluciones seriadas de Stx2 en solución salina estéril y libre de pirógenos. De esta forma se determinó la dosis que induce una mortalidad de $\geq 50\%$ (LD50) entre los 3 y 4 días luego de la inyección. Esta dosis corresponde a 50 ng/kg (aprox. 1 ng/ratón) y fue la utilizada para los experimentos.

3.2.2.2- Tratamiento con endotoxina

Se utilizó un mismo lote de LPS de *E. coli* 0111:B4 comercial (Sigma), el cual poseía una LD₅₀ de 150 μg /ratón. Inmediatamente antes de ser inyectada a los animales, se preparó la concentración deseada de LPS (5 μg /ratón) en solución salina estéril y libre

de pirógenos. Los ratones fueron inyectados por vía intraperitoneal una hora antes de la inyección endovenosa con 1 ng de Stx2²³.

3.2.2.3- Modulación de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS)

Se utilizaron los siguientes inhibidores de la NOS: N^G-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA), inhibidor de las formas inducible y constitutiva de la NOS (iNOS y cNOS); aminoguanidina (AG, Sigma), 100 veces más específico que el L-NAME para la iNOS; L-N6-(1-imino-etil)-lisina (L-NIL, Calbiochem-Novabiochem Corp, San Diego, CA, USA) inhibidor altamente específico de la iNOS. En algunos estudios se incluyó el D-NAME, forma no activa del L-NAME (Sigma) y el sustrato fisiológico de la NOS, la L-arginina (L-ARG, Sigma). Las soluciones fueron preparadas cada dos días y administradas en el agua de bebida *ad libitum*. Las concentraciones finales utilizadas fueron: L-NAME y D-NAME: 1 mg/ml; AG: 100 µg/ml; L-NIL: 10 mM; L-ARG: 10 mg/ml. Los tratamientos con los inhibidores se iniciaron 24 hs antes de la inyección con la Stx2 y se mantuvieron hasta el final de los experimentos. Como se ha descrito anteriormente, estos tratamientos no inducen variaciones significativas en la actividad de la NOS determinada como producción de óxido nítrico¹⁹⁰⁻¹⁹².

3.2.2.4- Estudios de depleción

3.2.2.4.1- Obtención de anticuerpos policlonales anti-plaquetas

(anti-plq) y anti-PMNs (anti-PMN) de ratón en conejo.

Los plasmas ricos en plaquetas (PRPs) se obtuvieron de ratones controles BALB/c por centrifugación de la sangre a 300g por 20 min a temperatura ambiente y la suspensión fue lavada dos veces. Se realizó un esquema de inmunización en conejos adultos que consistió en 4 dosis endovenosas de 1×10^9 plaquetas cada una a los días 1, 10, 20 y 30. Al día 40, los conejos fueron sangrados por corte en la vena marginal de la oreja y el suero fue separado y guardado a -20°C.

Los PMNs se aislaron de ratones normales como se indicó anteriormente y se siguió el mismo esquema de inmunización utilizado para la obtención de anticuerpos anti-plq de ratón en conejo.

3.2.2.4.2- Tratamiento con los anticuerpos anti- plq y anti-PMN

En experimentos preliminares se determinó que una dosis intraperitoneal de 100 μ l de una dilución 1/2 del antisuero de conejo anti-plq de ratón inducía, 4 hs post-inyección, una depleción casi completa de las plaquetas en los ratones (N° plaquetas $\times 10^3/\mu$ l: control: 899 ± 15.0 ; tratado con antisuero: 7 ± 0.2). Para mantener esta depleción a lo largo de todo el experimento se inyectó el antisuero 4 hs antes de la Stx2 y luego se lo aplicó cada 12 hs.

En el caso de la depleción de PMNs se determinó que 100 μ l del antisuero puro anti-PMNs provocaba una reducción del 76% en la población de PMNs de los ratones 4 hs post-inyección. También se observó una pequeña disminución en la población mononuclear. Para mantener esta depleción a lo largo de todo el experimento se inyectó el antisuero 4 hs antes, en el momento de inyectar la Stx2 y luego cada 12 hs.

En todos los experimentos para los animales controles (grupo Stx2 solo) se utilizó el mismo esquema de inyecciones repetidas pero administrando un suero de conejo normal.

3.2.2.5- Estudios de migración

Las células peritoneales de los animales del grupo control y el grupo Stx2 se obtuvieron inyectando 2 ml de una solución de tioglicolato (TG) al 3% en PBS en la cavidad peritoneal. Luego de un período de 4 hs se mataron los animales y se introdujeron 2 ml de medio RPMI en la cavidad peritoneal, se masajeó gentilmente y el medio fue recolectado. La suspensión se lavó y el número de PMNs totales se contó en cámara de Neubauer.

3.2.3- Estudios ex vivo

3.2.3.1- Obtención de células de médula ósea

Los animales se mataron con una sobredosis de éter inmediatamente después de ser sangrados. Las células de médula ósea del fémur derecho se eluyeron con 2 ml de medio RPMI 1640 suplementado con 2% de SFB. La suspensión celular se centrifugó en una cito-centrífuga y en los preparados obtenidos se analizó el porcentaje de células positivas para la enzima MPO por inmunohistoquímica, utilizando un anticuerpo específico y un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa. Se determinó el número de células positivas por cada 100 células de médula ósea al microscopio óptico. La actividad de la MPO fue evaluada paralelamente como se describe en el punto siguiente.

3.2.3.2- Determinación de la actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO) en médula ósea y pulmón

La actividad de la MPO en el pulmón o médula ósea se determinó siguiendo un método descrito previamente con algunas modificaciones¹⁹³. En el caso del pulmón, se realizó previamente un lavado para descartar la sangre circulante de los vasos sanguíneos. Los animales se anestesiaron con embutal, se cortó la arteria hepática y 2 ml de solución salina se perfundió a través del seno retroorbital. Los pulmones se extrajeron, se secaron con gasa para remover los restos de sangre y se disgregaron en un tamiz hasta obtener una suspensión celular homogénea. Las células se lavaron y resuspendieron en 200 μ l de PBS suplementado con Ca^{2+}Cl (1mM)/ Mg^{2+}Cl (1mM) y Tritón X-100 (2%). Luego de dos ciclos de congelado-descongelado las muestras fueron centrifugadas a 1000 g por 10 min. Los sobrenadantes obtenidos (100 μ l) se colocaron en microplacas de 96 pozos con un volumen igual del sustrato para la MPO (0.35 mg/ml de o-fenilenediamina en buffer citrato/fosfato con 12% de H_2O_2). Luego de una incubación de 15 min a 37°C, la reacción se detuvo agregando 100 μ l de H_2SO_4 2M. La actividad de la enzima MPO se determinó por absorbancia a 490 nm en un lector de placas (Organon Tecnika, Argentina). Para el caso de la médula ósea los resultados fueron expresados cada 10^6 células.

3.2.3.3- Medición de urea en plasma

La determinación bioquímica de urea en plasma se realizó en un espectro CCX (ABBOTT Diagnostic System, Buenos Aires, Argentina) siguiendo instrucciones estandarizadas.

3.2.3.4- Determinación de óxido nítrico (NO) en plasma

Para cuantificar la producción de NO se utiliza la concentración plasmática de los aniones derivados del NO, nitrito y nitrato (NO_2^- y NO_3^-). Para ello se utilizó un kit comercial (R & D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) que determina la cantidad total de NO basado en la conversión enzimática de nitrato a nitrito por la acción de la nitrito-reductasa. El producto de esta reacción se detectó colorimétricamente a 540 nm utilizando la reacción de Griess (50 μl de muestra más un volumen igual del reactivo de Griess: 1% sulfanilamida-0.1% dihidrocloruro de naftiletildiamina -2.5% H_3PO_4).

3.2.3.5- Obtención y recuento de plaquetas de sangre periférica.

La sangre de cada ratón fue obtenida por punción del plexo retroorbital en un tubo de polietileno conteniendo citrato de sodio 3.8% p/v en agua (1 parte de citrato de sodio cada 9 de sangre). Los plasmas pobres (PPPs) y ricos en plaquetas (PRPs) se obtuvieron por centrifugación de la sangre a 1000g por 20 min a 4°C o a 300g por 20 min a temperatura ambiente, respectivamente. Para determinar el número de plaquetas se realizó una dilución 1/20 de los PRPs en solución fisiológica y se realizó el recuento en cámara de Neubauer.

3.2.3.6- Estudios de agregación plaquetaria.

La cantidad de plaquetas de los PRPs se equiparó en los grupos control y experimental a 1.5×10^5 células/ μl con el agregado de los PPPs autólogos. Los estudios de agregación se realizaron con un lumi-agregómetro Chrono-log [Ca²⁺]. Brevemente, se adicionaron 450 μl de PRP a una cubeta de vidrio con constante agitación y se dejó estabilizar a 37°C antes del agregado del agonista. La transmitancia se ajustó a 10% para

los PRPs y a 90% para los PPPs. A tiempo cero se adicionaron 50 μ l del agente agregante. La agregación plaquetaria se evidencia en un aumento de la transmisión de la luz y una deflexión hacia arriba de la curva registrada. Los estímulos agregantes utilizados fueron adenosina difosfato (ADP, Sigma) y ácido araquidónico (AA, Sigma), los cuales fueron disueltos en solución salina y llevados a una concentración final de 2.5 μ M y 0.5 mM, respectivamente. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de agregación considerando como 100% aquella obtenida para los animales del grupo control.

3.2.3.7- Estudios de degranulación de plaquetas en ratón.

La tinción con mepacrina determina el contenido de ADP presente en los gránulos intracelulares de las plaquetas ¹⁹⁴. Brevemente, los PRPs se incubaron a 3°C en oscuridad por 30 min con 0.1mmol/L de mepacrina (Sigma). Luego de tres lavados con el buffer CGS (0.109 mol/L citrato trisódico, 30 mmol/L glucosa, 0.15 mol/L cloruro de sodio) las plaquetas se resuspendieron en CGS buffer a una concentración de 2×10^7 células/L. El contenido de mepacrina de las plaquetas se determinó por citometría de flujo (rango de emisión de la mepacrina: 520-530 nm). La población de plaquetas fue definida por su posición específica en el gráfico de tamaño (FSC) versus complejidad (SSC) y se determinó el porcentaje de células positivas para mepacrina, considerando la autofluorescencia como control negativo.

3.2.4- Estudios histológicos en riñón

3.2.4.1- Procesamiento del tejido y tinciones de rutina

Los animales de los distintos grupos experimentales fueron sacrificados a las 72 hs luego de la inyección de la Stx2. Se extrajeron ambos riñones de cada ratón (ocho por grupo) y se cortaron longitudinalmente. Luego de la fijación con formalina al 10%, el tejido se embebió en parafina y se seccionó. Estas secciones fueron teñidas con hematoxilina y eosina (H-E) y el ácido periódico de Schiff (PAS) y examinadas por microscopía óptica. Se evaluó la injuria glomerular por la presencia de hiper celularidad mesangial, retracción glomerular y trombosis; para determinar la injuria tubular se

examinó la presencia de alteraciones en el epitelio tubular, la integridad de la membrana basal y la necrosis. Asimismo, se registró la presencia de congestión vascular intersticial.

3.2.4.2- Inmunohistoquímica para fibrinógeno

Para determinar la presencia de trombos en el tejido renal de los distintos grupos experimentales, se realizó una inmunomarcación para fibrinógeno en secciones de riñón. Para ello se utilizó un anticuerpo específico de conejo anti-fibrinógeno humano (1:50; DAKO Corp., CA, USA) que presenta reacción cruzada para el fibrinógeno de ratón. La peroxidasa endógena se bloqueó con 0.5% de peróxido de hidrógeno y la detección se realizó con un kit comercial (DAKO LSAB 2-System HRP-DAB). Luego de efectuar una coloración de contraste con hematoxilina se determinó el número de glomérulos positivos para fibrinógeno en un total de 100 glomérulos y se expresó el resultado como porcentaje.

3.3- Estudios en humanos

3.3.1- Pacientes

3.3.1.1- Características generales de los pacientes y controles

Se estudiaron 12 niños con diagnóstico de D+SUH tratados en el Hospital Nacional de Pediatría “Juan P. Garrahan”, Buenos Aires y 15 provenientes del “Hospital del Niño” de San Justo. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de ambos Hospitales y todos los pacientes fueron incluidos luego de haberse obtenido el consentimiento de sus padres. Los criterios de diagnóstico fueron anemia hemolítica microangiopática con presencia de esquizocitos, trombocitopenia (recuento de plaquetas $<170 \times 10^9/L$) y daño renal agudo (niveles de creatinina en suero $>106.0 \mu\text{mol/L}$). Todos los pacientes desarrollaron D+SUH luego de un cuadro de gastroenteritis con diarrea sanguinolenta, (entendiéndose por diarrea más de tres deposiciones por día en el lapso de dos días como mínimo). Si bien dos de los pacientes no presentaron todos los criterios anteriormente mencionados en el momento de obtención de la muestra (pacientes 12 y 14), de ambos se aisló la cepa *E. coli* O157:H7 productora de Stx, y por lo tanto fueron incluidos en el estudio. En catorce de los 27 pacientes se encontró *E. coli* O157 productora de Stx, diagnosticado por cultivo de materia

fecal, y/o anticuerpos anti-Stx en suero. El rango de edades se encontraba entre los 10 meses y 7 años, presentándose 13 mujeres y 14 varones. Las muestras de sangre fueron tomadas antes de la diálisis y/o transfusión, en distintos días luego del inicio de la diarrea, y la mayoría de ellos fueron dializados dentro de las 24 horas desde la admisión. Uno de los niños murió luego de 15 días de internación, y en algunos casos se obtuvo una segunda muestra de sangre tomada luego de un mes del período agudo. Los datos clínicos y bioquímicos en el momento de la toma de muestra de los pacientes se detallan en la **Tabla 3.3.1**. Se indican los parámetros más relevantes de la función renal y aquellos importantes para nuestro estudio.

Debido a que el estudio con los PMNs se llevó a cabo dentro de las dos horas desde el momento de la extracción, no se disponía en el momento de chicos controles, por lo que para cada muestra se llevó un control voluntario adulto del Departamento de Hemostasia de la Academia Nacional de Medicina que fue procesado y analizado en paralelo. En el protocolo ensayado se incluyeron tres grupos controles adicionales, cuyas muestras de sangre fueron procesadas de igual forma:

- (1) niños sanos (S) admitidos para cirugías de rutina no relacionadas con procesos infecciosos, con parámetros hematológicos y renales normales;
- (2) niños con daño renal crónico y concentraciones elevadas de urea y creatinina en suero (U) cuyas edades estaban comprendidas entre 12 meses y 6 años. Los niveles séricos de urea y creatinina se encontraban entre 13.2 a 29.3 mmol/L y 132.6 a 539.2 μ mol/L, respectivamente;
- (3) niños con neutrofilia (N) por estar cursando alguna infección aguda no relacionada con el D+SUH. Sus edades estaban comprendidas entre los 6 meses y 10 años. Sus niveles de leucocitos periféricos se encontraban entre 12 y 40×10^9 células/L, y el porcentaje de PMNs era mayor del 75%. El recuento plaquetario, urea, creatinina y hematocrito se encontraban entre los valores normales.

Todos los ensayos no pudieron realizarse en todos los pacientes ya que el volumen de sangre obtenido resultaba limitante. Debido a que el número de individuos varía en los distintos ensayos realizados, el mismo se especifica en la sección de resultados en la leyenda de cada figura.

Tabla 3.3.1
Datos clínicos y bioquímicos de los pacientes con D+SUH

Paciente	Edad (meses)	Sexo	Inicio de la diarrea*	Duración de (días)		Días de diálisis	RLT* $\times 10^9/L$	% PMN	Plaquetas $\times 10^9/L$	Urea mmol/L	Creatinina $\mu\text{mol/L}$
Diarrea Anuria											
1	12	M	2	7	7	9	18.3	55	100	25.2	468.5
2	32	M	2	8	6	6	12.8	76	40	18.7	406.6
3	16	M	3	5	4	3	18.9	53	54	38.7	486.2
4	84	M	2	4	1	1	21.4	76	19	23.5	433.2
5	10	F	6	7	15	13	19.1	70	32	30.3	265.2
6	44	F	3	8	No	No	11.8	67	40	16.8	238.7
7	20	F	5	5	22	26	19.7	75	106	46.5	548.1
8	32	F	5	9	No	No	21.1	71	65	18.5	389.0
9	37	M	5	6	15	18	13.7	69	46	52.2	574.6
10	18	F	4	7	9	11	25.9	64	80	29.2	397.8
11	73	F	5	6	No	No	12.1	60	62	36.3	300.6
12	14	F	11	6	No	No	9.1	32	138	9.2	61.9
13	31	M	n.d.	n.d.	n.d.	No	13.6	50	143	n.d.	256.6
14	13	M	n.d.	n.d.	n.d.	6	23.5	72	214	19.0	274.3
15	13	M	3	5	3	4	11.2	52	n.d.	14.3	381.4
16	27	F	3	8	2	No	16.5	52	69	17.0	283.2
17	18	M	3	4	5	2	10.4	68	95	23.0	486.7
18	54	F	2	2	30	23	32.4	66	97	29.0	424.7
19	29	M	n.d.	n.d.	n.d.	2	17.7	81	170	21.1	539.8
20	10	M	2	2	1	No	52.2	80	167	15.5	221.2
21	30	F	3	5	13	12	27.0	85	23	14.0	230.0
22	9	M	3	5	13	17	22.8	75	19	20.0	610.0
23	29	F	5	6	7	8	13.6	60	50	24.6	579.0
24	36	F	3	5	2	No	13.9	60	90	14.6	513.0
25	27	M	1	1	2	No	15.4	63	65	23.3	274.3
26	36	F	6	7	No	No	14.1	58	29	23.3	151.3
27	24	M	4	n.d.	n.d.	5	27.0	86	16	18.0	318.0
Media	29		4	6	7	6	19.0	65	78	23.9	370.7
Rango	(9-84)		(1-11)	(2-9)	(0-30)	(0-26)	(9.1-32.0)	(32-86)	(16-214)	(9.2-52.2)	(61.9-579.0)

*Días que pasaron desde el inicio de la diarrea hasta el momento de la obtención de la muestra.

*RLT, recuento de leucocitos totales; n.d.: no determinado

3.3.1.2- Degranulación de los PMNs en pacientes con D+SUH.

La expresión de la MPO total (expresión total y contenido intracelular) fue utilizada como un indicador de la degranulación de los PMNs ¹²¹. La sangre fue procesada siguiendo las instrucciones del reactivo de permeabilización Fix & Perm (Caltag Laboratories). Brevemente, se incubaron 100 µl de sangre con el reactivo de fijación por 15 min, se realizó un lavado con PBS, y se incubó por 15 min con el reactivo de permeabilización y el anticuerpo específico. Este procedimiento permite la entrada del anticuerpo a la célula dejando la morfología de la misma intacta ¹⁹⁵. El respectivo control de isotipo fue ensayado en paralelo. Luego de un lavado con buffer fosfato salino (PBS) las células se resuspendieron en 0.3 µl de ISOFLOW. La fluorescencia fue medida por citometría de flujo.

3.3.1.3- Medición del aumento en membrana de los marcadores CD11b y CD66b (respuesta de degranulación) en respuesta a la estimulación con distintas citoquinas: TNF- α , IL-8 y G-CSF.

Cien microlitros de sangre entera fueron incubados con 50 pg/ml de TNF- α , 100 ng/ml de IL-8 y 10 ng/ml G-CSF. Para elegir la concentración y tiempo óptimo de respuesta para cada citoquina se realizaron previamente curvas utilizando PMNs de dadores adultos normales. Para evaluar la sobre-expresión de los marcadores se incubó la sangre con las distintas citoquinas por 30 min para el CD11b y por 2 hs para el CD66b a 37°C en 5% CO₂. Transcurrido ese tiempo, la sangre fue colocada a 4°C e incubada con el anticuerpo específico por 30 min, los eritrocitos lisados con la solución de lisis FACS y la fluorescencia evaluada por citometría de flujo. Los resultados se expresaron como el aumento respecto del basal (sin citoquinas), donde un valor de 1 significa ausencia de cambios.

3.3.2- Estudios *in vitro* en PMNs humanos de dadores normales adultos

3.3.2.1- Efectos directos de la urea

La sangre de controles sanos adultos se preincubó con 33.4 mmol/L de Urea (Biopack, Sistemas Analíticos, Buenos Aires, Argentina) a 37°C en 5% CO₂ por cuatro horas. Luego se tomó una alícuota para evaluar los parámetros fenotípicos en sangre entera y el resto se procesó para obtener los PMNs y realizar estudios funcionales de la manera descripta para los pacientes.

3.3.2.2- Efectos directos de la Stx

Dadores voluntarios adultos se utilizaron para evaluar los efectos *in vitro* de la Stx1 y 2 sobre los PMNs humanos. Los PMNs fueron aislados e incubados a una concentración de 2×10^6 células/ml por distintos tiempos (20 min, 2, 6 y 24 hs) con diferentes concentraciones de Stx. La concentración máxima utilizada fue de 1×10^{-7} M, la cual corresponde al valor del K_d reportado para la unión de la Stx-FITC a PMNs humanos¹⁶. Luego de la incubación, las células fueron centrifugadas y los sobrenadantes colectados para evaluar la cantidad de toxina no unida en ensayos de citotoxicidad en células Vero. Los PMNs fueron lavados, y se determinaron distintos marcadores de activación (FcγRIII, CD66b, CD11b y MPO) por citometría de flujo. Por otra parte, la unión de la Stx1 y 2 a los PMNs se determinó por citometría de flujo por inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos anti-Stx (10 µg/ml) y un segundo anticuerpo anti-ratón conjugado con PE. En experimentos adicionales se preincubaron los PMNs en placas de 24 pozos cubiertas con fibrinógeno (250 µg/ml) o con TNF-α o LPS (100 ng/ml y 1 µg/ml, respectivamente) por 30 min a 37°C; luego se adicionó la Stx2 y se incubó durante distintos tiempos, transcurrido el cual se analizaron los mismos parámetros.

El porcentaje de apoptosis de PMNs incubados por 24 hs con Stx2 (1×10^{-7} M) a 37°C en 5% CO₂, fue medido como se indica a continuación.

3.3.2.3- Cuantificación de la apoptosis de PMNs por tinción con Ioduro de Propidio

La proporción de PMNs que muestran un pico de DNA hipodiploide, el cual representa las células apoptóticas, se determinó luego de 24 hs de incubación con la Stx2. Las células se lavaron, resuspendieron en buffer 0.1% citrato de sodio, 0.1% Tritón X-100 con 50 µg/ml de Ioduro de Propidio y se incubaron 30 min a 4°C. La fluorescencia roja de los núcleos individuales se midió por citometría de flujo. El pico de fluorescencia rojo perteneciente a los PMNs con contenido de DNA normal (diploide) fue ubicado en el canal 250 de la escala logarítmica. Los núcleos apoptóticos emitieron fluorescencia entre los canales 4-200.

3.4- Estadística

Los datos se expresaron como la media $\pm$ el error estándar (ES). Para los experimentos con animales las diferencias se analizaron usando un análisis de varianza (ANOVA). Los grupos individuales se compararon usando un test de t de Student, no pareado. Para el análisis estadístico de los resultados con pacientes se utilizó el test no paramétrico Mann-Whitney no pareado. Para la evaluación de los parámetros bioquímicos e inmunológicos se utilizó el test de correlación de Spearman's, no paramétrico de dos colas no pareado. En todos los casos, un $p < 0.05$ fue considerado significativo.

4- Resultados



4.1- Estudio de la importancia de los neutrófilos (PMNs) en el modelo murino de SUH.

4.1.1- Efecto de la Stx2 en leucocitos circulantes

La neutrofilia es una característica común de los cuadros de D+SUH, así como también de otras infecciones bacterianas. Sin embargo, a diferencia de otras infecciones, en el D+SUH la neutrofilia está asociada a un mal pronóstico ^{25,26}. El efecto directo de la Stx sobre el número absoluto y el porcentaje de leucocitos en circulación no se ha podido determinar en humanos, ya que los LPS (componente principal de la pared de las bacterias gram negativas) acompaña las infecciones naturales asociadas con el desarrollo del SUH. Sin embargo, el modelo murino permite investigar la influencia de la Stx pura en las poblaciones leucocitarias, independientemente de los posibles efectos de los LPS.

Trabajos anteriores de nuestro grupo han demostrado que la inyección endovenosa de 1 ng de Stx2 en ratones provoca síntomas neurológicos, seguidos de coma y muerte a los 3 a 4 días luego de su inoculación ^{23,131}. Por este motivo, ratones inyectados con la misma cantidad de toxina, fueron sangrados 72 hs post-inoculación para realizar un recuento absoluto y diferencial de los leucocitos periféricos. En comparación con el grupo control inoculado con solución salina, los animales tratados con la Stx2 presentaron un leve aumento en el número total de leucocitos circulantes. Cuando se analizaron las distintas poblaciones por recuento diferencial, se encontró que el número de células mononucleares disminuyó, mientras que la población de PMNs se incrementó significativamente (Tabla 4.1.1).

Tabla 4.1.1. Número absoluto y relativo de leucocitos en sangre periférica

	Leucocitos (cél/mm ³) media +ES	PMNs (cél/mm ³) media +ES	Células mononucleares (cél/mm ³) media +ES
Control (n=16)	9257 ± 512 (100%)	3706 ± 625 (40%)	5551 ± 401 (60%)
Stx2 (n=16)	10328 ± 1078 (100%)	7363 ± 669 (71%)*	2965 ± 452 (29%)*

Los animales fueron sangrados 72 hs luego de la inyección de la Stx2, y se realizó un recuento diferencial en cámara de Neubauer. El porcentaje de PMNs y células mononucleares se encuentra expresado entre paréntesis. *p<0.05 comparado con el grupo control.

Con el fin de evaluar los cambios en las poblaciones leucocitarias, se analizó el porcentaje de células B y T en circulación, así como también las poblaciones CD4+ y CD8+, por citometría de flujo 72 hs luego de la inoculación con la Stx2. Aunque se observó una pequeña disminución en el número de células positivas para inmunoglobulinas de superficie (marcador de células pertenecientes al linaje B), no se encontraron diferencias significativas en las poblaciones B o T, CD4, CD8, entre el grupo control y el inoculado con la Stx2. Nuevamente, el número de células positivas para el marcador del linaje mieloide CD11b, se encontró aumentado significativamente en los ratones inoculados con la Stx2 (**Figura 4.1.1**).

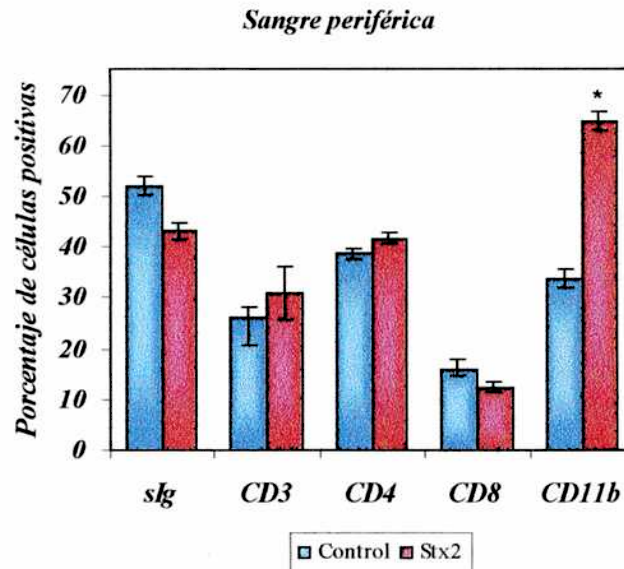


Figura 4.1.1. Porcentaje de leucocitos periféricos. Luego de la inyección con la Stx2 los animales fueron sangrados y los eritrocitos lisados. 100 μ l de sangre fueron incubados con los MoAc dirigidos contra distintos marcadores de leucocitos. Cada barra representa la media aritmética $\pm$ ES del porcentaje de células positivas (n= 7 ratones). * $p < 0.05$ comparado con el grupo control.

Por otra parte, debido a que durante el desarrollo de una respuesta inmune pueden existir alteraciones en las poblaciones leucocitarias en los órganos linfáticos, se estudiaron los mismos marcadores en el bazo de ratones tratados con la Stx2, 72 hs luego de la inoculación (**Figura 4.1.2**). No se encontraron diferencias para los marcadores ensayados, si bien existe un leve aumento del marcador CD11b en los animales inoculados con la Stx2.

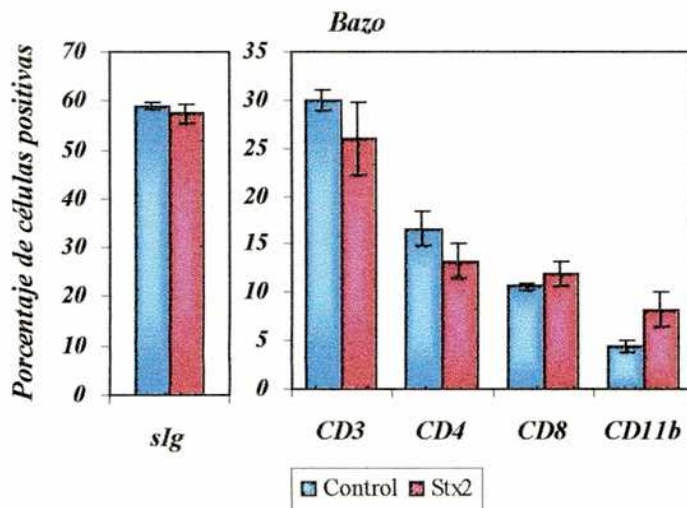


Figura 4.1.2. Porcentaje de leucocitos en bazo. Luego de la inyección con la Stx2 se extrajeron los bazos de los animales el tejido se disgregó. 2×10^6 células fueron incubadas con los MoAc dirigidos contra distintos marcadores de leucocitos. Cada barra representa la media aritmética $\pm$ ES del porcentaje de células positivas ($n = 7$ ratones).

Debido a que la neutrofilia puede ser acompañada con una reducción en la población de PMNs de médula ósea¹⁹⁶, a continuación evaluamos la procedencia de los PMNs en nuestro modelo. Para ello se cuantificó el número de células mieloides presentes en médula ósea midiendo la actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO) a distintos tiempos luego de la inyección de la Stx2 por dos metodologías diferentes. En ninguno de los dos casos se observaron diferencias entre el grupo control y el tratado con Stx2 (datos no mostrados).

4.1.2- Cinética de la neutrofilia inducida por la Stx2

Se estudió el curso de la neutrofilia relativa a distintos tiempos en ratones control (solución salina) y tratados con la Stx2. Como fue descripto previamente, la inyección intraperitoneal de 5 μ g de LPS 1 hora antes de la inyección de la Stx2 provoca una potenciación en la toxicidad de la toxina medida como porcentaje de muerte²³. En consecuencia, este grupo, así como también su respectivo control con LPS solamente, fueron incluidos en el esquema experimental con el fin de estudiar el efecto de los LPS en la neutrofilia inducida por la Stx2. Como muestra la **Figura 4.1.3** los LPS indujeron un descenso en el porcentaje de PMNs a los 60 min luego de su inoculación, seguido por una marcada neutrofilia que fue máxima a las 24 hs, retornando a valores basales a las 72 hs. Por el contrario, la Stx2 indujo un aumento lento pero sostenido en el tiempo en el porcentaje de PMNs. El efecto del LPS en la neutrofilia mediada por la Stx2 fue

una suma de los efectos de cada tratamiento ya que se observó tanto el descenso provocado por los LPS a los 60 min, como la sostenida neutrofilia de las 72 hs inducida por la Stx2. Esto implicaría que los efectos del LPS y la Stx2 en la neutrofilia serían dos fenómenos independientes.

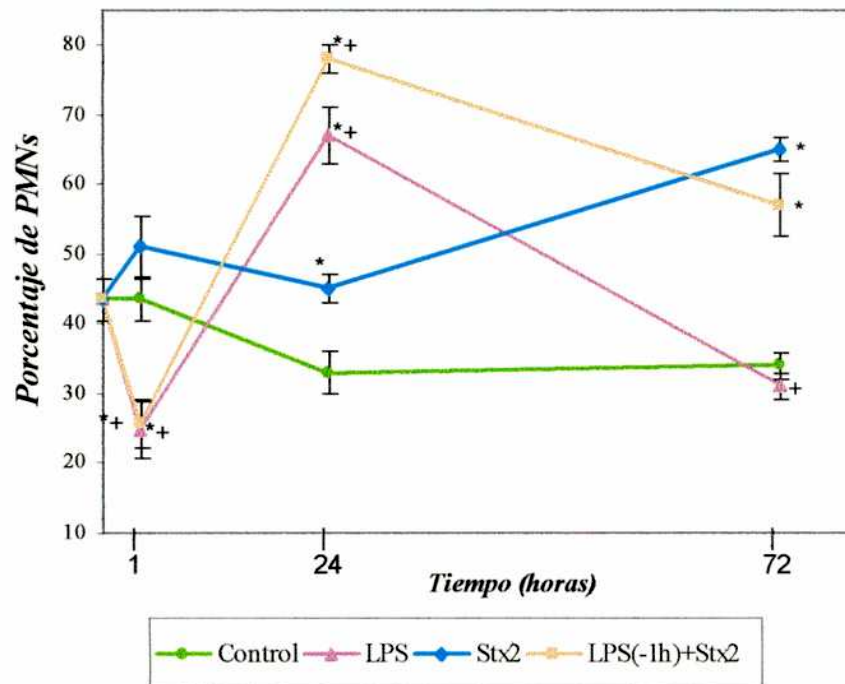


Figura 4.1.3. Cinética de la neutrofilia relativa inducida por la Stx2. Grupos de animales fueron sangrados antes (tiempo 0) y a distintos tiempos luego de la inoculación de la Stx2, como se indica en la figura. La población de PMNs fue identificada usando los gráficos de tamaño vs complejidad, obtenidos por citometría de flujo. Cada punto indica el promedio $\pm$ ES (n= 9-25 ratones) del porcentaje PMNs a los distintos tiempos. * $p < 0.05$ vs. control; + $p < 0.05$ vs. Stx2.

4.1.3- Expresión del marcador CD11b en los PMNs circulantes.

La activación temprana de los PMNs induce rápidos cambios cualitativos y cuantitativos en la expresión de la molécula CD11b¹⁹⁷. Por este motivo, se evaluaron los efectos de la Stx2 y los LPS en la expresión del CD11b. Los resultados revelan un aumento transitorio y rápido en la expresión del marcador CD11b en respuesta a los LPS, mientras que la Stx2 indujo un incremento menor pero sostenido en el tiempo, que se mantuvo hasta la muerte de los animales (**Figura 4.1.4**). El grupo inyectado con LPS

y Stx2 presentó el mismo aumento que el observado para los LPS a tiempos tempranos, mientras que el efecto desapareció a las 24 hs y la expresión del CD11b retornó a valores normales a las 72 hs, probablemente debido a los mecanismos antiinflamatorios de los LPS *per se* que estarían contrarrestando los efectos de la Stx2.

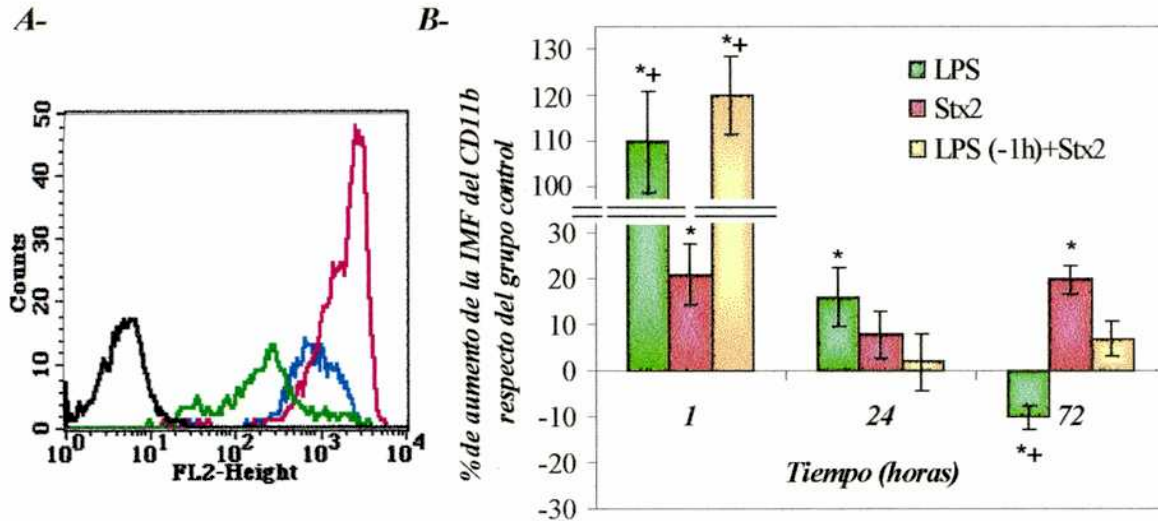


Figura 4.1.4. Expresión del marcador de membrana CD11b en los PMNs circulantes. Los animales fueron sangrados a diferentes tiempos luego de cada tratamiento. Los eritrocitos fueron lisados y las células incubadas con un anti-CD11b. La intensidad de fluorescencia de las células positivas para el CD11b fue determinada en la región correspondiente a los PMNs según tamaño y complejidad. **A-** Histograma representativo de la expresión del CD11b en PMNs 72 hs luego de la inoculación con solución salina (línea celeste), Stx2 (línea rosa) o LPS (línea verde). La línea negra corresponde al control de isotipo. La ordenada y la abscisa representan el número de células y la intensidad de fluorescencia, respectivamente. **B-** Cada barra representa el porcentaje de aumento de la intensidad media de fluorescencia (IMF) con respecto al grupo de ratones control. Cada valor indica el promedio $\pm$ ES de 9-25 ratones. * $p < 0.05$ vs. control; + $p < 0.05$ vs. Stx2.

4.1.4- Efectos de la Stx2 en la adherencia y migración de los PMNs.

Debido a que el daño endotelial provocado por la Stx2 podría verse potenciado por la adherencia de los PMNs a los vasos, se evaluó el efecto *in vivo* de la Stx2 en la adherencia de los PMNs a los vasos del pulmón. Como fue descripto previamente, existe una fuerte correlación entre el número de PMNs intravasculares y el contenido en el pulmón de la enzima MPO¹⁹⁸. En consecuencia, este parámetro fue medido con el fin de cuantificar el secuestro de PMNs en pulmón a las 72 hs luego de la inoculación de la

Stx2. La Stx2 indujo un aumento significativo del contenido de MPO (**Figura 4.1.5A**). Estos resultados sugieren que los PMNs son capaces de adherirse a la microvasculatura en respuesta a la Stx2.

Con el objetivo de determinar la capacidad de los PMNs provenientes de animales inoculados con Stx2 de migrar a un sitio inflamatorio, se realizó un ensayo *in vivo* utilizando la inyección intraperitoneal de tioglicolato (TG) como agente inflamatorio. Como se muestra en la **Figura 4.1.5B**, a las 72 hs luego de la inyección de Stx2, el número de PMNs capaces de migrar a la cavidad peritoneal en respuesta al TG en el grupo Stx2 es significativamente menor comparado con el grupo control.

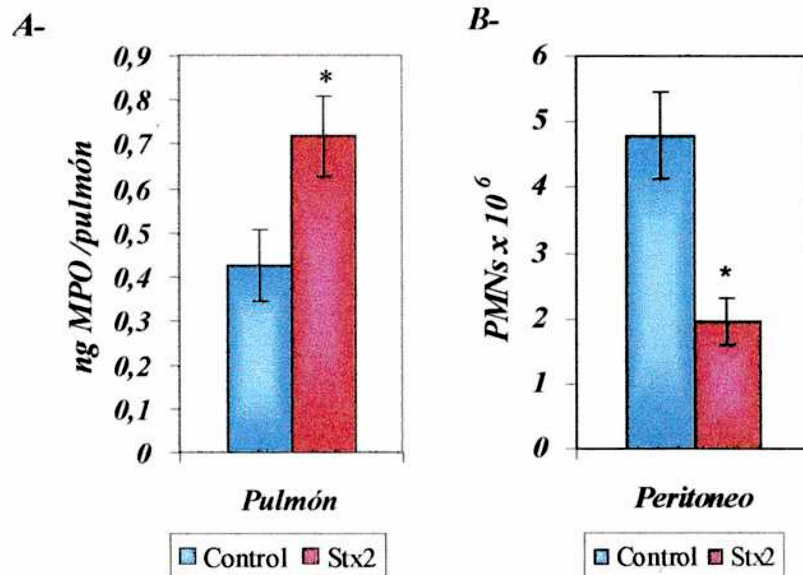


Figura 4.1.5. **A-** Contenido de la MPO en pulmón. A las 72 hs luego de la inyección de Stx2 los pulmones de los ratones fueron extraídos y procesados como se indica en materiales y métodos. La actividad de la MPO fue determinada. n=7-11 animales por grupo. **B-** Número de PMNs en la cavidad peritoneal 4 hs después de la inyección de TG a las 72 hs luego de la inoculación de la Stx2. n=12 animales por grupo. Las barras de ambos gráficos representan la media aritmética $\pm$ ES. * $p < 0.05$ con respecto al grupo control.

4.1.5- Efectos de la Stx2 sobre la citotoxicidad de los PMNs.

Debido a que diversos estímulos activadores de los PMNs aumentan las funciones citotóxicas dependientes de los receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas G (RFcy)^{199,200}, se evaluó la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) en

los PMNs de sangre periférica de ratones individuales inoculados con la Stx2. Como se muestra en la **Figura 4.1.6** la Stx2 indujo un aumento significativo de la CCDA en todos los tiempos evaluados.

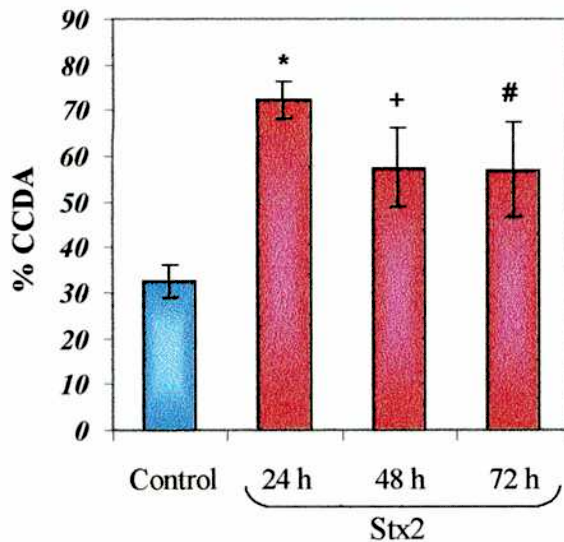


Figura 4.1.6. Efecto del tratamiento con Stx2 en la citotoxicidad de los PMNs. A distintos tiempos luego de la inoculación de la Stx2, los animales fueron sangrados y sus PMNs aislados como se describe en materiales y métodos. Las células (1×10^5 PMNs) fueron incubadas durante 18 hs a 37°C con 2×10^5 glóbulos de pollo sensibilizados, marcados con ^{51}Cr . El porcentaje de citotoxicidad dependiente de anticuerpos (CCDA) fue medido y expresado como se indica en materiales y métodos. Cada barra representa la media $\pm$ ES de 8 animales por grupo. * $p < 0.0001$, + $p < 0.01$ y # $p < 0.05$, comparado con el grupo control.

4.1.6 - Correlación entre el porcentaje de PMNs y el daño renal inducido por la Stx2.

Considerando que en el modelo murino de SUH la muerte de los animales está asociada al daño renal, el curso de la enfermedad puede seguirse determinando bioquímicamente la creatinina y/o la uremia tras la inyección de la Stx2²³. Si bien la medición de creatinina resulta más adecuada como parámetro de daño renal, el volumen de plasma requerido para su medición es equivalente al plasma obtenido de un volumen de sangre que corresponde a toda la volemia del animal. Por esta razón y debido a que en muchos experimentos realizamos determinaciones cinéticas, en la práctica utilizamos la uremia para evaluar el estado renal de los animales, que como fue demostrado por Palermo *et al.*, resulta tan buen parámetro como la creatinina²³. En la **Figura 4.1.7A** se muestra que en los animales del grupo control los niveles de urea en plasma permanecieron normales a las 24, 48 y 72 hs luego del respectivo tratamiento (rango entre 45-60 mg%). Sin embargo, en los ratones tratados con la Stx2, los niveles de urea aumentan progresivamente en el tiempo luego de la inyección alcanzando valores muy

elevados a las 72 hs (rango entre 150-357 mg%). Con el objetivo de analizar la relación entre la neutrofilia y el desenlace de la enfermedad, se analizó la correlación entre el porcentaje de PMNs y la uremia en los animales tratados con la Stx2. Se obtuvo una fuerte correlación positiva entre estos dos parámetros, sugiriendo una conexión entre la neutrofilia y la severidad del daño inducido por la Stx2 (**Figura 4.1.7B**).

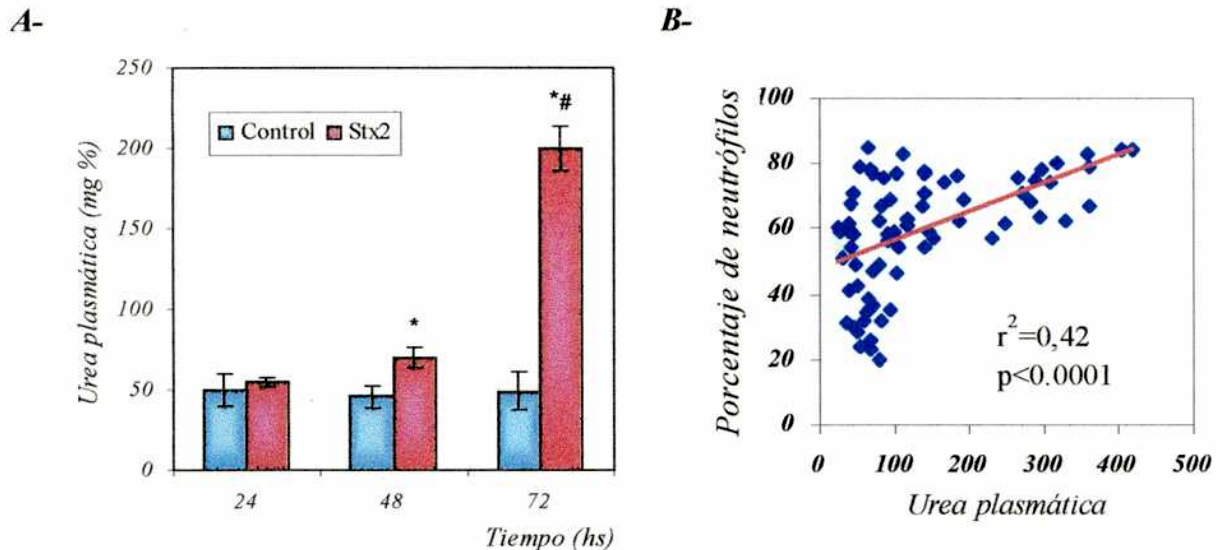


Figura 4.1.7. A- Niveles de urea en plasma luego de la inyección de Stx2. *: $p < 0.05$ vs grupo control; #: $p < 0.05$ vs Stx2 24 y 48 hs **B-** Correlación entre el porcentaje de PMNs y la urea plasmática. El porcentaje de PMNs en sangre periférica fue determinado 24, 48 y 72 hs luego del tratamiento con la Stx2. La urea en plasma fue simultáneamente medida en las mismas muestras.

4.1.7- Efecto de la depleción de PMNs en la mortalidad inducida por Stx2

Con el objetivo de determinar el papel patogénico de los PMNs en el curso del SUH, se realizaron experimentos donde se estudió la toxicidad de la Stx2 en ratones deplecionados de PMNs. Los animales fueron inyectados con un anticuerpo anti-PMN de ratón obtenido en conejo, con el cual se obtuvo una disminución en el número de PMNs aproximadamente del $\cong 70\%$, que se mantuvo durante todo el experimento. La Stx2 fue inyectada y se evaluó la sobrevida a lo largo del tiempo. Como se muestra en la **Figura 4.1.8A**, los animales tratados con Stx2+anti-PMN mostraron un aumento significativo en el porcentaje de sobrevida claramente observable a los 3-4 días luego de la inyección con Stx2. Por otra parte, la protección mediada por la depleción de PMNs se tradujo en

menores niveles de urea en sangre, como se muestra en la **Figura 4.1.8B**. Estos resultados demuestran el papel central de los PMNs como potenciadores de la toxicidad de la Stx2. Para evaluar el período, en el curso de la patología, en el cual la ausencia de PMNs es más relevante, el anticuerpo anti-PMN fue inyectado a los ratones a distintos tiempos con respecto de la inoculación de la Stx2 según el siguiente esquema: grupo anti-PMN temprano: 4 hs antes, en el momento de la inyección con la Stx2 y durante las primeras 24 hs post-Stx2; grupo anti-PMN tardío: a partir de las 48 hs post-Stx2 hasta la muerte de los animales. En estos dos grupos la depleción de PMNs no modificó la mortalidad inducida por la Stx2, así como tampoco los niveles de urea en plasma. Estos resultados indican que sólo la depleción sostenida en el tiempo es capaz de disminuir los efectos tóxicos de la Stx2.

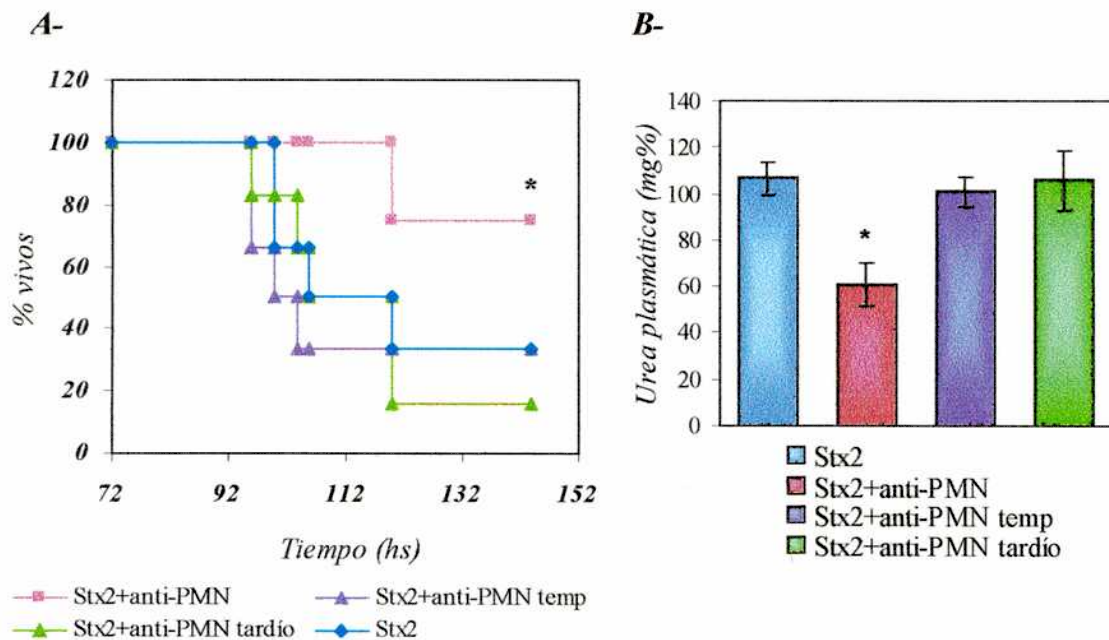


Figura 4.1.8. Efecto de la depleción de PMNs en la mortalidad inducida por la Stx2. **A-** Los animales fueron inyectados con un anticuerpo anti-PMN 4 hs antes, en el momento de la inyección con la Stx2 y luego cada 12 hs, de manera de mantener la neutropenia a lo largo del experimento. Los puntos indican la media aritmética del porcentaje de vida de tres experimentos (n= 30-34 animales por grupo). **B-** Niveles de urea en plasma a las 72 hs luego de la inyección de Stx2. * p<0.05 comparado con el grupo tratado con Stx2, Stx2+anti-PMN temprano y Stx2+anti-PMN tardío.

Resumen capítulo 4.1:

1. La inyección de Stx2 en el ratón provoca un aumento en el número absoluto y el porcentaje de PMNs periféricos.
2. La neutrofilia observada se correlaciona con el daño renal determinado como urea en plasma.
3. Luego de la inyección de la Stx2 los PMNs presentan un fenotipo de activación evidenciado por:
 - ❖ mayor expresión del marcador de activación CD11b
 - ❖ aumento de la capacidad citotóxica
 - ❖ mayor adhesión al endotelio pulmonar y menor extravasación a sitios inflamatorios, lo que evidencia un proceso de activación en periferia debido probablemente al daño endotelial asociado.
4. La eliminación de los PMNs del sistema protege a los ratones de la muerte y daño renal.

Estos resultados indican la participación directa o indirecta de este tipo celular como un factor de potenciación del daño mediado por la Stx2.

4- Resultados



4.2- Estudio de la importancia de los PMNs en pacientes con D+SUH.

4.2.1- Recuento absoluto de leucocitos en sangre periférica

El número de linfocitos y PMNs fue determinado en las muestras de sangre periférica de los distintos grupos clínicos incluidos en este estudio. Las características particulares de estos grupos se encuentran en la sección materiales y métodos, punto 3.3.1.1. Como se observa en la **Figura 4.2.1** no se observan diferencias significativas entre grupos en el número de linfocitos, mientras que los PMNs de los grupos de pacientes con D+SUH y neutrofílicos se encuentran significativamente aumentados con respecto de los demás grupos estudiados.

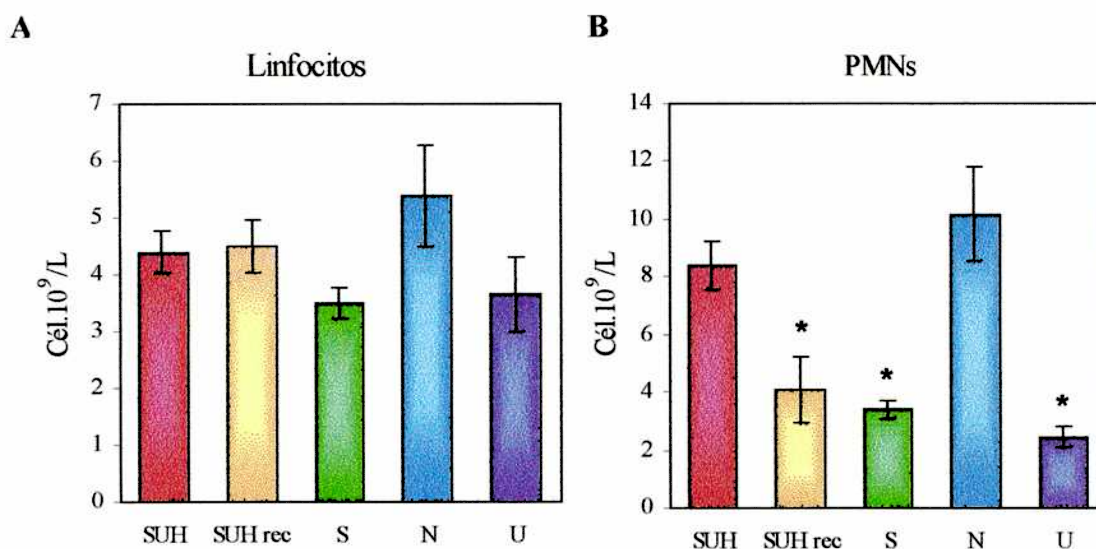


Figura 4.2.1- Recuento total de leucocitos de las poblaciones clínicas incluidas en el estudio. El número de linfocitos (**A**) y PMNs (**B**) fue determinado en una cámara de Neubauer luego de diluir la sangre en una solución de 2% de ácido acético y fue expresado por 10⁹/L. Cada barra representa la media aritmética ± el ES. * $p < 0.05$ comparado con el grupo de niños con D+SUH en el período agudo. Grupo SUH: n=26; grupo SUH rec: n=11; grupo S: n=30; grupo N: n=20; grupo U: n=12.

4.2.2- Expresión de marcadores de activación en PMNs de sangre periférica

Considerando que las β_2 integrinas y los Fc γ Rs son requeridos para la adhesión y diversas respuestas inflamatorias mediadas por los PMNs²⁰¹⁻²⁰³, la expresión en la superficie del Fc γ RII (CD32), Fc γ RIII (CD16) y CD11b fue investigada en los pacientes con D+SUH,

los urémicos crónicos (U) y los niños sanos (S). Todas las determinaciones se realizaron en 100 µl de sangre entera como se describe en materiales y métodos, de manera de evitar cualquier activación debida al manejo metodológico. Los resultados que se muestran en la **Figura 4.2.2** indican que los PMNs de los pacientes con D+SUH presentan una significativa disminución de la expresión del FcγRIII en comparación con S y U, aunque en este último grupo se observa una disminución significativa del FcγRIII al comparar con S.

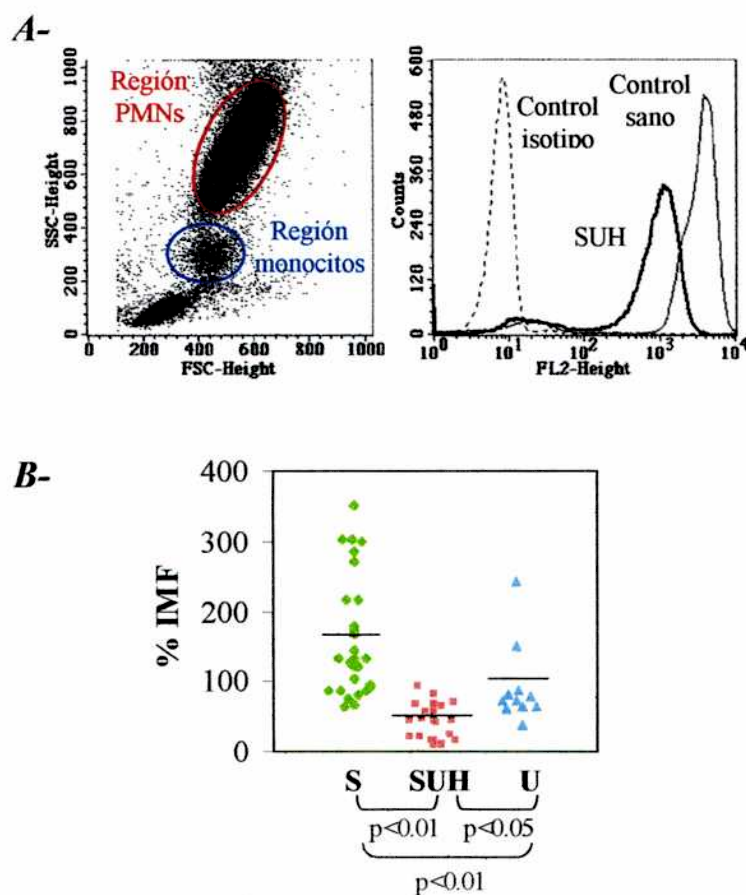


Figura 4.2.2. Expresión en membrana del marcador FcγRIII (CD16) en los pacientes con D+SUH, U y S. Se incubaron 100 µl de sangre entera con un anticuerpo específico dirigido contra el FcγRIII humano. **A-** Los PMNs fueron identificados por su perfil de tamaño (FSC) versus complejidad (SSC) como se muestra en la figura, y se determinó la densidad de fluorescencia de las células dentro de esta región. Se muestra un histograma representativo de la expresión en PMNs del FcγRIII de un paciente con D+SUH (línea gruesa), un control sano (línea fina, y el control de isotipo (línea punteada). La ordenada y la abscisa representan el número de células y la intensidad de fluorescencia, respectivamente.

B- Valores individuales de la expresión del FcγRIII en los PMNs de los distintos grupos

clínicos. Cada valor muestra el porcentaje de IMF, considerando como 100% la IMF de un control sano adulto procesado de la misma manera y al mismo tiempo. Las líneas horizontales representan el valor promedio para cada grupo. Grupo S: n=30; grupo SUH: n=26; grupo U: n=11.

En diez de los once niños que fueron analizados al mes del período agudo se encontró una recuperación en la expresión de membrana del FcγRIII (**Figura 4.2.3**).

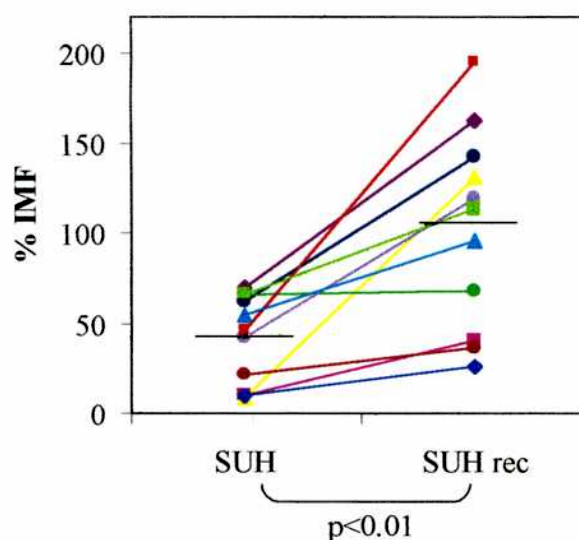


Figura 4.2.3. Expresión del FcγRIII (CD16) en la membrana de los PMNs de once pacientes con D+SUH en el período agudo de la enfermedad y tras su recuperación clínica. Los símbolos del lado izquierdo corresponden a los pacientes en el período agudo (SUH) y los de la derecha a los mismos pacientes luego de su recuperación clínica (SUH rec).

Por el contrario, la expresión del FcγRII no mostró ninguna variación entre grupos, así como tampoco se observó una inducción del FcγRI (CD64) en los pacientes con D+SUH o los U (resultados no mostrados).

La expresión del CD11b también se encontró disminuida en los PMNs de los pacientes con D+SUH respecto al grupo S. Debido a que los U mostraron una gran dispersión en la expresión de este marcador, la media no resultó significativamente distinta de la encontrada en los pacientes con D+SUH o los S (**Figure 4.2.4A**). Tras la recuperación clínica de los pacientes este marcador, considerando las poblaciones como un todo, aumentó hasta los niveles de los niños sanos (**Figura 4.2.4B**). Sin embargo, considerando los datos individuales en los que se tiene la misma muestra en el período agudo y un mes después, en la mitad de los casos se observó aumento mientras que en los demás la expresión del CD11b permaneció casi inalterada.

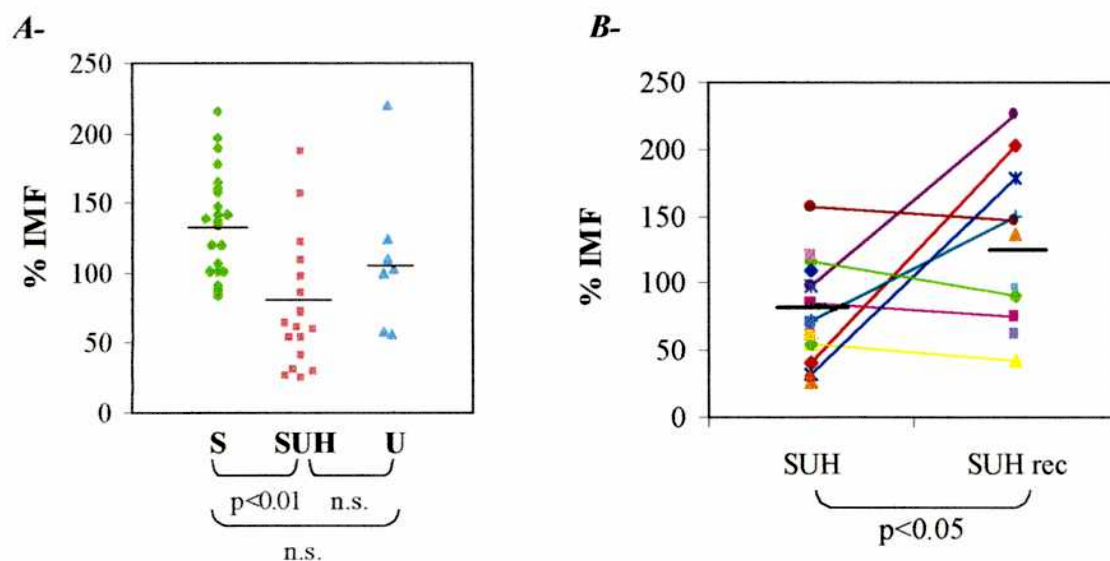


Figura 4.2.4. Expresión del marcador CD11b en los PMNs en circulación. **A-** Se incubaron 100 μ l de sangre entera de los pacientes con D+SUH y controles S y U con un anticuerpo específico dirigido contra el CD11b humano. Las líneas horizontales representan el valor promedio para cada grupo. Grupo S: n=27; grupo SUH: n=22; grupo U: n=7. **B-** La expresión del CD11b se evaluó en algunos pacientes con D+SUH luego del período agudo. Los símbolos del lado izquierdo corresponden a los pacientes en el período agudo (SUH) y los de la derecha luego de la recuperación clínica (SUH rec). Las líneas conectan los datos correspondientes al mismo paciente. La línea horizontal representa el valor promedio de ambas poblaciones. Grupo SUH: n=19; grupo SUH rec: n=12.

4.2.3- Degranulación de los PMNs.

Como parámetros de degranulación de los PMNs nosotros evaluamos la expresión del marcador CD66b y el contenido total de la enzima MPO. Mientras que el CD66b se encuentra en la membrana de los gránulos específicos y se expresa en la superficie celular luego de la activación y degranulación, la MPO está presente en los gránulos azurófilos y es liberada al medio extracelular luego de la degranulación del PMN^{121,204}. La expresión de ambos marcadores fue determinada por citometría de flujo.

Los pacientes con D+SUH presentaron un amplio rango en el nivel de expresión del marcador CD66b en la membrana de sus PMNs (**Figure 4.2.5A**); en consecuencia, la media no resultó significativamente diferente de la de los controles S. Esta misma heterogeneidad fue observada en diez pacientes analizados un mes después del período agudo: tres de ellos mostraron un claro aumento en la expresión del marcador, cuatro no mostraron cambios apreciables y en los otros tres se encontró una disminución de la expresión del CD66b (**Figure 4.2.5B**).

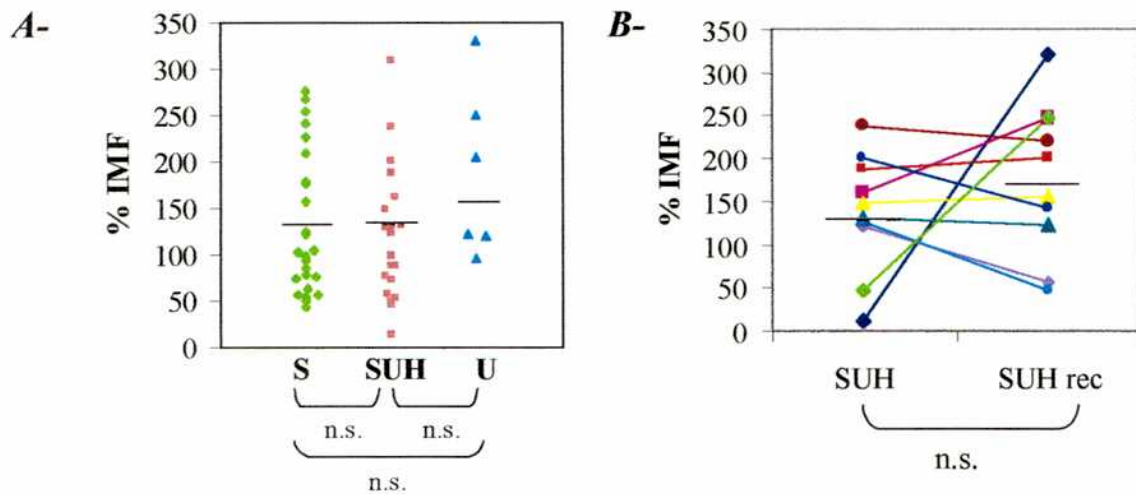


Figura 4.2.5. Expresión del marcador de degranulación CD66b en la membrana de los PMNs en circulación. **A-** Los PMNs de los pacientes con D+SUH, y los controles U y S se evaluaron para la expresión del CD66b en 100 μ l de sangre entera, incubada con el anticuerpo específico. Grupo S: n=29; grupo SUH: n=22; grupo U: n=6. **B-** La expresión del CD66b también se evaluó en diez pacientes con SUH luego del período agudo. Los símbolos del lado izquierdo corresponden a los pacientes en el período agudo (SUH) y los de la derecha a los mismos pacientes luego de su recuperación clínica (SUH rec). Las líneas horizontales en ambos gráficos representan el valor promedio para cada grupo.

Por el contrario, el contenido total de la enzima MPO en los pacientes con D+SUH cursando la etapa aguda se encontró significativamente reducido (**Figure 4.2.6**), indicando que los PMNs de los pacientes se encuentran degranulados. Solamente pudimos evaluar un paciente luego de la recuperación clínica, y encontramos un incremento de tres veces en el contenido total de MPO al comparar con el período agudo.

En los U no se encontraron diferencias en el contenido de los gránulos comparando con los controles S.

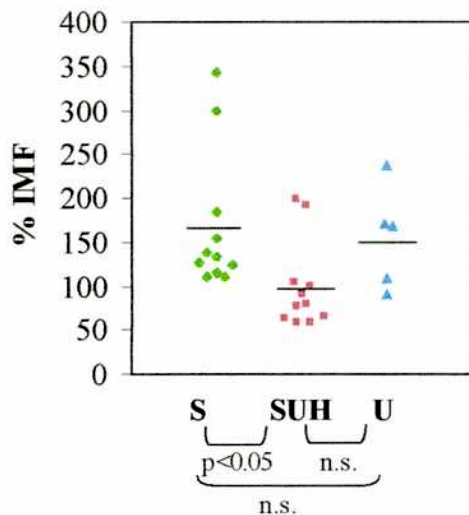


Figura 4.2.6. Contenido total de MPO en los PMNs circulantes. El contenido total de MPO se evaluó en los diferentes grupos clínicos en 100 μ l de sangre entera permeabilizada e incubada con el anticuerpo específico dirigido contra la MPO humana. Las líneas horizontales representan el valor promedio para cada grupo. Grupo S: n=11; grupo SUH: n=11; grupo U: n=5.

4.2.4- *Estudios funcionales*

Debido a que los pacientes con D+SUH presentaron una disminución en la expresión de membrana del Fc γ RIII y del CD11b, dos receptores involucrados directa e indirectamente en funciones dependientes de Fc γ Rs y que podrían participar en el daño endotelial, a continuación evaluamos la citotoxicidad dependiente de Fc γ Rs en los PMNs de los pacientes. Se valoraron dos tipos de citotoxicidad, considerando que, aunque ambas son reacciones extracelulares con liberación de sustancias citotóxicas al medio, involucran mecanismos líticos diferentes: la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA), y la citotoxicidad dependiente de IROs disparada por complejos inmunes¹⁸⁹.

Como se muestra en la **Figura 4.2.7A**, la CCDA llevada a cabo por los PMNs de los pacientes con D+SUH se encontró disminuida significativamente comparando con los controles S. Nuevamente, se encontró una recuperación de esta función citotóxica en seis pacientes estudiados luego del período agudo. Por el contrario, en la citotoxicidad dependiente de IROs disparada por complejos inmunes, no encontramos ninguna alteración en los pacientes en el período agudo o luego de la recuperación clínica (**Figura 4.2.7B**). Estos resultados contradictorios sugieren que los PMNs de los pacientes no se encuentran totalmente hipo-respondedores. Un aspecto para destacar es que tanto la CCDA como la citotoxicidad mediada por IROs de los PMNs de los controles U se encontraron aumentadas, si bien en este caso también se encontró una disminución del marcador de membrana Fc γ RIII.

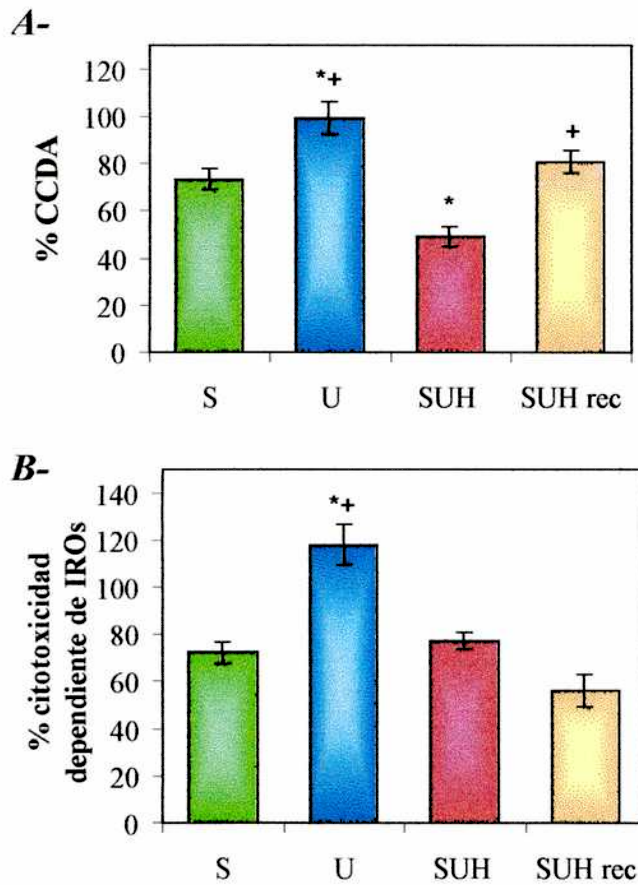


Figura 4.2.7. Citotoxicidad mediada por los PMNs de pacientes con D+SUH. Los PMNs de pacientes y controles U y S se purificaron y 2.5×10^5 células se incubaron por 18 hs a 37°C con 2×10^5 eritrocitos sensibilizados marcados con ^{51}Cr (**A**) o con complejos inmunes OVA-anti OVA y 2×10^5 eritrocitos no sensibilizados marcados con ^{51}Cr (**B**), con el objetivo de medir la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) o la mediada por radicales libres del oxígeno (IROs), respectivamente. El porcentaje de citotoxicidad se calculó como se indica en materiales y métodos y los resultados se expresaron considerando como 100% la citotoxicidad obtenida a partir de PMNs de un adulto sano procesado de la misma manera y al mismo tiempo. Cada barra representa la media $\pm$ ES de 8-12 niños. * $p < 0.05$ comparado con los niños sanos (S),

+ $p < 0.05$ comparado con los pacientes con D+SUH cursando el período agudo.

4.2.5- Efectos directos de la urea

Debido a que los niveles elevados de urea en plasma pueden inducir múltiples efectos ^{205,206}, nos pareció importante medir todos los parámetros fenotípicos y funcionales evaluados para los pacientes, en PMNs controles luego de cuatro horas de incubación con 33.4 mmol/L de urea. Ninguna modificación en los parámetros estudiados fue observada (**tabla 4.2.1**).

Tabla 4.2.1

Efectos directos de la urea sobre marcadores de activación y citotoxicidad en PMNs.

	Sin urea (media $\pm$ ES)	Con urea (media $\pm$ ES)	
Fc γ RIII (IMF)	2103 $\pm$ 639	2174 $\pm$ 573	n.s.
CD11b (IMF)	658 $\pm$ 127	563 $\pm$ 110	n.s.
CD66b (IMF)	233 $\pm$ 24	197 $\pm$ 24	n.s.
MPO (IMF)	270 $\pm$ 56	244 $\pm$ 39	n.s.
% CCDA	86 $\pm$ 7	74 $\pm$ 9	n.s.
% citotoxicidad dependiente de IROs	79 $\pm$ 7	72 $\pm$ 10	n.s.

Sangre de 5 adultos sanos se incubó con 33.4 mmol/L de urea por 4 hs y la IMF de los distintos marcadores y el % de citotoxicidad se determinaron como se indica en materiales y métodos. n.s.: no significativo.

4.2.6- Parámetros fenotípicos y funcionales en niños neutrofílicos

Con el objetivo de evaluar la especificidad de los cambios observados en los PMNs de los niños con D+SUH, a continuación estudiamos los PMNs de niños que presentaban neutrofilia (N) causada por alguna infección aguda no relacionada con el D+SUH. Como se muestra en la **Figura 4.2.8A**, aunque la expresión de membrana del Fc γ RIII en los PMNs de los niños N se encontró significativamente disminuida con respecto de los controles S, esta disminución fue significativamente menor al comparar con los pacientes con D+SUH. Para los marcadores CD11b y CD66b no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos, aunque para el último marcador se observó una distribución más homogénea, similar a la observada para los controles S (ver **Figura 4.2.5**). Por otro lado, la MPO total en los niños N, se encontró significativamente aumentada con respecto a los pacientes con D+SUH y no fue diferente de la encontrada para los controles S. La expresión normal del CD66b y de la MPO en los PMNs de los niños N, sugieren que estas células no han sido degranuladas.

Análogamente, la capacidad citotóxica de los PMNs de los pacientes N se encontró normal, tanto para la CCDA como para la citotoxicidad dependiente de IROs, y en ambos

casos fue significativamente diferente de la citotoxicidad de los PMNs de los pacientes con D+SUH (**Figure 4.2.8B**).

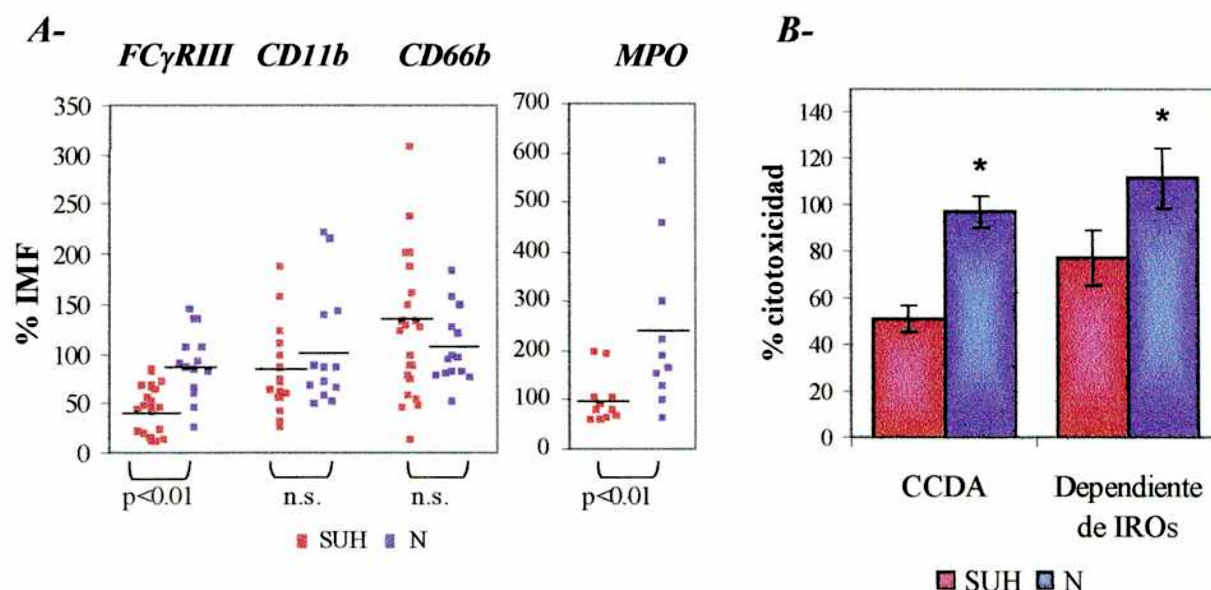


Figura 4.2.8. Expresión en membrana de distintos marcadores y capacidad citotóxica de los PMNs de niños con neutrofilia (N). Comparación con los pacientes con D+SUH.

A- Se estudió la expresión en membrana del Fc γ RIII, CD11b, CD66b y MPO total por citometría de flujo, en PMNs de pacientes con neutrofilia no relacionada con D+SUH (N). Las líneas horizontales representan el valor promedio para cada grupo. Grupo SUH: n=11-26; grupo N: n=11-14. **B-** La CCDA o la citotoxicidad mediada por IROs se determinó en los PMNs de los niños con neutrofilia. El porcentaje de citotoxicidad se calculó como se indica en materiales y métodos y los resultados se expresaron considerando como 100% la citotoxicidad obtenida a partir de PMNs de un adulto sano procesado de la misma manera y al mismo tiempo. Cada barra representa la media $\pm$ ES de 8-12 niños. *p<0.05 comparado con los pacientes con D+SUH.

4.2.7- *Respuesta de los PMNs periféricos de pacientes a distintas citoquinas*

Para determinar la capacidad de respuesta de los PMNs periféricos de los pacientes con D+SUH, se evaluó el aumento en la membrana de los marcadores de superficie CD11b y CD66b por estimulación con citoquinas relevantes en el curso del D+SUH por sus propiedades modulatorias de la función de los PMNs (TNF- α , IL-8 y G-CSF). La **Figura 4.2.9A** muestra que la respuesta del marcador CD11b frente a las citoquinas IL-8 y G-CSF es significativamente menor en la población de niños con D+SUH comparado con la de niños S. Si bien se observó la misma tendencia para el TNF- α , en este caso las diferencias no fueron

significativas. Un mes luego del período agudo la respuesta no se restableció para este marcador. No se encontraron diferencias significativas al comparar los pacientes con D+SUH con los niños N.

La respuesta para el CD66b resultó significativamente menor en los pacientes con D+SUH con respecto a los S con las tres citoquinas ensayadas (**Figura 4.2.9B**). Luego de la recuperación clínica de los pacientes la respuesta para el CD66b alcanzó los valores normales. Los PMNs de los niños N presentaron una respuesta similar a la de los controles S al ser incubados con $\text{TNF-}\alpha$, si bien con las otras dos citoquinas utilizadas la respuesta fue comparable a la de los pacientes con D+SUH.

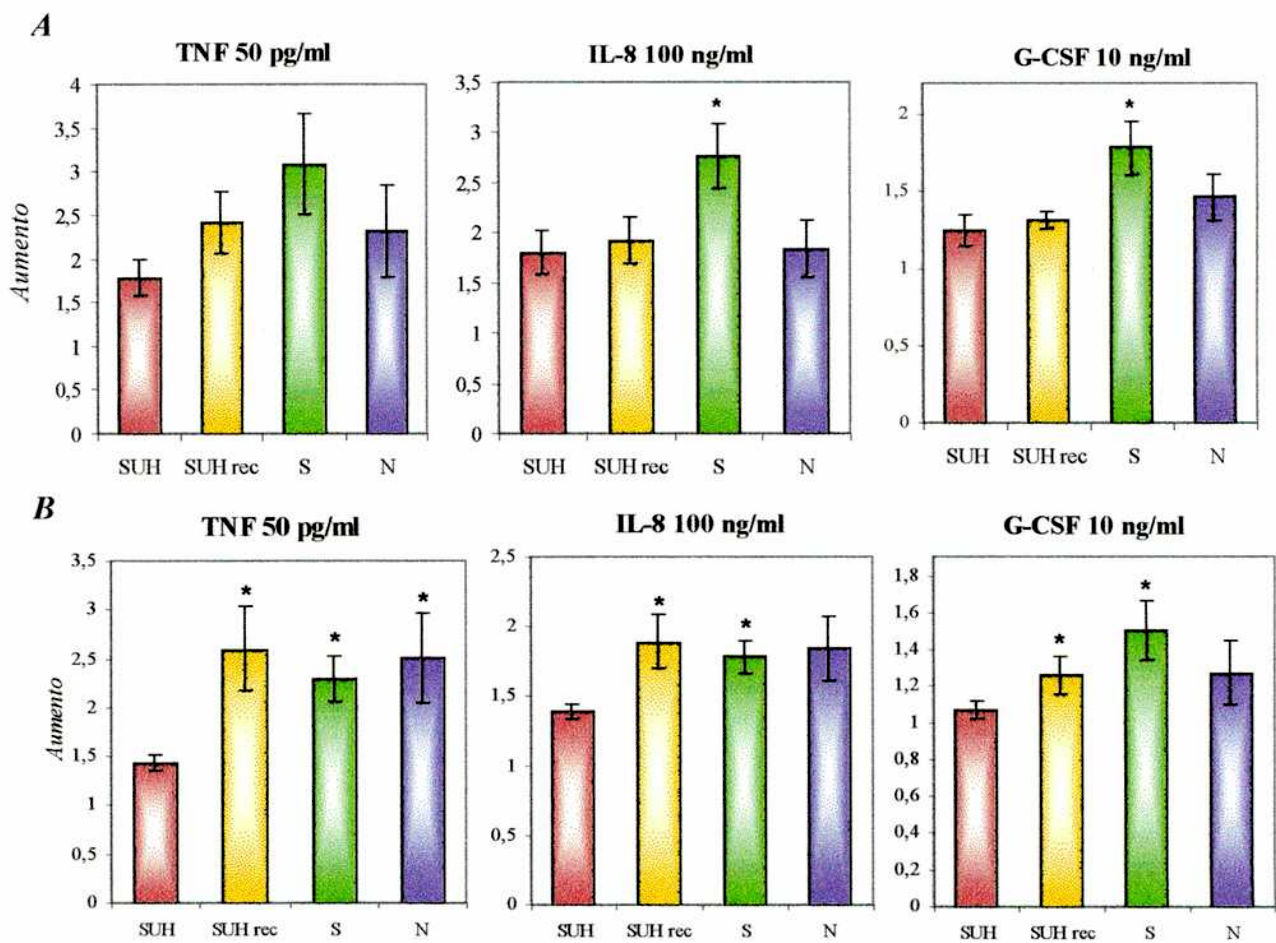


Figura 4.2.9. Aumento en membrana del marcador CD11b y CD66b en los PMNs de los distintos grupos luego de la estimulación con distintas citoquinas. 100 μl de sangre entera fueron incubados con $\text{TNF-}\alpha$, IL-8 y G-CSF en las concentraciones indicadas en la figura. Transcurridos 30 min para el CD11b o 2 horas para el CD66b, la sangre se incubó con el anticuerpo específico de cada caso por 30 min a 4°C. Los eritrocitos fueron lisados y el aumento en membrana del CD11b (**A**) o del CD66b (**B**) fue determinado por citometría de flujo y expresado como el aumento en la IMF con respecto del basal (sin citoquina). * $p < 0.05$ vs. SUH. Grupo SUH: $n=10-12$; grupo SUH rec: $n=6$; grupo S: $n=10-14$; grupo N: $n=8-10$.

4.2.8- Correlaciones

Los datos inmunológicos, bioquímicos y clínicos de los pacientes con D+SUH en el período agudo fueron correlacionados. Se encontró una correlación positiva entre el porcentaje de PMNs y los días de diálisis ($r=0.4$, $p<0.05$). Por otra parte, el porcentaje de PMNs correlacionó negativamente con la expresión en membrana de los marcadores de degranulación CD66b y CD11b ($r=-0.5$; $p<0.05$ en los dos casos) y ambos marcadores correlacionaron positivamente entre sí ($r=0.7$; $p<0.01$). Estos resultados indican que en nuestra población de pacientes la neutrofilia está asociada a una mayor gravedad del paciente y a una mayor degranulación de sus PMNs.

Por otra parte, en la respuesta de degranulación (**Figura 4.2.9**) se observaron fuertes correlaciones positivas entre las distintas citoquinas tanto para el CD66b como para el CD11b (*CD66b*: TNF- α e IL-8: $r=0.7$; $p<0.01$; TNF- α y G-CSF: $r=0.8$; $p<0.001$; IL-8 y G-CSF: $r=0.8$; $p<0.001$. *CD11b*: TNF- α e IL-8: $r=0.7$; $p<0.001$; TNF- α y G-CSF: $r=0.9$; $p<0.001$; IL-8 y G-CSF: $r=0.7$; $p<0.01$). Más aún, a excepción de la IL-8, se observaron correlaciones positivas entre marcadores para una misma citoquina (TNF- α : CD66b y CD11b: $r=0.7$; $p<0.01$; G-CSF: CD66b y CD11b: $r=0.7$; $p<0.05$). Estos datos sugieren que la respuesta de los PMNs de los pacientes es un fenómeno no específico de la citoquina utilizada o del marcador evaluado.

4.2.9- Efectos directos de la Stx2 sobre los PMNs humanos

Debido a que la unión de la Stx marcada con FITC a los PMNs humanos ha sido reportada anteriormente ¹⁶, a continuación se estudiaron los efectos de la toxina sobre distintos marcadores de activación en PMNs humanos de voluntarios adultos. Como primer paso se deseó confirmar la unión de la Stx en nuestro sistema. Para tal fin se utilizaron dos métodos diferentes luego de la incubación de PMNs de adultos normales con distintas concentraciones de Stx1 y 2: a) observar directamente la unión por citometría de flujo utilizando una marcación indirecta con anticuerpos anti-Stx y un segundo anticuerpo anti-ratón conjugado con un fluorocromo; b) evaluar la actividad

lítica de la Stx no unida, es decir, la que permanece en el sobrenadante luego de la incubación con los PMNs, sobre células Vero. Se ensayaron distintas concentraciones de toxina (10 nM, 1 nM, 0.1 nM y 0.01 nM) y tiempos de incubación (20 min, 2 hs y 24 hs). En los estudios de citometría de flujo, se utilizaron dos anticuerpos anti-Stx, uno específico para la variante Stx2 y otro que reconoce las dos variantes. Para confirmar la especificidad y actividad de los mismos se realizaron ensayos de neutralización de toxicidad en células Vero. Si bien ambos anticuerpos fueron capaces de neutralizar la Stx (100 y 50% de inhibición de toxicidad, respectivamente), para ninguna de las concentraciones o tiempos de incubación ensayados, se observó unión de la Stx1 y/o 2 a los PMNs por citometría de flujo (resultados no mostrados). Más aún, cuando se evaluaron los sobrenadantes luego de su incubación con los PMNs, no se observaron diferencias entre la toxicidad de la Stx1 o 2 sola y la incubada previamente con los PMNs. Por otra parte, PMNs pre-estimulados con TNF- α ó LPS (100 ng/ml y 1 μ g/ml, respectivamente) tampoco fueron capaces de unir la variante 2 de la Stx, la cual permaneció en el sobrenadante, al ser evaluada en células Vero (resultados no mostrados). En este caso tampoco pudo determinarse unión por citometría de flujo.

Al evaluar el efecto directo de la Stx2 sobre los marcadores de activación CD11b, CD66b, Fc γ RIII y MPO en PMNs humanos incubados por 24 hs con Stx2, no se observaron diferencias significativas (**Figura 4.2.10A**). De manera similar, la Stx2 no indujo diferencias en los marcadores en PMNs previamente “primados” por adhesión a placas cubiertas por fibrinógeno para ninguno de los tiempos ensayados (30 min, 2, 6 y 24 hs de incubación con la Stx2) (**Figura 4.2.10A**).

Por otra parte, y contrariamente a los reportado por Liu *et al* ¹²⁶, la apoptosis espontánea de PMNs no se vio modificada tras 24 hs de incubación con 10 nM de Stx2 (**Figura 4.2.10B**). Estos resultados sugieren que, al menos en nuestras condiciones experimentales, ni la Stx1 ni la Stx2 fueron capaces de unirse o, en el caso de la Stx2, activar directamente a los PMNs humanos.

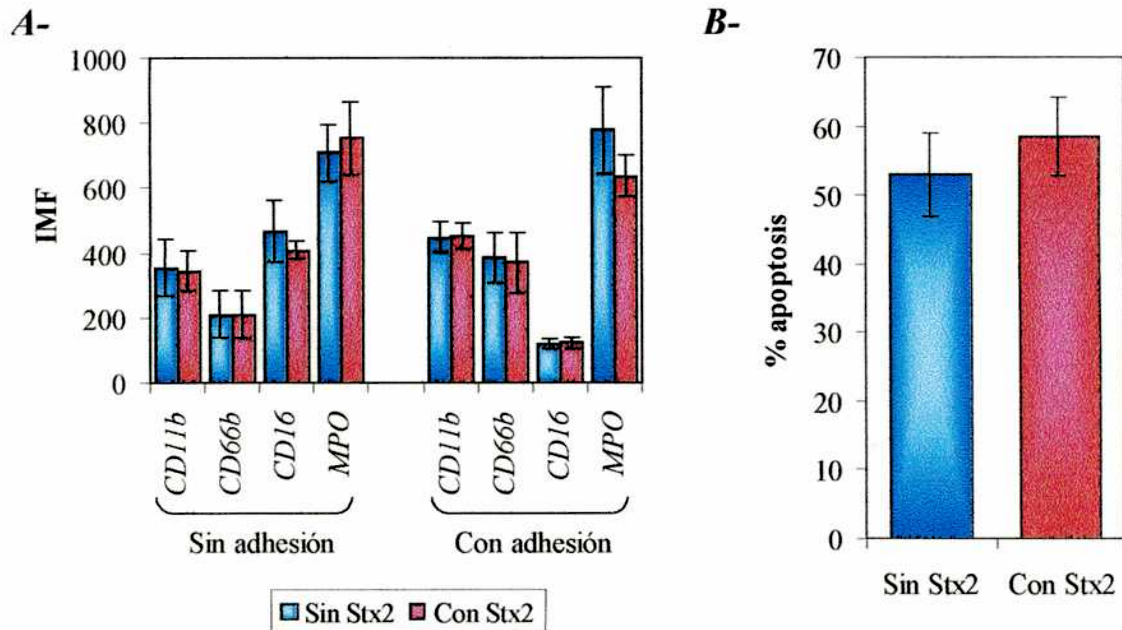


Figura 4.2.10. Efectos de la Stx2 sobre los marcadores de activación y apoptosis en PMNs *in vitro*. **A-** PMNs (2×10^6 células) de individuos adultos normales fueron incubados con 10 nM de Stx2 por 24 hs a 37°C o preincubados en placas cubiertas con fibrinógeno (250 µg/ml) por 30 minutos a 37°C previo a la adición de Stx2 (con adhesión). Luego de transcurridas las 24 hs las células se lavaron e incubaron con anticuerpos específicos para los marcadores CD11b, CD66b, FcγRIII (CD16) y MPO. Se determinó la IMF por citometría de flujo y los resultados mostrados muestran la media $\pm$ ES de cuatro dadores distintos.

B- PMNs (2×10^6) de 8 diferentes dadores adultos normales se incubaron con 10 nM de Stx2 por 24 hs a 37°C y el porcentaje de apoptosis fue medido utilizando Ioduro de Propidio (50 µg/ml). El contenido de ADN de los núcleos apoptóticos (hipodiploides) se determinó por citometría de flujo. Las barras representan la media $\pm$ ES del porcentaje de células con núcleos apoptóticos.

4.2.10- Estudios preliminares en monocitos de pacientes con D+SUH

Algunas características fenotípicas de la población de monocitos fueron estudiadas en los pacientes con D+SUH por citometría de flujo. Tanto el marcador FcγRI (CD64) como el CD11b se encontraron disminuidos significativamente en los pacientes con D+SUH al comparar con los controles S y los niños N (**Figura 4.2.11 y 4.2.12A**). Tras la recuperación clínica de los pacientes, el marcador CD11b volvió a los valores normales (**Figura 4.2.12B**). Por otra parte, para los marcadores FcγRII (CD32)

y MPO no se observaron diferencias significativas entre los grupos estudiados (datos no mostrados).

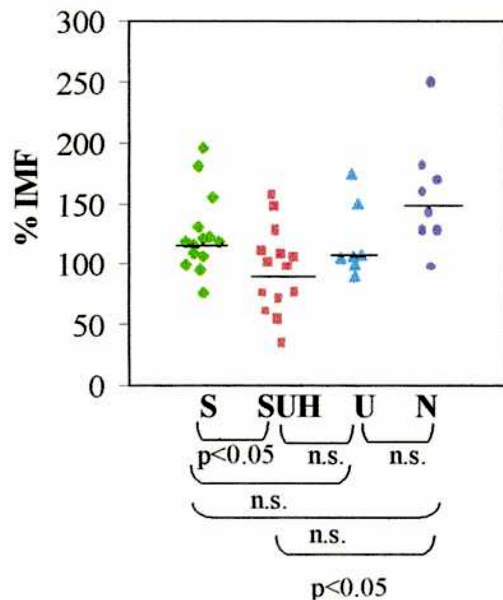
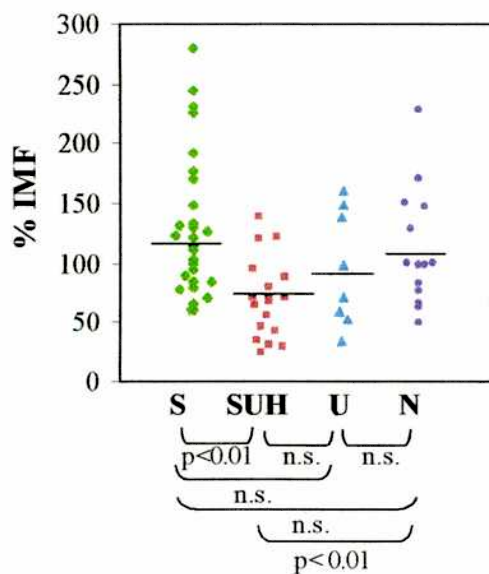


Figura 4.2.11. Expresión en membrana del marcador $Fc\gamma RI$ (CD64) en monocitos de sangre periférica de pacientes con D+SUH y distintos grupos controles. 100 μl de sangre entera proveniente de 13 pacientes con D+SUH y 7 niños urémicos crónicos (U), 13 sanos (S) ó 8 neutrofilicos (N) fue incubada con el anticuerpo específico y la IMF se determinó por citometría de flujo. Los monocitos se identificaron por su posición característica en los gráficos de tamaño (FSC) versus complejidad (SSC) como se indica en la Figura 1A. Cada valor muestra el porcentaje de IMF, considerando como 100% la IMF de un control sano adulto procesado de la misma manera y al mismo tiempo. Las líneas horizontales representan el valor promedio para cada grupo.

A-



B-

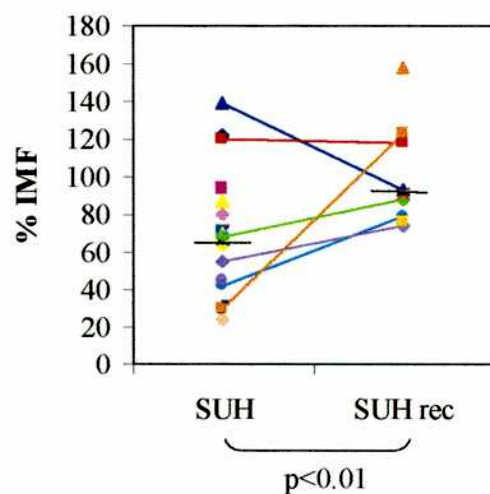


Figura 4.2.12. Expresión del marcador de activación CD11b en la membrana de los monocitos en circulación. **A-** Se evaluó la expresión del CD11b en los monocitos de los distintos grupos clínicos por citometría de flujo. Grupo SUH: $n=19$; grupo S: $n=28$; grupo U: $n=8$; grupo N: $n=15$. **B-** La expresión del CD11b también se evaluó en algunos pacientes con D+SUH luego del período agudo. Los símbolos del lado izquierdo corresponden a los pacientes en el período agudo (SUH) y los de la derecha luego de su recuperación clínica (SUH rec). Las líneas horizontales en ambos gráficos representan el valor promedio para cada grupo. Grupo SUH: $n=19$; grupo SUH rec: $n=10$.

Para determinar si la disminución de los marcadores anteriormente mencionados estaba relacionada con una función alterada de los monocitos en los pacientes con D+SUH, se realizaron experimentos de citotoxicidad utilizando las células mononucleares totales de los pacientes. Como muestra la **Figura 4.2.13**, los mononucleares de los niños con D+SUH mostraron una CCDA normal mientras que la citotoxicidad dependiente de IROs se encontró disminuida con respecto a los controles S, y un mes después del período agudo no se obtuvo recuperación de la función. Por otra parte, para los chicos U se observó que ambos tipos de citotoxicidad estaban significativamente aumentada con respecto a los D+SUH. Estos resultados preliminares indican que la población de monocitos en los pacientes con D+SUH presenta un fenotipo característico y diferente al normal, aunque estudios adicionales deben realizarse para poder explicar este fenómeno.

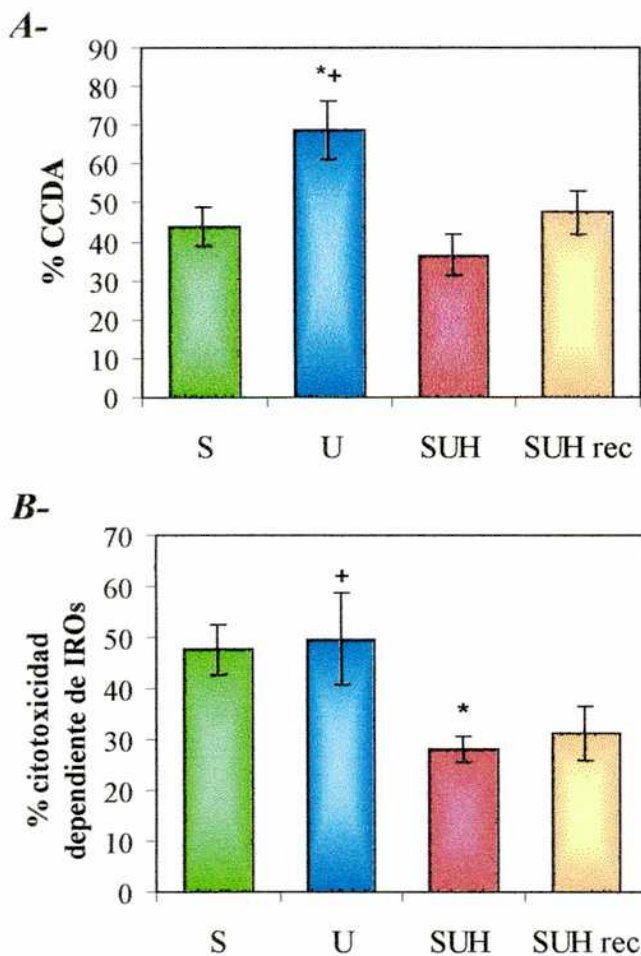


Figura 4.2.13. Citotoxicidad mediada por los mononucleares de pacientes con D+SUH. Las células mononucleares de pacientes y controles U y S se purificaron y 4×10^5 células se incubaron por 18 hs a 37°C con 2×10^5 eritrocitos sensibilizados marcados con ^{51}Cr (**A**) o con complejos inmunes OVA-anti OVA y 2×10^5 eritrocitos no sensibilizados marcados con ^{51}Cr (**B**), con el objetivo de medir la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) o la mediada por radicales libres del oxígeno (IROs), respectivamente. El porcentaje de citotoxicidad se calculó como se indica en materiales y métodos. Cada barra representa la media $\pm$ ES de 8-12 niños. * $p < 0.05$ comparado con los niños sanos (S), + $p < 0.05$ comparado con los pacientes con D+SUH cursando el período agudo.

Resumen capítulo 4.2:

1. Los PMNs de los pacientes con D+SUH en el período agudo presentan un fenotipo parcial de desactivación evidenciado por:
 - ❖ menor expresión en membrana de los marcadores de activación FcγRIII y CD11b
 - ❖ menor contenido total de MPO
 - ❖ menor capacidad citotóxica dependiente de anticuerpos
 - ❖ menor respuesta de degranulación frente a citoquinas inflamatorias (TNF- α , IL-8 y G-CSF)
2. La mayoría de los parámetros analizados presentan valores normales luego de la recuperación clínica
3. La población de PMNs de los pacientes cursando el período agudo presenta, en conjunto, características únicas y diferentes de las poblaciones utilizadas como control.
4. La Stx (Stx1 y Stx2) *in vitro* no se une a los PMNs de dadores adultos normales. La previa activación de estos PMNs no modifica este resultado.
5. La Stx2 *in vitro* en PMNs normales no afecta:
 - ❖ la expresión en membrana de las moléculas FcγRIII, CD11b y CD66b.
 - ❖ el contenido de MPO
 - ❖ el porcentaje de apoptosis
6. Los monocitos de los pacientes en el período agudo del D+SUH presentan disminución de la citotoxicidad dependiente de IROs y de la expresión de los marcadores FcγRI y CD11b.

4- Resultados



4.3- Estudio del papel del óxido nítrico (NO) y las plaquetas en el modelo murino de SUH.



4.3.1- Efecto del NO como modulador de la mortalidad inducida por la Stx2.

El NO es un mediador fisiológico que contribuye al mantenimiento de la homeostasis y de las propiedades antitrombogénicas del endotelio debido a su actividad vasodilatadora e inhibitoria de la adhesión y agregación plaquetaria. Sin embargo, altas concentraciones de NO producidas por la forma inducible de la óxido nítrico sintetasa (iNOS) durante una respuesta inflamatoria pueden resultar perjudiciales aumentando la vasodilatación y/o generando derivados que pueden causar injuria tisular.

Para determinar la participación del NO en la patogenicidad del SUH se trataron oralmente distintos grupos de ratones con inhibidores de la NOS o con su sustrato fisiológico, y 24 hs más tarde se les inyectó una LD50 de la Stx2 en forma endovenosa (1 ng/ratón). La sobrevivencia de los ratones fue evaluada a lo largo del tiempo. Como se indica en la **Figura 4.3.1A**, el pre-tratamiento de los animales con el inhibidor competitivo de la NOS, el L-NAME, aumentó la sensibilidad de los ratones a la Stx2 y acortó el tiempo promedio de muerte (Stx2: 121.9 ± 5.2 hs, Stx2+L-NAME: 91.2 ± 2.1 hs; $p < 0.01$). El enantiómero inactivo D-NAME no indujo cambios significativos en la tasa de mortalidad inducida por la Stx2. Por otro lado, la administración de inhibidores selectivos de la forma inducible de la NOS (iNOS), la aminoguanidina (AG) y el L-NIL, tampoco afectaron la toxicidad de la Stx2.

A continuación se evaluó el efecto del sustrato fisiológico de la NOS, la L-arginina (L-ARG) (**Figura 4.3.1B**). Si bien la L-ARG sola no tuvo ningún efecto en la toxicidad de la Stx2 (datos no mostrados), la administración de L-ARG en el grupo pre-tratado con el L-NAME previno la potenciación de la mortalidad inducida por la Stx2.

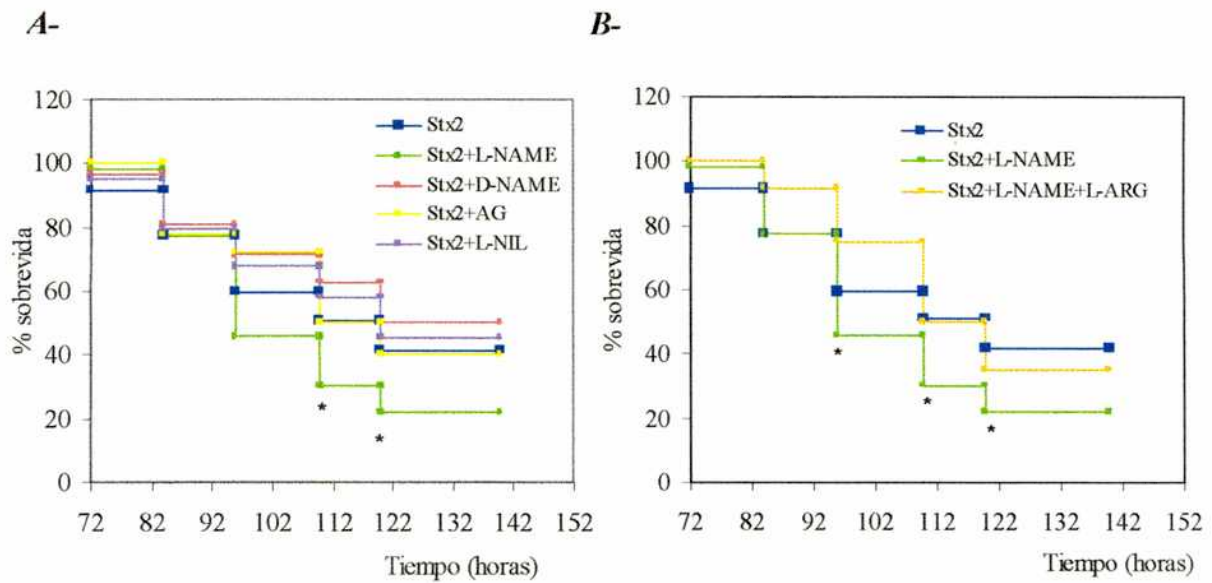


Figura 4.3.1. Efectos del NO en la modulación de la mortalidad inducida por la Stx2. **A-** Grupos de seis ratones fueron tratados con L-NAME, L-NIL, D-NAME o AG en el agua de bebida, desde 24 antes de la inyección de la Stx2 y durante todo el experimento. Los puntos muestran la media aritmética del porcentaje de supervivencia de siete experimentos. * $p < 0.01$ comparado con Stx2. **B-** Se evaluó la supervivencia en animales tratados con L-ARG simultáneamente con el L-NAME. *: $p < 0.05$ comparado con Stx2+L-NAME+L-ARG.

4.3.2- Niveles de urea en plasma.

Para determinar si los efectos potenciadores del L-NAME sobre la toxicidad de la Stx2 son mediados por un incremento en el daño renal específicamente inducido por la Stx2, se sangraron animales de los distintos grupos a las 48, 72 y 96 hs luego de la inoculación de la Stx2, y se determinaron los niveles de urea en el plasma. Como se muestra en la **Figura 4.3.2**, el grupo pre-tratado con el L-NAME mostró un incremento significativo de los niveles de urea plasmática con respecto al grupo inoculado con la Stx2 sola a las 72 y 96 hs. Por otra parte, y consistentemente con lo observado en los experimentos de mortalidad, la L-ARG previno el incremento observado en la urea del grupo pre-tratado con el L-NAME. Por lo tanto, la inhibición de la producción del NO estaría aumentando la sensibilidad a la Stx2 potenciando sus efectos tóxicos en el riñón. Ni la L-ARG ni el L-NAME por si solos indujeron variaciones en los niveles de urea plasmática (datos no mostrados).

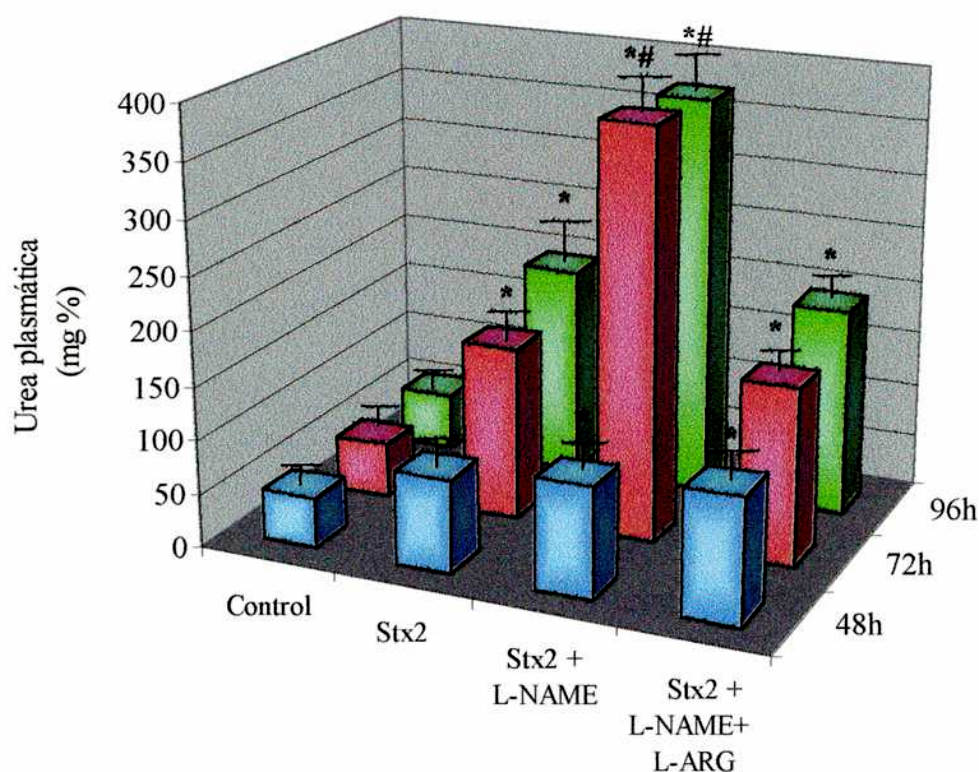


Figura 4.3.2. Concentración de urea plasmática. Los animales fueron tratados con L-NAME o L-NAME+L-ARG en el agua de bebida desde 24 hs antes de la inoculación de la Stx2. A distintos tiempos, los ratones fueron sangrados y se midió la urea en el plasma. Las barras representan la media $\pm$ ES de un experimento representativo de cinco (diez ratones por grupo). *: $p < 0.01$ vs. controles; #: $p < 0.01$ vs. Stx2, L-NAME y Stx2+L-NAME+L-ARG.

4.3.3- Efectos del tratamiento con Stx2 y L-NAME sobre la activación plaquetaria.

La disminución del número de plaquetas en circulación y la formación de trombos en la microvasculatura renal es un evento característico en los pacientes con SUH y contribuye a la disfunción renal. Siendo el NO un importante inhibidor de la activación plaquetaria, su ausencia podría exacerbar la mortalidad y daño renal inducidos por la Stx2 como consecuencia de un aumento en la activación plaquetaria. Se evaluó entonces la actividad plaquetaria en los distintos grupos experimentales. Los animales tratados con la Stx2 mostraron un mayor número de plaquetas a tiempos cortos (12

horas) comparado con el grupo control, mientras que en el grupo Stx2+L-NAME el aumento fue aún mayor (Tabla 4.3.1). Por otra parte, en ambos grupos se observó trombocitopenia a las 24 hs., la cual se mantuvo hasta las 72 hs.

Tabla 4.3.1.
Recuento plaquetario en animales inyectados con Stx2 y L-NAME

Tiempo	Control	Stx2	Stx2+L-NAME
12 h	8.46 ± 0.18	13.12 ± 0.67 *	17.80 ± 0.24 *+
24 h	8.66 ± 0.43	6.41 ± 0.35 *	5.93 ± 0.45 *
72 h	8.58 ± 0.66	6.96 ± 0.29 *	5.51 ± 0.71 *

Los datos están expresados en número de plaquetas x 10⁵/μl (media ± ES). El número de plaquetas fue determinado en el plasma rico en plaquetas (PRPs) de animales controles (n=5) y tratados (n=7) a diferentes tiempos luego de la inyección de Stx2. *: p<0.01, vs grupo control; +: p<0.02, vs Stx2.

Para determinar el estado de activación de estas plaquetas de circulación, se realizaron estudios de agregación plaquetaria utilizando ácido araquidónico (AA) y adenosina difosfato (ADP) como agonistas. En los ratones tratados con Stx2 se observó una mayor respuesta de las plaquetas al AA a las 24 hs post-inyección comparando con los animales controles. En el grupo pre-tratado con el L-NAME el aumento en el grado de activación se observó a tiempos más tempranos (12 hs), siendo, además, significativamente mayor comparado con el grupo de animales tratados con Stx2. Para ambos grupos, luego de la inicial activación se observó una marcada inhibición de la función plaquetaria, probablemente causada por un fenómeno conocido como agotamiento (Figura 4.3.3A). El mismo patrón de activación seguido de inhibición se obtuvo con el agonista ADP (Figura 4.3.3B). En resumen, las plaquetas de los animales tratados con la Stx2 y Stx2+L-NAME se encontraron claramente activadas a las 24 hs post-inoculación, mientras que a tiempos más largos (48 y 72 hs) se observó una franca inhibición, significativamente más pronunciada para el grupo pre-tratado con L-NAME. Estos resultados sugieren que la Stx2 causa una activación plaquetaria temprana seguida por un agotamiento de la función y que la inhibición de la producción de NO mediada por el L-NAME acelera y exacerba estos procesos.

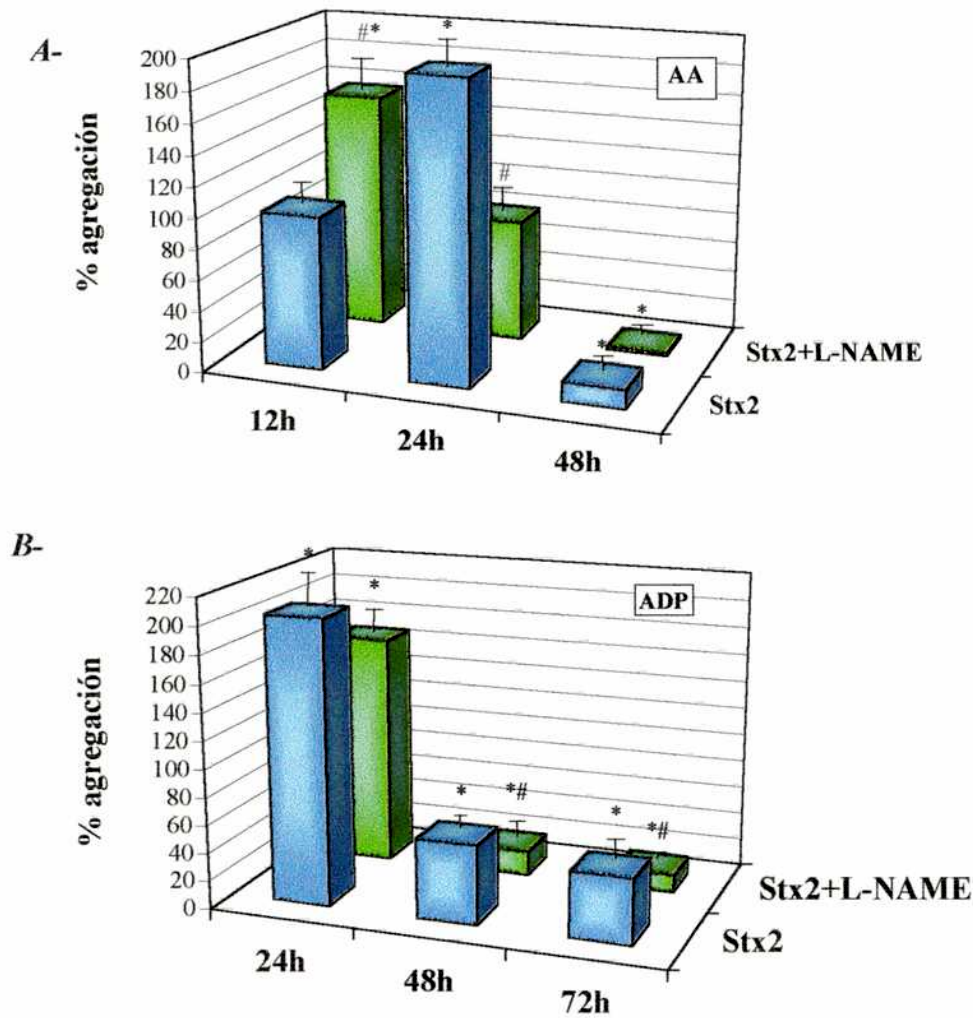


Figura 4.3.3. Agregación plaquetaria inducida por el tratamiento con la Stx2 y su modulación por L-NAME. Los PRPs de ratones tratados con la Stx2 y L-NAME fueron obtenidos a distintos tiempos y la respuesta a los agentes AA (A) y ADP (B) fue medida como se indica en materiales y métodos. Las barras corresponden a la media $\pm$ ES del porcentaje de agregación de un experimento representativo de cinco. Los resultados fueron expresados tomando como 100% la agregación obtenida para los ratones control. *: $p < 0.01$ vs control; #: $p < 0.05$ vs Stx2.

4.3.4- La inhibición de la NOS potencia la degranulación de las plaquetas inducida por Stx2.

Como otra medida de activación plaquetaria se determinó el contenido intracitoplasmático de ADP, presente en los gránulos primarios de las plaquetas, en

animales tratados con Stx2 y el inhibidor de la NOS, el L-NAME. Para ello se utilizó la tinción con mepacrina que fue evaluada por citometría de flujo. Si bien se observó una disminución del contenido de ADP en los animales tratados con Stx2 a las 48 y 72 hs post-inyección (**Figura 4.3.4A**), no se observaron diferencias entre este grupo y el pre-tratado con L-NAME. Esto podría deberse a que el efecto potenciador del L-NAME se encuentra enmascarado por la alta dosis de Stx2 usada. Por lo tanto, para determinar si el pre-tratamiento con el L-NAME provoca una potenciación en la acción de la Stx2, se utilizó una menor dosis de Stx2 (100 pg/ratón), la cual por si misma no causa ningún efecto en la degranulación de las plaquetas. Los resultados que se muestran en la **Figura 4.3.4B** indican que la degranulación inducida por el tratamiento de Stx2+L-NAME se hace evidente, sugiriendo que el L-NAME es capaz de potenciar la degranulación de plaquetas inducida por la Stx2. Nuevamente, el efecto del L-NAME fue prevenido por la adición de L-ARG. Cabe destacar que ni el L-NAME ni la L-ARG solos indujeron cambios en la activación o degranulación de las plaquetas.

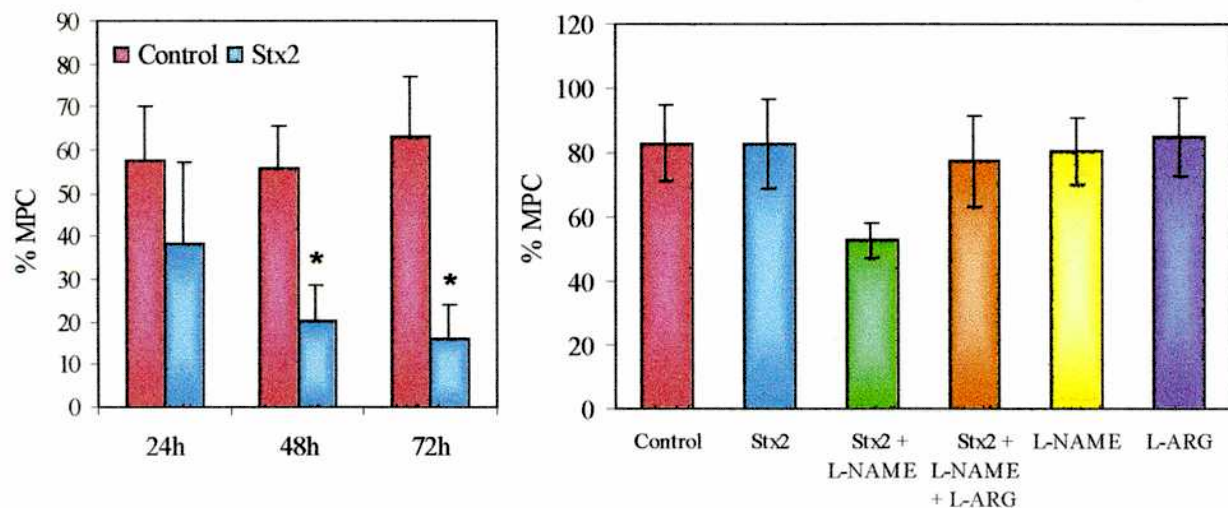


Figura 4.3.4. Tinción con mepacrina de plaquetas de ratones tratados con la Stx2; modulación por L-NAME. Cada barra representa la media $\pm$ ES del porcentaje de células positivas para mepacrina (% MPC) determinado por citometría de flujo de un experimento representativo de cinco. **A-** Los animales fueron tratados con 1 ng de Stx2, las plaquetas obtenidas a distintos tiempos y teñidas con mepacrina. * $p < 0.01$ comparado con los controles. **B-** Los ratones fueron inyectados con 100 pg de Stx2 o tratados con distintos moduladores de la NOS. Las plaquetas fueron obtenidas a las 48 hs luego de la inyección con la toxina y teñidas con mepacrina. *: $p < 0.05$ comparado con el grupo control, el grupo tratado con Stx2 y el tratado con Stx2+L-NAME+L-ARG.

4.3.5- Examen histológico.

Con el objetivo de evaluar histológicamente el daño inducido y exacerbado por la Stx2 y el L-NAME, respectivamente, se examinaron los riñones de ratones sometidos a estos tratamientos. En el grupo Stx2 se observó una moderada a severa hiper celularidad mesangial (**Figura 4.3.5C**) con engrosamiento del epitelio tubular y disrupción de la membrana basal (**Figura 4.3.5D**). En el grupo Stx2+L-NAME se observó trombosis glomerular distribuida difusamente a través de la corteza con extensas áreas de necrosis tubular (**Figura 4.3.5E**). En la **Figura 4.3.5F** se muestra en detalle la presencia material amorfo intracapilar PAS-positivo, consistente con formaciones trombóticas ^{207,208}. La administración de L-ARG redujo el grado de lesión tisular en los animales tratados con Stx2+L-NAME (datos no mostrados). Los ratones tratados sólo con L-NAME presentaron alteraciones mínimas en la arquitectura renal con leve dilatación capilar y congestión intersticial.

Para confirmar la presencia de trombos en el interior de los capilares glomerulares se realizó una inmunomarcación para fibrinógeno utilizando un anticuerpo específico anti-fibrinógeno. La **Figura 4.3.6A** muestra el porcentaje de glomérulos comprometidos en cada grupo experimental. Mientras que en los ratones tratados con Stx2 casi la mitad de los glomérulos presentó signos de trombosis (**Figura 4.3.6B**), en el grupo Stx2+L-NAME se observó un marcado aumento del fenómeno trombótico, abarcando casi a la totalidad de los glomérulos (**Figura 4.3.6C**). Los insertos dentro de las fotografías muestran a gran aumento la distribución de la marca en el interior de los capilares glomerulares, tanto sobre la pared vascular u ocluyendo los mismos.

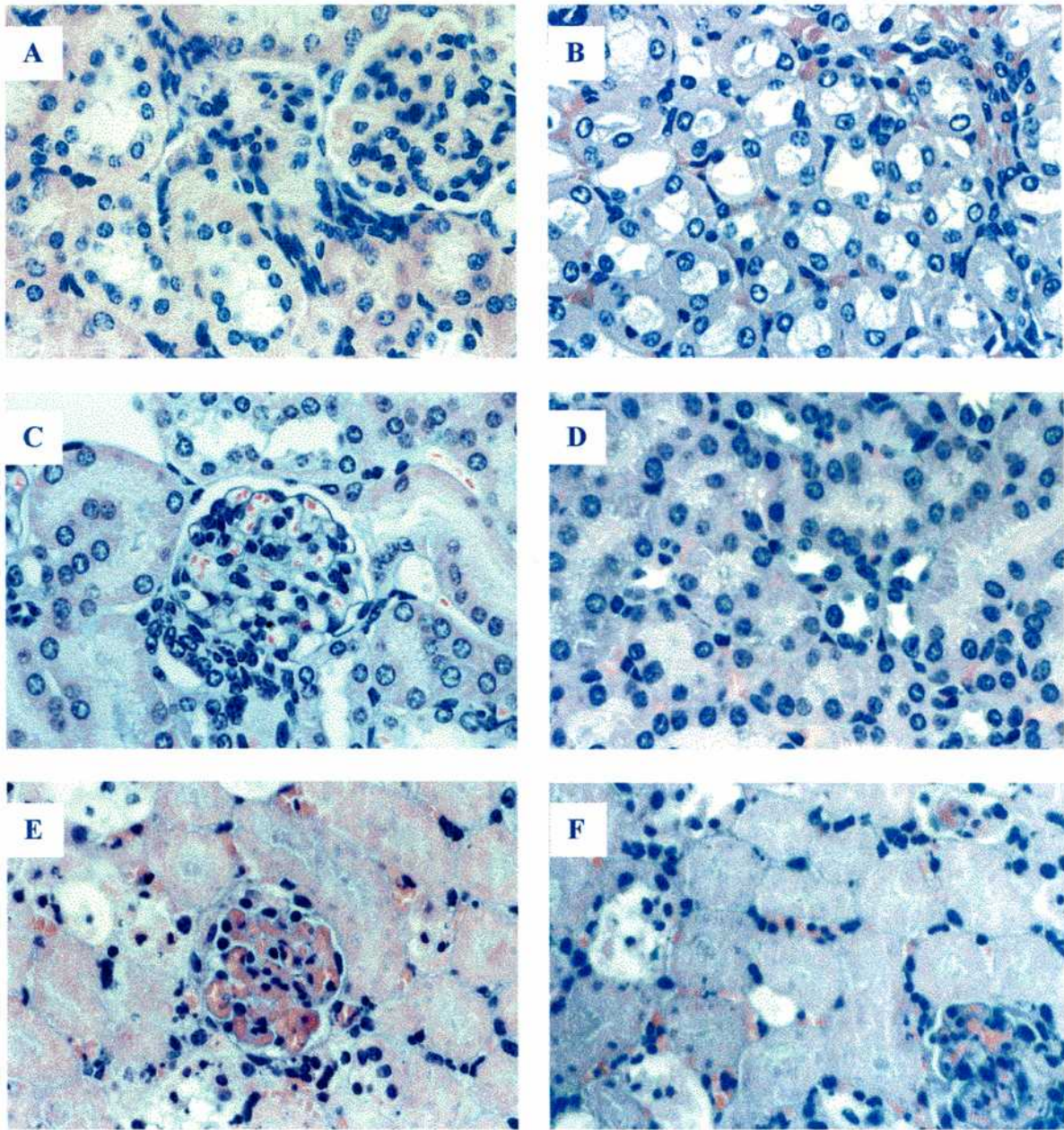


Figura 4.3.5. Histología de riñón de animales controles, tratados con Stx2 y con Stx2+L-NAME (H-E y PAS). Aumento: x400. A las 72 hs luego de la inyección de la Stx2 el tejido renal fue obtenido y procesado según se indica en materiales y métodos. **A y B-** Secciones de riñón de animales control. Se observa histología normal con arquitectura renal conservada. **C y D-** Histología renal de animales tratados con la Stx2. En la zona cortical se observa hiper celularidad mesangial y glomerular moderada y capilares glomerulares con formación incipiente de trombos (**C**) y epitelio tubular engrosado, con pérdida de las microvellosidades apicales y disrupción de la membrana basal (**D**). **E y F-** Los animales pre-tratados con el L-NAME mostraron glomérulos con hiper celularidad mesangial, crecencia y trombosis capilar evidente, rodeados por túbulos corticales con necrosis epitelial aguda (**E**) pérdida de la arquitectura tubular cortical debida a necrosis (**F**).

A- Porcentaje de glomérulos afectados

	Control	Stx2	Stx2+ L-NAME	Stx2+L-NAME+L-ARG	L-NAME
Media $\pm$ ES	2,0 $\pm$ 1,8	41,9 $\pm$ 14,9 *	97,4 $\pm$ 2,5 *#	54,5 $\pm$ 14,8 *	4,7 $\pm$ 3,0

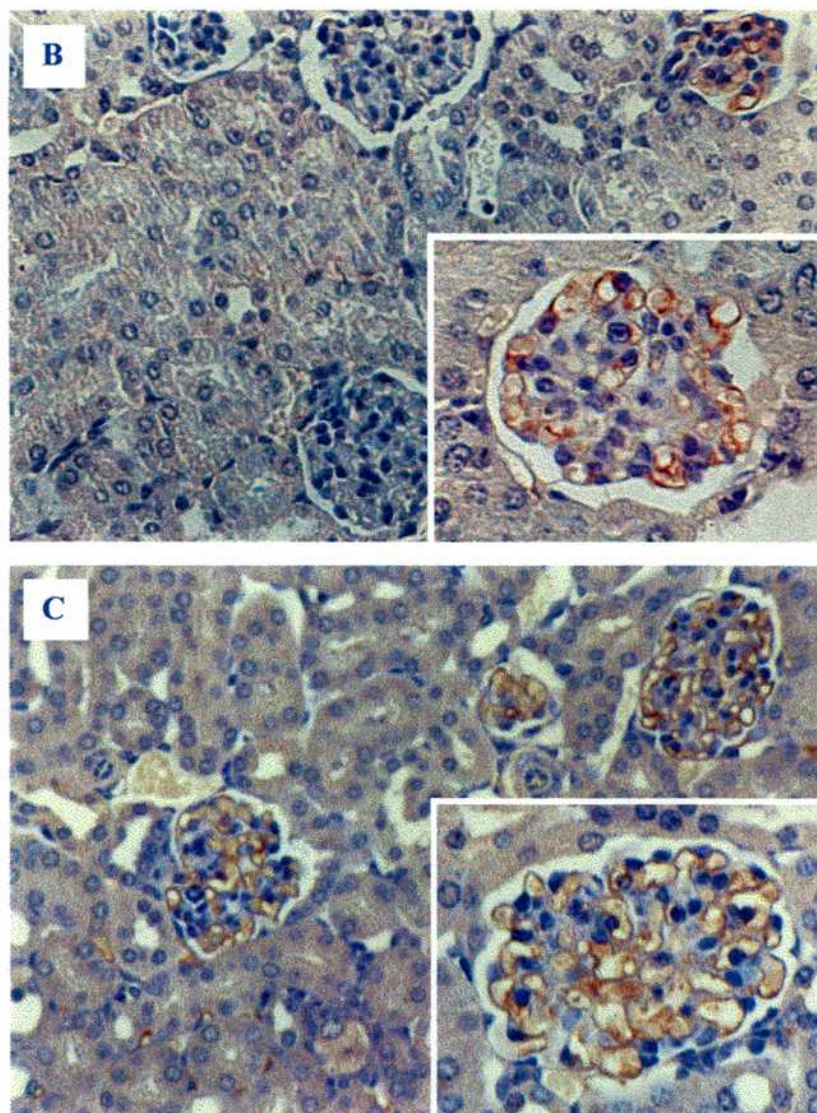


Figura 4.3.6. Inmunomarcación para fibrinógeno. **A-** En cada grupo experimental se contó un promedio de 100 campos (x400) y se determinó el porcentaje ($\pm$ ES) de glomérulos marcados positivamente para fibrinógeno. *: $p < 0.001$, vs controles y vs L-NAME; #: $p < 0.0125$, comparado con Stx2 y con Stx2+L-NAME+L-ARG. **B-** Sección renal de ratón tratado con Stx2, mostrando 1 de 4 glomérulos positivamente marcado para fibrinógeno (flecha) (x250). El inserto muestra que el anticuerpo anti-fibrinógeno ha detectado específicamente la trombosis dentro de los capilares glomerulares (x400). **C-** Sección renal de ratón tratado con Stx2+L-NAME, donde cada glomérulo está marcado positivamente (x250). El inserto muestra un glomérulo con material altamente coloreado, tanto depositado sobre la pared vascular como ocluyendo el lumen (x400).

4.3.6- Generación del metabolitos derivados del NO inducidos por la Stx2.

Para determinar el efecto de la inyección de Stx2 sobre la vía L-ARG-NO se evaluó la generación de los metabolitos derivados del NO, NO_2^- más NO_3^- , en el suero de ratones controles y tratados con la Stx2, 24 y 48 hs luego de la inyección de la toxina. Como muestra la **Tabla 4.3.2**, se encontró un aumento significativo en los niveles de NO a las 48 hs luego de la inoculación de Stx2. En tiempos tempranos (24 hs) no se observaron variaciones en la concentración de NO. Por otra parte, el pre-tratamiento de los ratones con el inhibidor de la NOS, el L-NAME, revirtió el efecto causado por la Stx2 en la producción de NO. Cabe aclarar que, en concordancia con trabajos previos¹⁹¹, la administración del L-NAME solo, no produjo cambios en los niveles séricos de NO.

Tabla 4.3.2.
Generación de metabolitos derivados del NO en respuesta a la Stx2

Grupo	$[\text{NO}_2]^-$ en suero (mM, media $\pm$ ES)	n
Control	5.1 $\pm$ 1.1	12
Stx2	9.4 $\pm$ 3.0 *	12
L-NAME	4.9 $\pm$ 0.7	12
Stx2+L-NAME	5.2 $\pm$ 2.3 +	12

La concentración total de nitritos ($[\text{NO}_2]^-$) fue determinada en suero de animales tratados con Stx2, L-NAME o Stx2+L-NAME, 48 hs luego de la inyección de Stx2 *: $p < 0.05$ vs. grupo control; +: $p < 0.05$ vs. grupo tratado con Stx2.

4.3.7- Participación de las plaquetas en la acción de la Stx2 y el L-NAME.

El papel de las plaquetas en el efecto tóxico del tratamiento con Stx2 y su potenciación por el L-NAME fue evaluado a través de la eliminación de las plaquetas y posterior análisis de la sobrevida. La depleción de plaquetas se mantuvo durante todo el experimento por inoculación seriada de un antisuero policlonal obtenido en conejo cada

12 hs desde 4 hs previas a la inoculación de la Stx2. En la **Figura 4.3.7** se observa que la mortalidad inducida por la Stx2 en los animales a los cuales se les eliminaron las plaquetas, no varió significativamente con respecto a la exhibida en los animales con plaquetas. Sin embargo, la mayor sensibilidad a la Stx2 inducida por la administración simultánea del L-NAME fue anulada en los animales que carecían de plaquetas. Estos resultados sugieren que las plaquetas no serían un componente primario en la patogénesis de la Stx2, pero estarían involucradas en el efecto potenciador del L-NAME, probablemente a través de la formación de trombos.

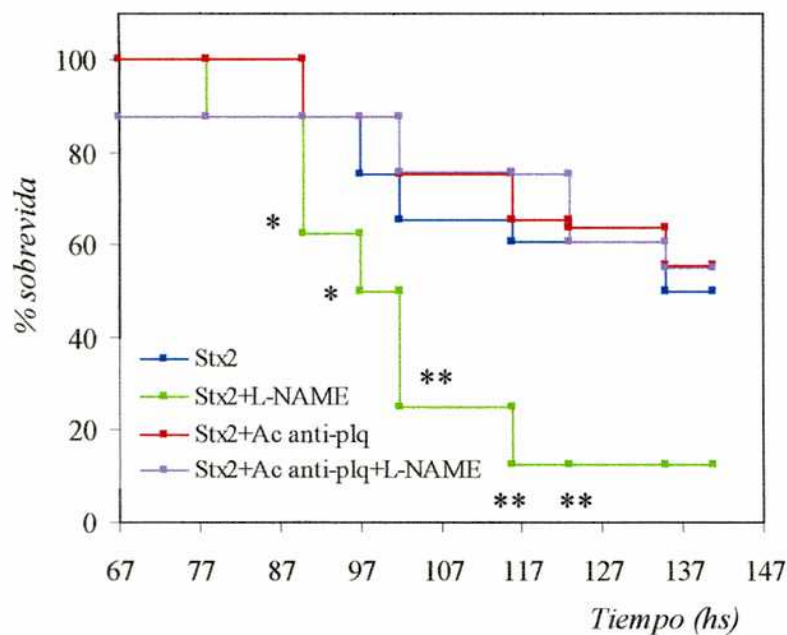


Figura 4.3.7. Efecto de la depleción de plaquetas en la mortalidad inducida por Stx2. Los ratones fueron inyectados con un anticuerpo anti-plaquetas (anti-plq) 4 hs antes, en el momento de la inyección de la Stx2 y cada 12 hs, de manera de mantener bajo el número de plaquetas. La sobrevida fue evaluada a lo largo del tiempo. Los puntos representan la media de 18 animales por grupo. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ comparado con el grupo Stx2 + Ac anti-plq + L-NAME.

4.3.8- Efecto de la inhibición de la producción de NO sobre la neutrofilia inducida por la Stx2

Con el objetivo de evaluar la relación entre la neutrofilia inducida por la Stx2 y la potenciación de la mortalidad observada al inhibir la NOS, se determinó el porcentaje de

PMNs en sangre periférica en ratones tratados con Stx2 en combinación con L-NAME. Como se observa en la **Figura 4.3.8** la inyección de Stx2 provocó la anteriormente descrita neutrofilia a las 72 hs post-inoculación. Ni la inhibición de la producción de NO, ni la administración de L-ARG modificaron este efecto. En tiempos más tempranos (24 y 48 horas) no se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de PMNs entre los grupos tratados con la Stx2 y Stx2+L-NAME (datos no mostrados). Cabe destacar que el L-NAME, cuando se administró solo, provocó un aumento significativo en el porcentaje de PMNs comparando con el grupo control, como se ha descrito previamente²⁰⁹. Estos resultados sugieren que la neutrofilia y los efectos potenciadores de la toxicidad de la Stx2 mediados por la inhibición de la producción de NO, serían dos fenómenos independientes.

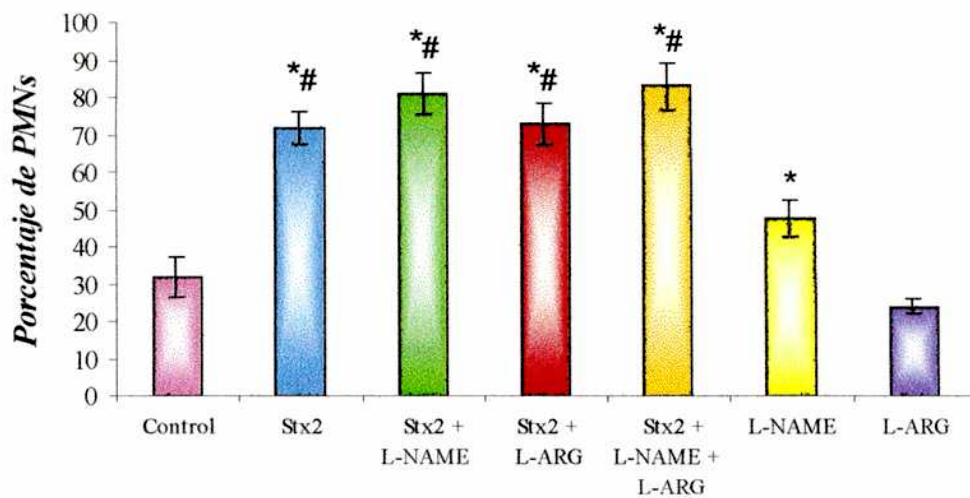


Figura 4.3.8. Efecto de la inhibición de la NOS en la neutrofilia observada 72 horas luego de la inoculación de la Stx2. Grupos de 6 ratones fueron tratados con L-NAME y/o L-ARG previamente a la inyección de la Stx2. El porcentaje de PMNs fue determinado en sangre periférica. Las barras representan la media $\pm$ ES de tres experimentos. *: $p < 0.05$ vs grupo control; #: $p < 0.05$ vs. L-NAME solo.

Resumen capítulo 4.3:

1. La inyección de Stx2 en el ratón provoca una disminución en el número de plaquetas (trombocitopenia) y un aumento temprano en la función de las mismas con posterior inhibición (fenómeno de plaquetas exahustas).
2. La inhibición de la producción de NO en los animales tratados con Stx2 provoca:
 - ❖ exacerbación de la mortalidad
 - ❖ aumento del daño renal (urea plasmática e histología)
 - ❖ aceleración del proceso de activación plaquetaria
3. Los animales tratados con Stx2 presentan daño glomerular evidenciado por la presencia de trombos (marcación con fibrinógeno). Este proceso es exacerbado en ausencia de NO.
4. La ausencia de plaquetas no modifica la mortalidad en respuesta a la Stx2 pero anula la potenciación de la toxicidad causada por la inhibición de la producción de NO.

Estos resultados indican una activa participación del NO constitutivo en el mantenimiento de la hemostasia y del estado antitrombótico en respuesta a un estímulo trombogénico como la Stx2.

5- Discusión y conclusiones



El modelo murino por inyección endovenosa de Stx resulta sumamente útil para el estudio de los efectos directos de la Stx independizándose de los de los LPS, que acompañan indefectiblemente las infecciones naturales que dan lugar al SUH. Más aún, existen algunas similitudes muy importantes entre los fenómenos asociados a la enfermedad en el humano y los síntomas observados en el ratón luego de la inoculación de la toxina pura, lo cual convalida el modelo murino para el estudio de ciertos aspectos del SUH. Algunas de estas semejanzas son descriptas y caracterizadas por primera vez en este trabajo, como por ejemplo la neutrofilia, la trombocitopenia y el daño trombótico glomerular.

Otro aspecto interesante del modelo utilizado es que nos permitió estudiar los acontecimientos tempranos del desarrollo del SUH, ya que los pacientes se presentan al hospital con la enfermedad declarada y el estudio de distintos aspectos de la fase inicial se hace imposible. En este sentido, el estudio cinético del número de leucocitos de sangre periférica en los ratones luego de la inyección de la Stx2 pura reveló un aumento gradual pero sostenido en el número y porcentaje de PMNs que se mantuvo hasta el momento de la muerte de los animales, sin afectar otras poblaciones leucocitarias. Por otra parte, la correlación observada entre el daño renal (medido por la urea plasmática) y el porcentaje de neutrófilos, apunta a los PMNs como un posible factor importante, directo o indirecto, asociado al daño y desarrollo del SUH.

En nuestro modelo la importancia de los PMNs como factor adicional a la injuria causada por la toxina queda demostrada en los experimentos de depleción, donde la ausencia de PMNs reduce de forma significativa la mortalidad y daño renal de los animales inoculados con la toxina. Esto sugiere que la neutrofilia, asociada a un mal pronóstico en el SUH, no sería un epifenómeno sino que estaría asociada directamente al daño renal producido. Cabe destacar, que la depleción de PMNs en el sistema podría afectar el balance de otros factores que modulen la toxicidad de la Stx2 y de esta manera, el efecto de protección por depleción sería indirecto.

En cuanto a los LPS, trabajos anteriores en ratones y conejos revelan que la administración de los mismos puede potenciar los efectos tóxicos de la Stx, evidenciados en un mayor porcentaje de muerte y un aumento en el daño renal ^{23,24}. Los resultados presentados en este trabajo indican que la potenciación de los efectos de la Stx mediada por los LPS también se traducen en un aumento de la neutrofilia observada. Debido a la capacidad de los LPS de provocar la secreción de citoquinas de distintos tipos celulares y modular la expresión de moléculas de superficie de las células endoteliales provocando una mayor adhesión de los PMNs ^{210,211}, el aumento en el porcentaje de PMNs en respuesta a los LPS podría estar influyendo en la exacerbación del daño mediada por los mismos.

Diversos trabajos han demostrado la participación de los PMNs en el daño endotelial a través de la generación de diversos mecanismos extracelulares citotóxicos (liberación de proteasas, radicales libres del oxígeno, citoquinas, etc.) como consecuencia de su activación ²¹²⁻²¹⁴. La activación de los PMNs periféricos luego de la inoculación de la Stx2 en nuestro modelo se evidenció por los aumentos significativos de la expresión del marcador de activación CD11b, el mecanismo citotóxico dependiente de anticuerpos, la adhesión al endotelio pulmonar y la disminución en la migración a un sitio inflamatorio. Este último aspecto se explica ya que si los PMNs son activados en la periferia los cambios estructurales que ellos experimentan determinan que queden retenidos en la vasculatura sin poder migrar a los tejidos ²¹⁵. Más aún, diversos estudios demuestran que la unión de la IL-8 a los PMNs en periferia causa el secuestro de los PMNs en la microvasculatura e impide el tráfico de los mismos a sitios extravasculares ^{216,217}. La participación de la IL-8 en la fisiopatología inducida por la Stx en los ratones es un hecho que todavía no hemos investigado, pero la presencia de esta citoquina en el suero de los pacientes, sumado a sus efectos inductores de neutrofilia y moduladores de la función de los PMNs, la hacen una buena candidata para el estudio futuro en el modelo murino.

La caracterización de distintos marcadores de activación de PMNs en los pacientes con D+SUH reveló una disminución significativa en el FcγRIII (CD16) y en la

integrina CD11b comparado con la población de niños sanos que se llevó como control. Ambos marcadores retornaron a los valores normales tras la recuperación clínica de los pacientes. Por otra parte, cuando se investigó la degranulación en los PMNs de pacientes con D+SUH, el contenido total de la enzima MPO se encontró disminuido evidenciando un proceso de degranulación previo. Este resultado es coincidente con los niveles elevados de elastasa encontrada en el suero de los pacientes, la cual se encuentra en el mismo tipo de gránulo que la MPO ²¹⁸. La molécula CD66b, otro marcador de degranulación, presentó una gran dispersión en los diferentes grupos clínicos estudiados, por lo cual no se observaron diferencias significativas en la media de su expresión en membrana. Los marcadores medidos se encuentran, en gran parte, acumulados en gránulos intra-citoplasmáticos y son liberados o se expresan en la membrana celular cuando el PMN es activado. La degranulación del PMN incluye la liberación del contenido de los gránulos (como en el caso de la MPO) y el aumento en la membrana plasmática de la expresión de moléculas presentes en la membrana de los gránulos (FcγRIII y CD11b). La cinética y la magnitud del estímulo movilizado para cada tipo de gránulo son distintas. Así, las vesículas secretorias (donde se encuentran los marcadores FcγRIII y CD11b) son liberadas rápidamente mientras que los gránulos secundarios o específicos y los primarios o azurófilos, donde se encuentra el pool intracelular de CD66b y MPO, respectivamente, requieren de períodos más prolongados y/o estímulos más fuertes para ser movilizados ^{120,122,218}. Por otra parte, ambas moléculas FcγRIII y CD11b, pueden ser clivadas (“shedding”) de la superficie celular luego de su sobre-expresión, lo que llevaría primero a un aumento en la expresión del marcador en la membrana plasmática con posterior disminución ²¹⁹⁻²²¹. En este sentido, el corte por proteasas plasmáticas, como la elastasa ^{29,30}, también podría influir en el mecanismo de disminución del FcγRIII en la membrana ya que ha sido demostrado que la adición exógena de esta proteasa, corta el FcγRIII de la superficie celular ^{222,223}. La gran dispersión encontrada para el CD66b podría reflejar distintos estadios en el proceso de degranulación, donde un aumento en la expresión de membrana sería posterior a la disminución en la expresión del FcγRIII o CD11b y permanecería por más tiempo, mientras que la disminución podría implicar un proceso posterior de shedding o de re-internalización del marcador. Para estudiar la disminución del contenido de los gránulos

específicos, se podría determinar alguna otra enzima típica de estos gránulos, como la lactoferrina o la proteína que une vitamina B12.

Al evaluar las funciones citotóxicas dependientes de los FcγR en los PMNs de los pacientes, encontramos que la CCDA se encontró disminuida, lo que se podría relacionar con la disminución de los marcadores FcγRIII y CD11b, este último involucrado en la modulación de las funciones efectoras de los FcγR¹⁹⁹. Al evaluar la citotoxicidad dependiente de IROs no se encontraron diferencias significativas con respecto a la respuesta de los niños sanos. Estos resultados concuerdan con los encontrados por Hughes *et al*, quienes evaluaron el estallido respiratorio (generación de IROs) de los PMNs de pacientes con D+SUH y no encontraron diferencias significativas con respecto a los niños controles²²⁴. En resumen, los resultados obtenidos de la caracterización fenotípica y funcional de los PMNs periféricos de los pacientes con D+SUH revelan un fenotipo de parcial agotamiento con disminución en la actividad funcional en el momento de la evaluación.

Esto podría ser consecuencia de un fenómeno previo de activación y degranulación o de la presencia de moduladores negativos en el entorno celular. La menor expresión en membrana (respuesta de degranulación) obtenida para los marcadores CD66b y CD11b en respuesta a las citoquinas TNF-α, IL-8 y G-CSF en los PMNs de los pacientes con D+SUH comparado con la de niños sanos sugieren una disminución del pool intra-citoplasmático de los marcadores mencionados. Cabe destacar que esta disminución en la respuesta podría también involucrar otros mecanismos: desensibilización de los receptores de las citoquinas utilizadas, menor número de receptores en membrana, impedimentos en la transducción de la señal, etc. La menor respuesta para la IL-8 probablemente también involucre un fenómeno de desensibilización, ya que se ha demostrado la pérdida de la expresión y función del receptor tipo 2 (CXCR-2) de la IL-8 luego de la incubación de los PMNs con esta citoquina^{225,226}, la cual posee importantes funciones modulatorias de PMNs y se encuentra consistentemente aumentada en el suero de los pacientes con D+SUH^{27,44,227}. La medición directa de los receptores para estas citoquinas en la membrana de los PMNs de los pacientes ayudaría a dilucidar si este es el mecanismo involucrado en la menor

respuesta de degranulación encontrada. Sin embargo, el hecho de que exista una fuerte correlación positiva entre las respuestas obtenidas con las distintas citoquinas hace pensar en un mecanismo depresor más general o en el agotamiento.

Por otra parte, el patrón de respuesta de los PMNs de los pacientes, puede responder a la presencia de moléculas en el suero de los pacientes que modifiquen el fenotipo y la función de los PMNs. Entre ellas podemos mencionar las denominadas toxinas urémicas, los LPS, la IL-8, el G-CSF y las citoquinas antiinflamatorias IL-10 y IL-1ra encontradas en el suero de los pacientes con D+SUH ^{42,44,227}, que podrían interactuar generando, en conjunto, el escenario que da como resultado el patrón observado en los PMNs.

La modulación de las funciones de los PMNs por toxinas urémicas ha sido descrita en pacientes urémicos en hemodiálisis o diálisis peritoneal ambulatoria. Más aún, un número importante de estas sustancias ha sido aislado del suero de estos pacientes e identificado, y sus efectos sobre los PMNs estudiados. Mientras que algunas de estas toxinas urémicas aumentan la quimiotaxis y la toma de glucosa en PMNs normales, otras inhiben estas funciones y provocan una disminución en la capacidad fagocítica y bactericida de los PMNs ^{205,206}. Considerando que los pacientes con D+SUH presentan niveles elevados de urea en sangre, el efecto de estas toxinas urémicas puede ser relevante en el comportamiento de los PMNs de los niños con D+SUH. Para dilucidar este punto, una población de niños urémicos crónicos fue incluida en nuestro estudio. Al comparar los datos de los marcadores obtenidos para los pacientes con D+SUH y los niños urémicos crónicos no se observaron diferencias significativas. Sin embargo, mientras que las funciones citotóxicas de los niños urémicos se encontraron aumentadas con respecto a los niños sanos, en los pacientes con D+SUH la CCDA se encontró disminuida y la dependiente de IROs no se encontró alterada, como se mencionó anteriormente. Por otra parte, la incubación de urea con PMNs de individuos normales no modificó ninguno de los parámetros evaluados, aunque esto no implica que derivados de la urea presentes en el suero de los pacientes, puedan tener efectos sobre los PMNs.

La presencia de citoquinas antiinflamatorias en el suero de los pacientes revelan un estadio previo de inflamación donde los PMNs habrían sido activados. Probablemente, esta activación sea el producto de la liberación de mediadores inflamatorios provenientes del endotelio dañado por la acción de la Stx y los LPS y de las plaquetas activadas. Para determinar la relevancia de las moléculas presentes en el suero de los pacientes como moduladoras de la función de los PMNs, actualmente estamos investigando la influencia de sueros de pacientes y controles sobre PMNs normales.

El patrón de activación observado en los PMNs en el modelo murino, así como en los pacientes podría ser una consecuencia directa o indirecta de la interacción de la toxina con este u otro tipo celular. La interacción directa de PMNs humanos con la Stx conjugada con FITC ha sido demostrada por Te Loo *et al* ¹⁶. Dos observaciones complementarias realizadas por nosotros nos hacen dudar de los efectos directos de la Stx sobre los PMNs. Primero, la Stx-FITC no fue capaz de unirse a los PMNs de ratón (resultados no mostrados) y sin embargo la activación de este tipo celular en el modelo murino es clara. Segundo, en nuestras condiciones experimentales, ninguna de las dos variantes de la toxina sin marcar se unió a PMNs humanos de individuos normales. Ni la previa adhesión a fibrinógeno ni la activación de los PMNs por estimulación con TNF- α , indujeron la unión de la toxina a estas células. Más aún, no se observó ningún efecto en la apoptosis o en la expresión en membrana de marcadores de activación al incubar *in vitro* PMNs con la Stx2. Estos resultados indican que los efectos de la toxina sobre los PMNs involucran mecanismos indirectos, probablemente mediados por el daño endotelial que acompaña el desarrollo del SUH. Existen diversas peculiaridades en el trabajo de Te Loo *et al.* que pueden explicar las diferencias observadas entre nuestros resultados y los de ellos. La constante de afinidad entre la Stx y los PMNs reportada por su trabajo es relativamente baja ($K_d=10^{-8}$ nM). Esta constante indica que la concentración de Stx necesaria para que un 50% de los PMNs tengan unida la Stx es del valor del K_d , y por tratarse de un equilibrio si se requiere esa concentración para que este la toxina unida, esa misma concentración de toxina debería estar presente en el plasma. Hasta el momento no se ha podido encontrar toxina libre en el plasma de los pacientes con

D+SUH. La introducción de una molécula de FITC en una proteína puede causar cambios conformacionales o impedimentos estéricos en residuos involucrados en la unión a su receptor y/o alteraciones en la función. Tal es el caso de la actina donde la adición del FITC bloquea la polimerización^{228,229}, o el caso de la histona H5 y la toxina de cobra que varían su punto isoelectrico con el agregado de la molécula de FITC^{230,231}. El marcado de insulina con FITC provoca cambios en la función biológica (ensayos de autofosforilación) dependiendo de en que residuo se haya unido la molécula de FITC²³². Es decir, en el caso de la Stx, el agregado de FITC podría estar aumentando la afinidad de la toxina por el supuesto receptor en los PMNs, mientras que en la Stx sin conjugar la afinidad sería menor y la unión a los PMNs irrelevante.

Como ya se mencionó anteriormente, un aspecto similar observado entre el modelo murino y los pacientes es la presencia de neutrofilia. En general, la neutrofilia se observa tanto por cambios fisiológicos (estrés, ejercicio, embarazo, etc.) como patológicos (infecciones, hemorragias, cáncer, envenenamiento, enfermedades autoinmunes, etc) y puede ser consecuencia de una aceleración de la maduración y/o temprana entrada a circulación de los PMNs de médula ósea, de la liberación de los PMNs adheridos a los vasos sanguíneos (que constituyen el denominado pool marginal) o de una disminución en la migración a los tejidos²³³. Estos procesos también pueden estar asociados con una disminución en la apoptosis de los PMNs que permanecerían más tiempo en la circulación. Diversos estudios revelan que la neutrofilia observada luego de la administración de bacterias o productos bacterianos es consecuencia de una aceleración de la liberación de los PMNs de la médula ósea^{196,234-236}. Debido a la naturaleza infecciosa del D+SUH un aumento en el número de PMNs en circulación no es sorprendente. Sin embargo, nuestro modelo murino por inoculación de la Stx2 pura, demuestra que la toxina, por si sola, es capaz de generar neutrofilia. Al investigar la procedencia de estos PMNs, determinando la cantidad de mieloperoxidasa (MPO) en médula ósea por dos metodologías diferentes, no encontramos diferencias significativas entre los animales inyectados con Stx2 con respecto de los animales controles. Sin embargo, considerando que en nuestro sistema la neutrofilia se presenta como un fenómeno gradual, el aumento en la liberación de PMNs de médula ósea podría ser

compensado por un aumento en su producción y de esta forma la detección de la enzima MPO podría no ser el mejor parámetro para evidenciar estos fenómenos. Por otra parte, la contribución a la neutrofilia como consecuencia de una movilización de PMNs del pool marginal no puede ser descartada ²³⁷. Estudios con agentes que marcan las células en división de médula ósea, como el 5'-bromo-2-deoxiuridina (BrdU), serían convenientes para aclarar este aspecto ^{235,237,238}.

La neutrofilia observada en los pacientes con D+SUH podría también contribuir al fenotipo observado en sus PMNs aportando células inmaduras y/o con un fenotipo diferente al normal en circulación. Así, factores que provocan neutrofilia y que podrían estar asociados al curso de la enfermedad, como el G-CSF o la IL-8, afectan la expresión de marcadores de superficie así como también la función de los PMNs ^{28,41,227,238-240}. La inoculación *in vivo* del G-CSF recombinante induce un aumento en la expresión del marcador CD11b, la generación de radicales libres del oxígeno, la CCDA y una disminución del FcγRIII y la apoptosis sin afectar el contenido de MPO en los gránulos azurófilos ^{241,242}. Tanto la IL-8 como el G-CSF actúan como quimiotácticos sobre los PMNs *in vitro* y favorecen el burst oxidativo, la degranulación, la adhesión y migración a través de endotelio sin activar ^{243,244}. Para determinar cuánto de las particularidades encontradas en los PMNs de los pacientes con D+SUH son compartidas por otras patologías de naturaleza infecciosa, se utilizaron como controles adicionales, los PMNs de niños que padecían alguna infección con neutrofilia no asociada al SUH. Al comparar los datos de los pacientes con D+SUH y los niños neutrofilicos observamos diferencias en los niveles del FcγRIII, el contenido de MPO y las funciones citotóxicas. Sin embargo, la respuesta de degranulación frente a distintas citoquinas entre la población de niños con D+SUH y los neutrofilicos fue muy similar. Si bien algunos aspectos en las dos poblaciones de niños analizadas pueden ser similares, el D+SUH presenta un componente importante de daño endotelial que no se encuentra en otras infecciones con neutrofilia. Esto determina que el perfil de activación de un PMN presente en este contexto sea único y represente a una célula potencialmente dañina en estas condiciones pero inocua en otras. Las diferencias obtenidas entre las poblaciones de PMNs provenientes de los niños con D+SUH y los neutrofilicos indican que el fenotipo y

funcionalidad de los PMNs de los pacientes con D+SUH son característicos de este síndrome y no son meramente una consecuencia de la neutrofilia asociada. Adicionalmente, la presencia de formas inmaduras de PMNs en preparados de sangre de pacientes no superó el 5%, lo que indica que la contribución de las células inmaduras a la función y fenotipo observados no sería de gran relevancia.

En conclusión, si bien el fenotipo de agotamiento de los PMNs de los pacientes debe ser multifactorial, creemos que parte de este proceso sería consecuencia de la activación temprana (observada en nuestro modelo animal), en un proceso similar al que ocurre con las plaquetas en esta misma enfermedad, por lo que en el momento de la toma de la muestra las células se encontrarían parcialmente exhaustas. Este fenómeno sería parcial, ya que la capacidad de respuesta de estos PMNs no se encuentra totalmente deprimida y conservan la citotoxicidad dependiente de IROs intacta y la modulación de diversas moléculas presentes en gránulos, como el CD66b y el CD11b, si bien se encuentra disminuida en los pacientes, no está totalmente anulada, lo que significa que estos PMNs todavía pueden responder a algunos estímulos. Si bien el tiempo de circulación de los PMNs en reposo es corto (1 a 2 días), la activación de este tipo celular retrasa la apoptosis y lleva a un aumento significativo de su vida media (6 a 7 días)²⁴⁵. Ya que los pacientes evaluados tienen, en general, pocos días de evolución, es probable que sus PMNs sean aquellos que sufrieron el proceso de activación y ahora se encuentren parcialmente desactivados. La posibilidad de que factores séricos presentes en los pacientes con D+SUH estén modulando, al menos en parte, la función de los PMNs no puede aún ser descartada y requiere de estudios adicionales, actualmente en curso.

La activación del endotelio por citoquinas o mediadores inflamatorios puede afectar el balance de la actividad pro- y anticoagulante y llevar a la formación de trombos. La liberación basal del NO por las células endoteliales está involucrada en este balance y contribuye al mantenimiento del tono vascular normal y la trombo resistencia por su papel vasodilatador e inhibidor de la adhesión y agregación plaquetarias. La microangiopatía trombótica (MAT) observada en los pacientes con D+SUH podría estar

asociada a una disminución de la producción y/o disponibilidad del NO que podría derivar en la consecuente activación plaquetaria y conducir a la formación de trombos. Sin embargo, este aspecto no ha sido aún demostrado. En el modelo animal utilizado en este trabajo, la inyección de la Stx2 reprodujo las características presentes en las plaquetas de los pacientes con D+SUH, ya que se observaron la trombocitopenia y la inhibición de la función plaquetaria por agotamiento de los gránulos intracitoplasmáticos³². Más aún, el modelo murino nos permitió demostrar, por primera vez, que la inyección de la Stx2 induce una activación plaquetaria temprana, evidenciada por una mayor respuesta de agregación frente a distintos agonistas. Esta activación conduciría a la formación de trombos que derivarían en la MAT característica y explicaría la tardía inhibición de la función observada en las plaquetas remanentes de la circulación.

Con el propósito de determinar el papel del NO endógeno en la patogenia del SUH se estudiaron los efectos de distintos inhibidores de la NOS en la patología renal y mortalidad inducidas por la Stx2 en nuestro modelo. Ambos fenómenos se encontraron exacerbados como consecuencia de la inhibición de la NOS por el L-NAME, lo que sugiere un rol protector del NO en la patogenia del SUH. Dicho aumento en la toxicidad no pudo ser reproducido por inhibidores específicos de la forma inducible de la NOS (iNOS), como la AG o el L-NIL, por lo que la forma constitutiva (cNOS) estaría probablemente involucrada en la función protectora del NO. Por otra parte, la inhibición de la NOS por el L-NAME en los animales tratados con Stx2 acelera los fenómenos de activación-agotamiento plaquetario y exagera su degranulación, indicando que el NO actuaría como un amortiguador en este proceso. Finalmente, si bien la depleción de plaquetas no modificó la mortalidad inducida por la Stx2, previno la potenciación de la muerte mediada por el L-NAME. En conjunto, estos resultados indican que la potenciación del daño renal y toxicidad mediada por el L-NAME en el modelo de SUH estarían mediadas, por lo menos en parte, por un aumento en la activación y agregación de las plaquetas con la consecuente formación de trombos.

Los hallazgos histológicos refuerzan esta conclusión, ya que el pre-tratamiento con el L-NAME agravó las alteraciones renales producidas por la Stx2, causando no sólo una

mayor trombosis glomerular difusa sino también grandes áreas de necrosis tubular. Cabe destacar que esta es la primera vez que se evidencia la presencia de trombos intraglomerulares en el modelo murino en respuesta a la Stx2, lo que valida aún más este modelo para el estudio del SUH. Por otro lado, los riñones de ratones que recibieron sólo L-NAME mostraron el epitelio tubular normal, con leves alteraciones no relacionadas con las provocadas por la Stx2 y probablemente debidas a los efectos vasoactivos del L-NAME. Por lo tanto, estos datos indican que la inhibición de la NOS por el L-NAME induce una exacerbación del daño renal inducido por la Stx2 y no es consecuencia de un efecto del L-NAME por si mismo. Esta potenciación del daño estaría mediada por un aumento en la formación de trombos dentro del riñón, que probablemente serían consecuencia de la mayor activación plaquetaria asociada a la ausencia del NO.

El aumento en los niveles séricos del NO (medido por su metabolito NO_2^-) en los ratones tratados con Stx2 concuerda con los datos obtenidos durante el período agudo en los pacientes con SUH³⁸. El hecho de que este aumento esté retrasado con respecto a los efectos del L-NAME en la reactividad plaquetaria, sugiere que el NO encontrado en el suero de los ratones podría provenir de la iNOS como consecuencia del daño endotelial tardío y los procesos inflamatorios generados en consecuencia. Sin embargo, el pico en la concentración de NO en plasma puede no reflejar exactamente el pico de inducción de la actividad de la iNOS *in vivo* en los distintos órganos²⁴⁶. Para aclarar este punto, la actividad y los niveles de mRNA de las isoformas de la enzima deberían ser determinadas en los distintos órganos de los animales luego de la inyección de la Stx2.

Los efectos beneficiosos del NO también han sido demostrados en modelos de endotoxemia en ratas donde la inhibición de la NOS lleva a una MAT glomerular¹⁶², la cual es revertida por la administración exógena del dador de NO, nitroglicerina¹⁶³. La potenciación del daño inducido por la Stx2 al inhibir la NOS, sugiere que la administración de NO exógeno podría constituir una buena terapia para la prevención de la MAT en los pacientes con SUH¹⁶⁸. Sin embargo, en nuestro modelo experimental, la administración del sustrato L-ARG por si sola no fue capaz de prevenir la toxicidad de la Stx2 ni la degranulación de las plaquetas; sus efectos se limitaron a revertir aquellos inducidos por el L-NAME. Esta falta de efecto puede explicarse ya que la concentración

de arginina en el plasma normal es de 80-120 μM y la intracelular puede llegar a valores de 1 mM, mientras que el K_m de la NOS por la arginina es de 1-10 μM ¹⁵⁸. Esto significa que si la forma cNOS es la involucrada en los fenómenos descritos, la enzima estaría saturada por las concentraciones de sustrato fisiológicas y el agregado adicional de L-ARG suministrado exógenamente no estaría disponible para la enzima. Sin embargo, esto no invalida la idea de que el agregado de otros dadores de NO, que liberan directamente NO luego de ser metabolizados, sea efectivo para atenuar el daño causado por la Stx2. El S-nitroso-glutatión, un nitrosol estable, ha sido probado en humanos y sus efectos inhibitorios de la agregación y adhesión plaquetaria *ex vivo*, con repercusiones mínimas en la vasodilatación, lo hacen un buen candidato para la futura exploración en nuestro modelo de SUH^{247,248}.

En conclusión, estos resultados indican que las propiedades antitrombogénicas del NO sintetizado endógenamente serían importantes en prevenir la activación y agregación plaquetaria involucradas en la trombosis glomerular en el SUH.

El D+SUH es una enfermedad compleja con múltiples mecanismos patogénicos, que se interrelacionan entre si para dar un cuadro característico, con aspectos compartidos por otras patologías trombóticas e infecciosas de distinto origen. Sin embargo, a través de este trabajo pudimos demostrar utilizando el modelo murino, que los PMNs y su actividad citotóxica, son centrales como contribuyente de la respuesta inflamatoria y participan directamente en los mecanismos patogénicos de la Stx2. La activación de las plaquetas es un efecto asociado pero la presencia de las mismas no define el curso de la enfermedad.


Autor: Lic. Gabriela C. Fernández


Director: Dra. Marina S. Palermo

Referencias

1. Gianantonio CA, Vitacco M, Mendilaharsu F, Gallo GE, Sojo ET. The hemolytic-uremic syndrome. *Nephron*. 1973;11:174-192.
2. Remuzzi G, Ruggenti P. The hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int*. 1995;48:2-19.
3. Spizzirri FD, Rahman RC, Bibiloni N, Ruscasso JD, Amoreo OR. Childhood hemolytic uremic syndrome in Argentina: long-term follow-up and prognostic features. *Pediatr Nephrol*. 1997;11:156-160.
4. Siegler RL, Pavia AT, Christofferson RD, Milligan MK. A 20-year population-based study of postdiarrheal hemolytic uremic syndrome in Utah. *Pediatrics*. 1994;94:35-40.
5. Gagnadoux MF, Habib R, Gubler MC, Bacri JL, Broyer M. Long-term (15-25 years) outcome of childhood hemolytic-uremic syndrome. *Clin Nephrol*. 1996;46:39-41.
6. Karmali MA, Steele BT, Petric M, Lim C. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet*. 1983;1:619-620.
7. Karmali MA, Petric M, Lim C, Fleming PC, Arbus GS, Lior H. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis*. 1985;151:775-782.
8. Sandvig K, van Deurs B. Entry of ricin and Shiga toxin into cells: molecular mechanisms and medical perspectives. *Embo J*. 2000;19:5943-5950.
9. Keusch GT, Acheson DW. Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with Shiga toxins. *Semin Hematol*. 1997;34:106-116.
10. Kaplan BS, Cleary TG, Obrig TG. Recent advances in understanding the pathogenesis of the hemolytic uremic syndromes. *Pediatr Nephrol*. 1990;4:276-283.
11. Sanchez Avalos JC. [Thrombotic microangiopathies: HUS/TTP. Physiopathological aspects]. *Medicina*. 2000;60:46-58.
12. Lopez EL, Contrini MM, Devoto S, de Rosa MF, Grana MG, Aversa L, Gomez HF, Genero MH, Cleary TG. Incomplete hemolytic-uremic syndrome in Argentinean children with bloody diarrhea. *J Pediatr*. 1995;127:364-367.
13. Acheson DW, Moore R, De Breucker S, Lincicome L, Jacewicz M, Skutelsky E, Keusch GT. Translocation of Shiga toxin across polarized intestinal cells in tissue culture. *Infect Immun*. 1996;64:3294-3300.
14. Hurley BP, Jacewicz M, Thorpe CM, Lincicome LL, King AJ, Keusch GT, Acheson DW. Shiga toxins 1 and 2 translocate differently across polarized intestinal epithelial cells. *Infect Immun*. 1999;67:6670-6677.
15. van Setten PA, Monnens LA, Verstraten RG, van den Heuvel LP, van Hinsbergh VW. Effects of verocytotoxin-1 on nonadherent human monocytes: binding characteristics, protein synthesis, and induction of cytokine release. *Blood*. 1996;88:174-183.
16. te Loo DM, Monnens LA, van Der Velden TJ, Vermeer MA, Preyers F, Demacker PN, van Den Heuvel LP, van Hinsbergh VW. Binding and transfer of verocytotoxin by polymorphonuclear leukocytes in hemolytic uremic syndrome. *Blood*. 2000;95:3396-3402.
17. Cooling LL, Walker KE, Gille T, Koerner TA. Shiga toxin binds human platelets via globotriaosylceramide (Pk antigen) and a novel platelet glycosphingolipid. *Infect Immun*. 1998;66:4355-4366.
18. Inward CD, Howie AJ, Fitzpatrick MM, Rafaat F, Milford DV, Taylor CM. Renal histopathology in fatal cases of diarrhoea-associated haemolytic uraemic syndrome. *British Association for Paediatric Nephrology. Pediatr Nephrol*. 1997;11:556-559.
19. Kaneko K, Kiyokawa N, Ohtomo Y, Nagaoka R, Yamashiro Y, Taguchi T, Mori T, Fujimoto J, Takeda T. Apoptosis of renal tubular cells in Shiga-toxin-mediated hemolytic uremic syndrome. *Nephron*. 2001;87:182-185.

20. Louise CB, Obrig TG. Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: combined cytotoxic effects of shiga toxin and lipopolysaccharide (endotoxin) on human vascular endothelial cells in vitro. *Infect Immun*. 1992;60:1536-1543.
21. van de Kar NC, Monnens LA, Karmali MA, van Hinsbergh VW. Tumor necrosis factor and interleukin-1 induce expression of the verocytotoxin receptor globotriaosylceramide on human endothelial cells: implications for the pathogenesis of the hemolytic uremic syndrome. *Blood*. 1992;80:2755-2764.
22. van Setten PA, van Hinsbergh VW, van der Velden TJ, van de Kar NC, Vermeer M, Mahan JD, Assmann KJ, van den Heuvel LP, Monnens LA. Effects of TNF alpha on verocytotoxin cytotoxicity in purified human glomerular microvascular endothelial cells. *Kidney Int*. 1997;51:1245-1256.
23. Palermo M, Alves-Rosa F, Rubel C, Fernandez GC, Fernandez-Alonso G, Alberto F, Rivas M, Isturiz M. Pretreatment of mice with lipopolysaccharide (LPS) or IL-1beta exerts dose-dependent opposite effects on Shiga toxin-2 lethality. *Clin Exp Immunol*. 2000;119:77-83.
24. Barrett TJ, Potter ME, Wachsmuth IK. Bacterial endotoxin both enhances and inhibits the toxicity of Shiga-like toxin II in rabbits and mice. *Infect Immun*. 1989;57:3434-3437.
25. Walters MD, Matthei IU, Kay R, Dillon MJ, Barratt TM. The polymorphonuclear leucocyte count in childhood haemolytic uraemic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 1989;3:130-134.
26. Milford DV, Staten J, MacGregor I, Dawes J, Taylor CM, Hill FG. Prognostic markers in diarrhoea-associated haemolytic-uraemic syndrome: initial neutrophil count, human neutrophil elastase and von Willebrand factor antigen. *Nephrol Dial Transplant*. 1991;6:232-237.
27. Fitzpatrick MM, Shah V, Trompeter RS, Dillon MJ, Barratt TM. Interleukin-8 and polymorphoneutrophil leucocyte activation in hemolytic uremic syndrome of childhood. *Kidney Int*. 1992;42:951-956.
28. Westerholt S, Hartung T, Tollens M, Gustrau A, Oberhoffer M, Karch H, Klare B, Pfeffer K, Emmrich P, Oberhoffer R. Inflammatory and immunological parameters in children with haemolytic uremic syndrome (HUS) and gastroenteritis-pathophysiological and diagnostic clues. *Cytokine*. 2000;12:822-827.
29. Fitzpatrick MM, Shah V, Filler G, Dillon MJ, Barratt TM. Neutrophil activation in the haemolytic uraemic syndrome: free and complexed elastase in plasma. *Pediatr Nephrol*. 1992;6:50-53.
30. Ishikawa N, Kamitsuiji H, Murakami T, Nakayama A, Umeki Y. Plasma levels of granulocyte elastase-alpha1-proteinase inhibitor complex in children with hemolytic uremic syndrome caused by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *Pediatr Int*. 2000;42:637-641.
31. Pareti FI, Capitanio A, Mannucci L, Ponticelli C, Mannucci PM. Acquired dysfunction due to the circulation of "exhausted" platelets. *Am J Med*. 1980;69:235-240.
32. Fong JS, Kaplan BS. Impairment of platelet aggregation in hemolytic uremic syndrome: evidence for platelet "exhaustion". *Blood*. 1982;60:564-570.
33. Edefonti A, Bettinelli A, Mondonico P, Claris Appiani A, Picca M, Cossu MM, Tentori F, Giani M, Rossi E. Intraplatelet serotonin (5HT) in children with the hemolytic uremic syndrome. *Clin Nephrol*. 1985;23:207-211.
34. Provost P, Lam JY, Lacoste L, Merhi Y, Waters D. Endothelium-derived nitric oxide attenuates neutrophil adhesion to endothelium under arterial flow conditions. *Arterioscler Thromb*. 1994;14:331-335.
35. Provost P, Merhi Y. Endothelium-derived nitric oxide decreases polymorphonuclear leukocyte interaction with the deeply injured arterial wall under intermediate and high shear conditions. *Thromb Haemost*. 1997;78:939-946.
36. Provost P, Merhi Y. Endogenous nitric oxide release modulates mural platelet thrombosis and neutrophil-endothelium interactions under low and high shear conditions. *Thromb Res*. 1997;85:315-326.
37. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet*. 1987;2:1057-1058.
38. Herlitz H, Petersson A, Sigstrom L, Wennmalm A, Westberg G. The arginine-nitric oxide pathway in thrombotic microangiopathy. *Scand J Urol Nephrol*. 1997;31:477-479.
39. Exeni RA. [Hemolytic uremic syndrome]. *Medicina*. 1996;56:197-198.
40. Walters MD, Levin M, Smith C, Nokes TJ, Hardisty RM, Dillon MJ, Barratt TM. Intravascular platelet activation in the hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int*. 1988;33:107-115.
41. Murata A, Shimazu T, Yamamoto T, Taenaka N, Nagayama K, Honda T, Sugimoto H, Monden M, Matsuura N, Okada S. Profiles of circulating inflammatory- and anti-inflammatory cytokines in patients with hemolytic uremic syndrome due to *E. coli* O157 infection. *Cytokine*. 1998;10:544-548.

42. Litalien C, Proulx F, Mariscalco MM, Robitaille P, Turgeon JP, Orrbine E, Rowe PC, McLaine PN, Seidman E. Circulating inflammatory cytokine levels in hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 1999;13:840-845.
43. Karpman D, Andreasson A, Thysell H, Kaplan BS, Svanborg C. Cytokines in childhood hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Pediatr Nephrol.* 1995;9:694-699.
44. Proulx F, Turgeon JP, Litalien C, Mariscalco MM, Robitaille P, Seidman E. Inflammatory mediators in *Escherichia coli* O157:H7 hemorrhagic colitis and hemolytic-uremic syndrome. *Pediatr Infect Dis J.* 1998;17:899-904.
45. Andreoli SP. The pathophysiology of the hemolytic uremic syndrome. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1999;8:459-464.
46. van de Kar NC, Sauerwein RW, Demacker PN, Grau GE, van Hinsbergh VW, Monnens LA. Plasma cytokine levels in hemolytic uremic syndrome. *Nephron.* 1995;71:309-313.
47. Inward CD, Varagunam M, Adu D, Milford DV, Taylor CM. Cytokines in haemolytic uraemic syndrome associated with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infection. *Arch Dis Child.* 1997;77:145-147.
48. van Setten PA, van Hinsbergh VW, van den Heuvel LP, Preyers F, Dijkman HB, Assmann KJ, van der Velden TJ, Monnens LA. Monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 levels in urine and serum of patients with hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Res.* 1998;43:759-767.
49. de Jong M, Monnens L. Haemolytic-uraemic syndrome: a 10-year follow-up study of 73 patients. *Nephrol Dial Transplant.* 1988;3:379-382.
50. Spizzirri FD, Perez N, Suarez A, Cobenas C, Rahman RC, Alconcher L. Hemolytic uremic syndrome: presence or absence of diarrheal prodromes. *J Pediatr.* 1997;131:937-938.
51. Siegler RL, Edwin SS, Christofferson RD, Mitchell MD. Endothelin in the urine of children with the hemolytic uremic syndrome. *Pediatrics.* 1991;88:1063-1066.
52. Huseman D, Gellermann J, Vollmer I, Ohde I, Devaux S, Ehrich JH, Filler G. Long-term prognosis of hemolytic uremic syndrome and effective renal plasma flow. *Pediatr Nephrol.* 1999;13:672-677.
53. Galbusera M, Benigni A, Paris S, Ruggenti P, Zoja C, Rossi C, Remuzzi G. Unrecognized pattern of von Willebrand factor abnormalities in hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10:1234-1241.
54. Mannucci PM, Lombardi R, Lattuada A, Ruggenti P, Vigano GL, Barbui T, Remuzzi G. Enhanced proteolysis of plasma von Willebrand factor in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic uremic syndrome. *Blood.* 1989;74:978-983.
55. Van Geet C, Proesmans W, Arnout J, Vermeylen J, Declerck PJ. Activation of both coagulation and fibrinolysis in childhood hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int.* 1998;54:1324-1330.
56. Monteagudo J, Pereira A, Reverter JC, Pijoan J, Tusell J, Puig L, Ordinas A, Castillo R. Thrombin generation and fibrinolysis in the thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. *Thromb Haemost.* 1991;66:515-519.
57. Bergstein JM, Riley M, Bang NU. Role of plasminogen-activator inhibitor type 1 in the pathogenesis and outcome of the hemolytic uremic syndrome. *N Engl J Med.* 1992;327:755-759.
58. Martin AA, Woolven BL, Harris SJ, Keeley SR, Adams LD, Jureidini KF, Henning PH. Plasminogen activator inhibitor type-1 and interleukin-6 in haemolytic uraemic syndrome. *J Paediatr Child Health.* 2000;36:327-331.
59. Mori Y, Wada H, Okugawa Y, Tamaki S, Nakasaki T, Watanabe R, Gabazza EC, Nishikawa M, Minami N, Shiku H. Increased plasma thrombomodulin as a vascular endothelial cell marker in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura and hemolytic uremic syndrome. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2001;7:5-9.
60. van de Kar NC, van Hinsbergh VW, Brommer EJ, Monnens LA. The fibrinolytic system in the hemolytic uremic syndrome: in vivo and in vitro studies. *Pediatr Res.* 1994;36:257-264.
61. Menzel D, Levi M, Dooijewaard G, Peters M, ten Cate JW. Impaired fibrinolysis in the hemolytic-uremic syndrome of childhood. *Ann Hematol.* 1994;68:43-48.
62. Walterspiel JN, Ashkenazi S, Morrow AL, Cleary TG. Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on extracellular Shiga-like toxin I. *Infection.* 1992;20:25-29.
63. Paton JC, Paton AW. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11:450-479.
64. Armstrong GD, Rowe PC, Goodyer P, Orrbine E, Klassen TP, Wells G, MacKenzie A, Lior H, Blanchard C, Auclair F, et al. A phase I study of chemically synthesized verotoxin (Shiga-like toxin) Pk-trisaccharide receptors attached to chromosorb for preventing hemolytic-uremic syndrome. *J Infect Dis.* 1995;171:1042-1045.

65. Takeda T, Yoshino K, Adachi E, Sato Y, Yamagata K. In vitro assessment of a chemically synthesized Shiga toxin receptor analog attached to chromosorb P (Synsorb Pk) as a specific absorbing agent of Shiga toxin 1 and 2. *Microbiol Immunol.* 1999;43:331-337
66. Donohue-Rolfe A, Kondova I, Mukherjee J, Chios K, Hutto D, Tzipori S. Antibody-based protection of gnotobiotic piglets infected with *Escherichia coli* O157:H7 against systemic complications associated with Shiga toxin 2. *Infect Immun.* 1999;67:3645-3648.
67. Matise I, Cornick NA, Booher SL, Samuel JE, Bosworth BT, Moon HW. Intervention with Shiga toxin (Stx) antibody after infection by Stx- producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis.* 2001;183:347-350.
68. Boyd B, Richardson S, Gariepy J. Serological responses to the B subunit of Shiga-like toxin 1 and its peptide fragments indicate that the B subunit is a vaccine candidate to counter action of the toxin. *Infect Immun.* 1991;59:750-757.
69. Bielaszewska M, Clarke I, Karmali MA, Petric M. Localization of intravenously administered verocytotoxins (Shiga-like toxins) 1 and 2 in rabbits immunized with homologous and heterologous toxoids and toxin subunits. *Infect Immun.* 1997;65:2509-2516.
70. Yamagami S, Motoki M, Kimura T, Izumi H, Takeda T, Katsuura Y, Matsumoto Y. Efficacy of Postinfection Treatment with Anti-Shiga Toxin (Stx) 2 Humanized Monoclonal Antibody TMA-15 in Mice Lethally Challenged with Stx-Producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis.* 2001;184:738-742.
71. Van Damme-Lombaerts R, Proesmans W, Van Damme B, Eeckels R, Binda ki Muaka P, Mercieca V, Vlietinck R, Vermeylen J. Heparin plus dipyridamole in childhood hemolytic-uremic syndrome: a prospective, randomized study. *J Pediatr.* 1988;113:913-918.
72. Remuzzi G, Ruggenenti P. The hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int Suppl.* 1998;66:S54-57.
73. Finazzi G, Bellavita P, Falanga A, Viero P, Barbui T. Inefficacy of intravenous immunoglobulin in patients with low-risk thrombotic thrombocytopenic purpura/hemolytic-uremic syndrome. *Am J Hematol.* 1992;41:165-169.
74. Perez N, Spizzirri F, Rahman R, Suarez A, Larrubia C, Lasarte P. Steroids in the hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 1998;12:101-104.
75. Verweyen HM, Karch H, Allerberger F, Zimmerhackl LB. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) in pediatric hemolytic-uremic syndrome: a prospective study in Germany and Austria. *Infection.* 1999;27:341-347.
76. Lopez EL, Diaz M, Grinstein S, Devoto S, Mendilaharsu F, Murray BE, Ashkenazi S, Ruboglio E, Woloj M, Vasquez M, et al. Hemolytic uremic syndrome and diarrhea in Argentine children: the role of Shiga-like toxins. *J Infect Dis.* 1989;160:469-475.
77. Rivas M, Balbi L, Miliwebsky ES, Garcia B, Tous MI, Leardini NA, Prieto MA, Chillemi GM, de Principi ME. [Hemolytic uremic syndrome in children of Mendoza, Argentina: association with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection]. *Medicina.* 1998;58:1-7
78. Wieler LH, Schwanitz A, Vieler E, Busse B, Steinruck H, Kaper JB, Baljer G. Virulence properties of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains of serogroup O118, a major group of STEC pathogens in calves. *J Clin Microbiol.* 1998;36:1604-1607.
79. Beutin L, Geier D, Zimmermann S, Aleksic S, Gillespie HA, Whittam TS. Epidemiological relatedness and clonal types of natural populations of *Escherichia coli* strains producing Shiga toxins in separate populations of cattle and sheep. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63:2175-2180.
80. Kudva IT, Hatfield PG, Hovde CJ. Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin- producing *E. coli* serotypes isolated from sheep. *J Clin Microbiol.* 1997;35:892-899.
81. Beutin L, Geier D, Steinruck H, Zimmermann S, Scheut F. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)- producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J Clin Microbiol.* 1993;31:2483-2488.
82. Beutin L. *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. *Vet Res.* 1999;30:285-298.
83. Strockbine NA, Jackson MP, Sung LM, Holmes RK, O'Brien AD. Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1. *J Bacteriol.* 1988;170:1116-1122.
84. Strockbine NA, Marques LR, Newland JW, Smith HW, Holmes RK, O'Brien AD. Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. *Infect Immun.* 1986;53:135-140.
85. Jackson MP, Newland JW, Holmes RK, O'Brien AD. Nucleotide sequence analysis of the structural genes for Shiga-like toxin I encoded by bacteriophage 933J from *Escherichia coli*. *Microb Pathog.* 1987;2:147-153.
86. Scotland SM, Rowe B, Smith HR, Willshaw GA, Gross RJ. Vero cytotoxin-producing strains of *Escherichia coli* from children with haemolytic uraemic syndrome and their detection by specific DNA probes. *J Med Microbiol.* 1988;25:237-243.

87. Ostroff SM, Tarr PI, Neill MA, Lewis JH, Hargrett-Bean N, Kobayashi JM. Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic sequelae in *Escherichia coli* O157:H7 infections. *J Infect Dis.* 1989;160:994-998.
88. Tesh VL, Burris JA, Owens JW, Gordon VM, Wadolkowski EA, O'Brien AD, Samuel JE. Comparison of the relative toxicities of Shiga-like toxins type I and type II for mice. *Infect Immun.* 1993;61:3392-3402.
89. Sandvig K, Garred O, Prydz K, Kozlov JV, Hansen SH, van Deurs B. Retrograde transport of endocytosed Shiga toxin to the endoplasmic reticulum. *Nature.* 1992;358:510-512.
90. Garred O, van Deurs B, Sandvig K. Furin-induced cleavage and activation of Shiga toxin. *J Biol Chem.* 1995;270:10817-10821.
91. Lord JM, Roberts LM. Toxin entry: retrograde transport through the secretory pathway. *J Cell Biol.* 1998;140:733-736.
92. White J, Johannes L, Mallard F, Girod A, Grill S, Reinsch S, Keller P, Tzschaschel B, Echard A, Goud B, Stelzer EH. Rab6 coordinates a novel Golgi to ER retrograde transport pathway in live cells. *J Cell Biol.* 1999;147:743-760.
93. Cohen A, Hannigan GE, Williams BR, Lingwood CA. Roles of globotriosyl- and galabiosylceramide in verotoxin binding and high affinity interferon receptor. *J Biol Chem.* 1987;262:17088-17091.
94. Lingwood CA. Verotoxins and their glycolipid receptors. *Adv Lipid Res.* 1993;25:189-211.
95. Samuel JE, Perera LP, Ward S, O'Brien AD, Ginsburg V, Krivan HC. Comparison of the glycolipid receptor specificities of Shiga-like toxin type II and Shiga-like toxin type II variants. *Infect Immun.* 1990;58:611-618.
96. Bitzan M, Richardson S, Huang C, Boyd B, Petric M, Karmali MA. Evidence that verotoxins (Shiga-like toxins) from *Escherichia coli* bind to P blood group antigens of human erythrocytes in vitro. *Infect Immun.* 1994;62:3337-3347.
97. Oosterwijk E, Kalisiak A, Wakka JC, Scheinberg DA, Old LJ. Monoclonal antibodies against Gal alpha 1-4Gal beta 1-4Glc (Pk, CD77) produced with a synthetic glycoconjugate as immunogen: reactivity with carbohydrates, with fresh frozen human tissues and hematopoietic tumors. *Int J Cancer.* 1991;48:848-854.
98. Lingwood CA. Verotoxin-binding in human renal sections. *Nephron.* 1994;66:21-28.
99. Boyd B, Lingwood C. Verotoxin receptor glycolipid in human renal tissue. *Nephron.* 1989;51:207-210.
100. van Setten PA, van Hinsbergh VWM, van der Velden TJAM, Kijkman HBPM, Assmann KJM, Vermeer M, Lingwood C, van den Heuvel LPWJ, Monnens LAH. Effects of verocytotoxin on pediatric glomerular microvascular endothelial cells. Evidence for verotoxin binding to not only globotriaosylceramide species in vitro and in vivo. The pathogenesis of the Hemolytic Uremic Syndrome in childhood. Thesis. 1998;Chapter 4:77-97.
101. Harel Y, Silva M, Giroir B, Weinberg A, Cleary TB, Beutler B. A reporter transgene indicates renal-specific induction of tumor necrosis factor (TNF) by shiga-like toxin. Possible involvement of TNF in hemolytic uremic syndrome. *J Clin Invest.* 1993;92:2110-2116.
102. Kiarash A, Boyd B, Lingwood CA. Glycosphingolipid receptor function is modified by fatty acid content. Verotoxin 1 and verotoxin 2c preferentially recognize different globotriaosyl ceramide fatty acid homologues. *J Biol Chem.* 1994;269:11138-11146.
103. Pellizzari A, Pang H, Lingwood CA. Binding of verocytotoxin 1 to its receptor is influenced by differences in receptor fatty acid content. *Biochemistry.* 1992;31:1363-1370.
104. Sandvig K, Garred O, van Helvoort A, van Meer G, van Deurs B. Importance of glycolipid synthesis for butyric acid-induced sensitization to shiga toxin and intracellular sorting of toxin in A431 cells. *Mol Biol Cell.* 1996;7:1391-1404.
105. Sandvig K, Ryd M, Garred O, Schweda E, Holm PK, van Deurs B. Retrograde transport from the Golgi complex to the ER of both Shiga toxin and the nontoxic Shiga B-fragment is regulated by butyric acid and cAMP. *J Cell Biol.* 1994;126:53-64.
106. Kelly J, Oryshak A, Wenetsek M, Grabiec J, Handy S. The colonic pathology of *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Am J Surg Pathol.* 1990;14:87-92.
107. Murray KF, Patterson K. *Escherichia coli* O157:H7-induced hemolytic-uremic syndrome: histopathologic changes in the colon over time. *Pediatr Dev Pathol.* 2000;3:232-239.
108. Jarvis KG, Giron JA, Jerse AE, McDaniel TK, Donnenberg MS, Kaper JB. Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:7996-8000.

109. McDaniel TK, Jarvis KG, Donnenberg MS, Kaper JB. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:1664-1668.
110. Boerlin P, McEwen SA, Boerlin-Petzold F, Wilson JB, Johnson RP, Gyles CL. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J Clin Microbiol*. 1999;37:497-503.
111. Barrett TJ, Kaper JB, Jerse AE, Wachsmuth IK. Virulence factors in Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans and cattle. *J Infect Dis*. 1992;165:979-980.
112. Sandhu KS, Clarke RC, McFadden K, Brouwer A, Louie M, Wilson J, Lior H, Gyles CL. Prevalence of the *eaeA* gene in verotoxigenic *Escherichia coli* strains from dairy cattle in Southwest Ontario. *Epidemiol Infect*. 1996;116:1-7.
113. Brooks HJ, Mollison BD, Bettelheim KA, Matejka K, Paterson KA, Ward VK. Occurrence and virulence factors of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in retail meat in Dunedin, New Zealand. *Lett Appl Microbiol*. 2001;32:118-122.
114. Schmidt H, Beutin L, Karch H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect Immun*. 1995;63:1055-1061.
115. Taylor FB, Jr., Tesh VL, DeBault L, Li A, Chang AC, Kosanke SD, Pysher TJ, Siegler RL. Characterization of the baboon responses to Shiga-like toxin: descriptive study of a new primate model of toxic responses to Stx-1. *Am J Pathol*. 1999;154:1285-1299.
116. Mobassaleh M, Donohue-Rolfe A, Jacewicz M, Grand RJ, Keusch GT. Pathogenesis of shigella diarrhea: evidence for a developmentally regulated glycolipid receptor for shigella toxin involved in the fluid secretory response of rabbit small intestine. *J Infect Dis*. 1988;157:1023-1031.
117. Thorpe CM, Hurley BP, Lincicome LL, Jacewicz MS, Keusch GT, Acheson DW. Shiga toxins stimulate secretion of interleukin-8 from intestinal epithelial cells. *Infect Immun*. 1999;67:5985-5993.
118. Oppenheim JJ, Zachariae CO, Mukaida N, Matsushima K. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol*. 1991;9:617-648.
119. Detmers PA, Powell DE, Walz A, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Cohn ZA. Differential effects of neutrophil-activating peptide 1/IL-8 and its homologues on leukocyte adhesion and phagocytosis. *J Immunol*. 1991;147:4211-4217.
120. Sengelov H, Kjeldsen L, Borregaard N. Control of exocytosis in early neutrophil activation. *J Immunol*. 1993;150:1535-1543.
121. Borregaard N, Løllike K, Kjeldsen L, Sengelov H, Bastholm L, Nielsen MH, Bainton DF. Human neutrophil granules and secretory vesicles. *Eur J Haematol*. 1993;51:187-198.
122. Detmers PA, Zhou D, Powell D, Lichenstein H, Kelley M, Pironkova R. Endotoxin receptors (CD14) are found with CD16 (Fc gamma RIII) in an intracellular compartment of neutrophils that contains alkaline phosphatase. *J Immunol*. 1995;155:2085-2095.
123. Kaplan BS, Mills M. Elevated serum elastase and alpha-1-antitrypsin levels in hemolytic uremic syndrome. *Clin Nephrol*. 1988;30:193-196.
124. Forsyth KD, Simpson AC, Fitzpatrick MM, Barratt TM, Levinsky RJ. Neutrophil-mediated endothelial injury in haemolytic uraemic syndrome. *Lancet*. 1989;2:411-414.
125. King AJ, Sundaram S, Cendoroglo M, Acheson DW, Keusch GT. Shiga toxin induces superoxide production in polymorphonuclear cells with subsequent impairment of phagocytosis and responsiveness to phorbol esters. *J Infect Dis*. 1999;179:503-507.
126. Liu J, Akahoshi T, Sasahana T, Kitasato H, Namai R, Sasaki T, Inoue M, Kondo H. Inhibition of neutrophil apoptosis by verotoxin 2 derived from *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun*. 1999;67:6203-6205.
127. Wagner PL, Acheson DW, Waldor MK. Human neutrophils and their products induce Shiga toxin production by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 2001;69:1934-1937.
128. Tashiro H, Miura S, Kurose I, Fukumura D, Suzuki H, Suematsu M, Yoshioka M, Tsuchiya M, Kai A, Kudoh Y. Verotoxin induces hemorrhagic lesions in rat small intestine. Temporal alteration of vasoactive substances. *Dig Dis Sci*. 1994;39:1230-1238.
129. Pai CH, Kelly JK, Meyers GL. Experimental infection of infant rabbits with verotoxin-producing *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 1986;51:16-23.
130. Tesh VL, Ramegowda B, Samuel JE. Purified Shiga-like toxins induce expression of proinflammatory cytokines from murine peritoneal macrophages. *Infect Immun*. 1994;62:5085-5094.
131. Palermo MS, Alves Rosa MF, Van Rooijen N, Isturiz MA. Depletion of liver and splenic macrophages reduces the lethality of Shiga toxin-2 in a mouse model. *Clin Exp Immunol*. 1999;116:462-467.

132. Viisoreanu D, Polanowska-Grabowska R, Suttitanamongkol S, Obrig TG, Gear AR. Human platelet aggregation is not altered by Shiga toxins 1 or 2. *Thromb Res.* 2000;98:403-410.
133. Thorpe CM, Flaumenhaft R, Hurley B, Jacewicz M, Acheson DW, Keusch GT. Shiga toxins do not directly stimulate alpha-granule secretion or enhance aggregation of human platelets. *Acta Haematol.* 1999;102:51-55.
134. Yoshimura K, Fujii J, Yutsudo T, Kikuchi R, Soejima T, Shirahata S, Yoshida S. No direct effects of Shiga toxin 1 and 2 on the aggregation of human platelets in vitro. *Thromb Haemost.* 1998;80:529-530.
135. Karpman D, Papadopoulou D, Nilsson K, Sjogren AC, Mikaelsson C, Lethagen S. Platelet activation by Shiga toxin and circulatory factors as a pathogenetic mechanism in the hemolytic uremic syndrome. *Blood.* 2001;97:3100-3108.
136. Yagi H, Narita N, Matsumoto M, Sakurai Y, Ikari H, Yoshioka A, Kita E, Ikeda Y, Titani K, Fujimura Y. Enhanced low shear stress induced platelet aggregation by Shiga-like toxin 1 purified from *Escherichia coli* O157. *Am J Hematol.* 2001;66:105-115.
137. Turi S, Nemeth I, Vargha I, Matkovics B. Oxidative damage of red blood cells in haemolytic uraemic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 1994;8:26-29.
138. Facorro G, Aguirre F, Florentin L, Diaz M, De Paoli T, Ihlo JE, Hager AA, Sanchez Avalos JC, Farach HA, Poole CP, Jr. Oxidative stress and membrane fluidity in erythrocytes from patients with hemolytic uremic syndrome. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam.* 1997;47:137-146.
139. Taylor CM, Milford DV, Rose PE, Roy TC, Rowe B. The expression of blood group P1 in post-enteropathic haemolytic uraemic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 1990;4:59-61.
140. Green DA, Murphy WG, Uttley WS. Haemolytic uraemic syndrome: prognostic factors. *Clin Lab Haematol.* 2000;22:11-14.
141. Ashida A, Matsui K, Chizaki T, Yoshikawa K, Kawamura N, Suzuki K, Tamai H. Erythrocyte P1 group antigen expression in VTEC-associated hemolytic uremic syndrome. *Clin Nephrol.* 1999;51:73-76.
142. Orr PH, Dong V, Schroeder ML, Ogborn MR. P1 blood group antigen expression and epidemic hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 1995;9:612-613.
143. Robson WL, Leung AK, Bowen T, Brant R, Ching E. The P1 blood group and the severity of diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome. *Clin Nephrol.* 1994;42:288-290.
144. Newburg DS, Chaturvedi P, Lopez EL, Devoto S, Fayad A, Cleary TG. Susceptibility to hemolytic-uremic syndrome relates to erythrocyte glycosphingolipid patterns. *J Infect Dis.* 1993;168:476-479.
145. Cohen A, Madrid-Marina V, Estrov Z, Freedman MH, Lingwood CA, Dosch HM. Expression of glycolipid receptors to Shiga-like toxin on human B lymphocytes: a mechanism for the failure of long-lived antibody response to dysenteric disease. *Int Immunol.* 1990;2:1-8.
146. Ohmi K, Kiyokawa N, Takeda T, Fujimoto J. Human microvascular endothelial cells are strongly sensitive to Shiga toxins. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;251:137-141.
147. Keusch GT, Acheson DW, Aldering L, Erban J, Jacewicz MS. Comparison of the effects of Shiga-like toxin 1 on cytokine- and butyrate-treated human umbilical and saphenous vein endothelial cells. *J Infect Dis.* 1996;173:1164-1170.
148. van de Kar NC, Kooistra T, Vermeer M, Lesslauer W, Monnens LA, van Hinsbergh VW. Tumor necrosis factor alpha induces endothelial galactosyl transferase activity and verocytotoxin receptors. Role of specific tumor necrosis factor receptors and protein kinase C. *Blood.* 1995;85:734-743.
149. Louise CB, Tran MC, Obrig TG. Sensitization of human umbilical vein endothelial cells to Shiga toxin: involvement of protein kinase C and NF-kappaB. *Infect Immun.* 1997;65:3337-3344.
150. Louise CB, Kaye SA, Boyd B, Lingwood CA, Obrig TG. Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: effect of sodium butyrate on sensitivity of human umbilical vein endothelial cells to Shiga toxin. *Infect Immun.* 1995;63:2766-2769.
151. Van Setten PA, van Hinsbergh VW, Van den Heuvel LP, van der Velden TJ, van de Kar NC, Krebbers RJ, Karmali MA, Monnens LA. Verocytotoxin inhibits mitogenesis and protein synthesis in purified human glomerular mesangial cells without affecting cell viability: evidence for two distinct mechanisms. *J Am Soc Nephrol.* 1997;8:1877-1888.
152. Hughes AK, Stricklett PK, Schmid D, Kohan DE. Cytotoxic effect of Shiga toxin-1 on human glomerular epithelial cells. *Kidney Int.* 2000;57:2350-2359.
153. Hughes AK, Stricklett PK, Kohan DE. Shiga toxin-1 regulation of cytokine production by human glomerular epithelial cells. *Nephron.* 2001;88:14-23.
154. Karpman D, Hakansson A, Perez MT, Isaksson C, Carlensalm E, Caprioli A, Svanborg C. Apoptosis of renal cortical cells in the hemolytic-uremic syndrome: in vivo and in vitro studies. *Infect Immun.* 1998;66:636-644.

155. Uchida H, Fujimoto J, Takeda T. [Primary tubular impairment by verocytotoxin in hemolytic uremic syndrome]. *Nippon Rinsho*. 1997;55:726-730.
156. Hughes AK, Stricklett PK, Kohan DE. Cytotoxic effect of Shiga toxin-1 on human proximal tubule cells. *Kidney Int*. 1998;54:426-437.
157. Hughes AK, Stricklett PK, Kohan DE. Shiga toxin-1 regulation of cytokine production by human proximal tubule cells. *Kidney Int*. 1998;54:1093-1106.
158. Moncada S, Higgs EA. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *Faseb J*. 1995;9:1319-1330.
159. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:323-350.
160. Shultz PJ, Tayeh MA, Marletta MA, Raji L. Synthesis and action of nitric oxide in rat glomerular mesangial cells. *Am J Physiol*. 1991;261:F600-606.
161. Wheeler MA, Smith SD, Garcia-Cardena G, Nathan CF, Weiss RM, Sessa WC. Bacterial infection induces nitric oxide synthase in human neutrophils. *J Clin Invest*. 1997;99:110-116.
162. Shultz PJ, Raji L. Endogenously synthesized nitric oxide prevents endotoxin-induced glomerular thrombosis. *J Clin Invest*. 1992;90:1718-1725.
163. Westberg G, Shultz PJ, Raji L. Exogenous nitric oxide prevents endotoxin-induced glomerular thrombosis in rats. *Kidney Int*. 1994;46:711-716.
164. Ialenti A, Iannaro A, Moncada S, Di Rosa M. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. *Eur J Pharmacol*. 1992;211:177-182.
165. Numata M, Suzuki S, Miyazawa N, Miyashita A, Nagashima Y, Inoue S, Kaneko T, Okubo T. Inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents LPS-induced acute lung injury in dogs. *J Immunol*. 1998;160:3031-3037.
166. Arkovitz MS, Wispe JR, Garcia VF, Szabo C. Selective inhibition of the inducible isoform of nitric oxide synthase prevents pulmonary transvascular flux during acute endotoxemia. *J Pediatr Surg*. 1996;31:1009-1015.
167. McCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JE, Xie QW, Nathan CF, Wahl SM. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J Exp Med*. 1993;178:749-754.
168. Jaradat ZW, Marquardt RR. L-arginine as a therapeutic approach for the verotoxigenic *Escherichia coli*-induced hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Med Hypotheses*. 1997;49:277-280.
169. Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal*. 2001;13:85-94.
170. Glauser MP. The inflammatory cytokines. New developments in the pathophysiology and treatment of septic shock. *Drugs*. 1996;52 Suppl 2:9-17.
171. Wilson ME. Effects of bacterial endotoxins on neutrophil function. *Rev Infect Dis*. 1985;7:404-418.
172. Karpman D, Connell H, Svensson M, Scheutz F, Alm P, Svanborg C. The role of lipopolysaccharide and Shiga-like toxin in a mouse model of *Escherichia coli* O157:H7 infection. *J Infect Dis*. 1997;175:611-620.
173. Bielaszewska M, Janda J, Blahova K, Minarikova H, Jikova E, Karmali MA, Laubova J, Sikulova J, Preston MA, Khakhria R, Karch H, Klazarova H, Nyc O. Human *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with the consumption of unpasteurized goat's milk. *Epidemiol Infect*. 1997;119:299-305.
174. Cray WC, Jr., Moon HW. Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol*. 1995;61:1586-1590.
175. Dean-Nystrom EA, Bosworth BT, Moon HW. Pathogenesis of O157:H7 *Escherichia coli* infection in neonatal calves. *Adv Exp Med Biol*. 1997;412:47-51.
176. Dean-Nystrom EA, Bosworth BT, Moon HW. Pathogenesis of *Escherichia coli* O157:H7 in weaned calves. *Adv Exp Med Biol*. 1999;473:173-177.
177. Pruimboom-Brees IM, Morgan TW, Ackermann MR, Nystrom ED, Samuel JE, Cornick NA, Moon HW. Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:10325-10329.
178. Wadolkowski EA, Sung LM, Burris JA, Samuel JE, O'Brien AD. Acute renal tubular necrosis and death of mice orally infected with *Escherichia coli* strains that produce Shiga-like toxin type II. *Infect Immun*. 1990;58:3959-3965.
179. Cornick NA, Matise I, Samuel JE, Bosworth BT, Moon HW. Edema disease as a model for systemic disease induced by Shiga toxin-producing *E. coli*. *Adv Exp Med Biol*. 1999;473:155-161.

180. Cornick NA, Matise I, Samuel JE, Bosworth BT, Moon HW. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection: temporal and quantitative relationships among colonization, toxin production, and systemic disease. *J Infect Dis.* 2000;181:242-251.
181. Richardson SE, Rotman TA, Jay V, Smith CR, Becker LE, Petric M, Olivieri NF, Karmali MA. Experimental verocytotoxemia in rabbits. *Infect Immun.* 1992;60:4154-4167.
182. Zoja C, Corna D, Farina C, Sacchi G, Lingwood C, Doyle MP, Padhye VV, Abbate M, Remuzzi G. Verotoxin glycolipid receptors determine the localization of microangiopathic process in rabbits given verotoxin-1. *J Lab Clin Med.* 1992;120:229-238.
183. Isturiz MA, De Bracco MM, Pizzi AM, Manni JA. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in rheumatoid arthritis. Effect of rheumatoid serum fractions on normal lymphocytes. *Arthritis Rheum.* 1976;19:725-730.
184. Isturiz MA, Giordano M, Serebrinsky GP. Effect of rheumatoid factors and normal human sera on immune complex-Fc gamma R interaction. *Clin Exp Immunol.* 1983;54:225-231.
185. Duner KI. A new kinetic single-stage *Limulus* amoebocyte lysate method for the detection of endotoxin in water and plasma. *J Biochem Biophys Methods.* 1993;26:131-142.
186. Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1968;97:7.
187. Romeu MA, Mestre M, Gonzalez L, Valls A, Verdager J, Corominas M, Bas J, Massip E, Buendia E. Lymphocyte immunophenotyping by flow cytometry in normal adults. Comparison of fresh whole blood lysis technique, Ficoll-Paque separation and cryopreservation. *J Immunol Methods.* 1992;154:7-10.
188. Perlmann P, Perlmann H. Contactual lysis of antibody-coated chicken erythrocytes by purified lymphocytes. *Cell Immunol.* 1970;1:300-315.
189. Geffner JR, Giordano M, Serebrinsky G, Isturiz MA. Different activation pathways involved in antibody-dependent and immune-complexes-triggered cytotoxicity mediated by neutrophils. *Clin Exp Immunol.* 1988;74:471-476.
190. Vermeire K, Thielemans L, Matthys P, Billiau A. The effects of NO synthase inhibitors on murine collagen-induced arthritis do not support a role of NO in the protective effect of IFN-gamma. *J Leukoc Biol.* 2000;68:119-124.
191. Orucevic A, Lala PK. NG-nitro-L-arginine methyl ester, an inhibitor of nitric oxide synthesis, ameliorates interleukin 2-induced capillary leakage and reduces tumour growth in adenocarcinoma-bearing mice. *Br J Cancer.* 1996;73:189-196.
192. Ehlers S, Kutsch S, Benini J, Cooper A, Hahn C, Gerdes J, Orme I, Martin C, Rietschel ET. NOS2-derived nitric oxide regulates the size, quantity and quality of granuloma formation in *Mycobacterium avium*-infected mice without affecting bacterial loads. *Immunology.* 1999;98:313-323.
193. Suzuki K, Ota H, Sasagawa S, Sakatani T, Fujikura T. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal Biochem.* 1983;132:345-352.
194. Gordon N, Thom J, Cole C, Baker R. Rapid detection of hereditary and acquired platelet storage pool deficiency by flow cytometry. *Br J Haematol.* 1995;89:117-123.
195. Knapp W, Strobl H, Majdic O. Flow cytometric analysis of cell-surface and intracellular antigens in leukemia diagnosis. *Cytometry.* 1994;18:187-198.
196. Altenburg SP, Martins MA, Silva AR, Cordeiro RS, Castro-Faria-Neto HC. LPS-induced blood neutrophilia is inhibited by alpha 1-adrenoceptor antagonists: a role for catecholamines. *J Leukoc Biol.* 1997;61:689-694.
197. Rosales C, Juliano RJ. Signal transduction by cell adhesion receptors in leukocytes. *J Leukoc Biol.* 1995;57:189-198.
198. Gupta S, Feng L, Yoshimura T, Redick J, Fu SM, Rose CE, Jr. Intra-alveolar macrophage-inflammatory peptide 2 induces rapid neutrophil localization in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1996;15:656-663.
199. Rubel C, Miliani De Marval P, Vermeulen M, Isturiz MA, Palermo MS. Lipopolysaccharide enhances Fc gamma R-dependent functions in vivo through CD11b/CD18 up-regulation. *Immunology.* 1999;97:429-437.
200. Hokland P, Berg K. Interferon enhances the antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) of human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol.* 1981;127:1585-1588.
201. Daeron M. Fc receptor biology. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:203-234.
202. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 1992;69:11-25.
203. Crockett-Torabi E, Sulenbarger B, Smith CW, Fantone JC. Activation of human neutrophils through L-selectin and Mac-1 molecules. *J Immunol.* 1995;154:2291-2302.

204. Niessen HW, Verhoeven AJ. Differential up-regulation of specific and azurophilic granule membrane markers in electroporabilized neutrophils. *Cell Signal*. 1992;4:501-509
205. Cohen G, Haag-Weber M, Horl WH. Immune dysfunction in uremia. *Kidney Int Suppl*. 1997;62:S79-82
206. Cohen G, Rudnicki M, Walter F, Niwa T, Horl WH. Glucose-modified proteins modulate essential functions and apoptosis of polymorphonuclear leukocytes. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12:1264-1271
207. Heeringa P, van Goor H, Itoh-Lindstrom Y, Maeda N, Falk RJ, Assmann KJ, Kallenberg CG, Jennette JC. Lack of endothelial nitric oxide synthase aggravates murine accelerated anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Am J Pathol*. 2000;156:879-888
208. Zhou XJ, Laszik Z, Ni Z, Wang XQ, Brackett DJ, Lerner MR, Silva FG, Vaziri ND. Down-regulation of renal endothelial nitric oxide synthase expression in experimental glomerular thrombotic microangiopathy. *Lab Invest*. 2000;80:1079-1087
209. Geffner JR, Trevani AS, de D'Elia I, Diamant M, Klein D, Giordano M. Involvement of nitric oxide in the regulation of peripheral blood leukocyte counts. *J Leukoc Biol*. 1995;58:391-394
210. Schneeberger PM, van Langevelde P, van Kessel KP, Vandenbroucke-Grauls CM, Verhoef J. Lipopolysaccharide induces hyperadhesion of endothelial cells for neutrophils leading to damage. *Shock*. 1994;2:296-300
211. Schleimer RP, Rutledge BK. Cultured human vascular endothelial cells acquire adhesiveness for neutrophils after stimulation with interleukin 1, endotoxin, and tumor-promoting phorbol diesters. *J Immunol*. 1986;136:649-654
212. Westlin WF, Gimbrone MA, Jr. Neutrophil-mediated damage to human vascular endothelium. Role of cytokine activation. *Am J Pathol*. 1993;142:117-128
213. Varani J, Ward PA. Mechanisms of endothelial cell injury in acute inflammation. *Shock*. 1994;2:311-319
214. Lentsch AB, Ward PA. Regulation of inflammatory vascular damage. *J Pathol*. 2000;190:343-348
215. Cockwell P, Savage CO. Role of leukocytes in the immunopathogenesis of ANCA-associated glomerulonephritis. *Nephron*. 2000;85:287-306
216. Hechtman DH, Cybulsky MI, Fuchs HJ, Baker JB, Gimbrone MA, Jr. Intravascular IL-8. Inhibitor of polymorphonuclear leukocyte accumulation at sites of acute inflammation. *J Immunol*. 1991;147:883-892
217. Simonet WS, Hughes TM, Nguyen HQ, Trebasky LD, Danilenko DM, Medlock ES. Long-term impaired neutrophil migration in mice overexpressing human interleukin-8. *J Clin Invest*. 1994;94:1310-1319
218. Kuijpers TW, Tool AT, van der Schoot CE, Ginsel LA, Onderwater JJ, Roos D, Verhoeven AJ. Membrane surface antigen expression on neutrophils: a reappraisal of the use of surface markers for neutrophil activation. *Blood*. 1991;78:1105-1111
219. Huizinga TW, van der Schoot CE, Jost C, Klaassen R, Kleijer M, von dem Borne AE, Roos D, Tetteroo PA. The PI-linked receptor FcR γ is released on stimulation of neutrophils. *Nature*. 1988;333:667-669
220. Huizinga TW, de Haas M, Kleijer M, Nuijens JH, Roos D, von dem Borne AE. Soluble Fc gamma receptor III in human plasma originates from release by neutrophils. *J Clin Invest*. 1990;86:416-423
221. Pryzwansky KB, Wyatt T, Reed W, Ross GD. Phorbol ester induces transient focal concentrations of functional, newly expressed CR3 in neutrophils at sites of specific granule exocytosis. *Eur J Cell Biol*. 1991;54:61-75
222. Remold-O'Donnell E, Parent D. Specific sensitivity of CD43 to neutrophil elastase. *Blood*. 1995;86:2395-2402
223. Tosi MF, Berger M. Functional differences between the 40 kDa and 50 to 70 kDa IgG Fc receptors on human neutrophils revealed by elastase treatment and antireceptor antibodies. *J Immunol*. 1988;141:2097-2103
224. Hughes DA, Smith GC, Davidson JE, Murphy AV, Beattie TJ. The neutrophil oxidative burst in diarrhoea-associated haemolytic uraemic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 1996;10:445-447
225. Quid GA, Cave C, Robinson C, Williams MA, Solomkin JS. Preferential loss of CXCR-2 receptor expression and function in patients who have undergone trauma. *Arch Surg*. 1999;134:1367-1371; discussion 1371-1362
226. Williams MA, Cave CM, Quid G, Solomkin JS. Chemokine regulation of neutrophil function in surgical inflammation. *Arch Surg*. 1999;134:1360-1366

227. Yamamoto T, Nagayama K, Satomura K, Honda T, Okada S. Increased serum IL-10 and endothelin levels in hemolytic uremic syndrome caused by *Escherichia coli* O157. *Nephron*. 2000;84:326-332.
228. Burtnick LD. Modification of actin with fluorescein isothiocyanate. *Biochim Biophys Acta*. 1984;791:57-62
229. Miller L, Phillips M, Reisler E. Polymerization of actin modified with fluorescein isothiocyanate. *Eur J Biochem*. 1988;174:23-29
230. Favazza M, Lerho M, Houssier C. Labelling of histone H5 and its interaction with DNA. 1. Histone H5 labelling with fluorescein isothiocyanate. *J Biomol Struct Dyn*. 1990;7:1291-1300
231. Johnson DA, Taylor P. Site-specific fluorescein-labeled cobra alpha-toxin. Biochemical and spectroscopic characterization. *J Biol Chem*. 1982;257:5632-5636
232. Hentz NG, Richardson JM, Sportsman JR, Daijo J, Sittampalam GS. Synthesis and characterization of insulin-fluorescein derivatives for bioanalytical applications. *Anal Chem*. 1997;69:4994-5000
233. Opdenakker G, Fibbe WE, Van Damme J. The molecular basis of leukocytosis. *Immunol Today*. 1998;19:182-189
234. Terashima T, Wiggs B, English D, Hogg JC, van Eeden SF. Polymorphonuclear leukocyte transit times in bone marrow during streptococcal pneumonia. *Am J Physiol*. 1996;271:L587-592
235. Bicknell S, van Eeden S, Hayashi S, Hards J, English D, Hogg JC. A non-radioisotopic method for tracing neutrophils in vivo using 5'-bromo-2'-deoxyuridine. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1994;10:16-23
236. Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC, Silva AR, Lorangeira AP, Silva PM, Martins MA, Cordeiro RS. Lipopolysaccharide-induced pleural neutrophil accumulation depends on marrow neutrophils and platelet-activating factor. *Eur J Pharmacol*. 1994;270:143-149
237. Nakagawa M, Terashima T, D'Yachkova Y, Bondy GP, Hogg JC, van Eeden SF. Glucocorticoid-induced granulocytosis: contribution of marrow release and demargination of intravascular granulocytes. *Circulation*. 1998;98:2307-2313
238. Terashima T, English D, Hogg JC, van Eeden SF. Release of polymorphonuclear leukocytes from the bone marrow by interleukin-8. *Blood*. 1998;92:1062-1069
239. Dührsen U, Villeval JL, Boyd J, Kannourakis G, Morstyn G, Metcalf D. Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in cancer patients. *Blood*. 1988;72:2074-2081
240. Vierzig A, Roth B, Querfeld U, Michalk D. A 12-year-old boy with fatal hemolytic-uremic-syndrome, excessive neutrophilia and elevated endogenous granulocyte-colony-stimulating- factor serum concentrations. *Clin Nephrol*. 1998;50:56-59.
241. Kerst JM, de Haas M, van der Schoot CE, Slaper-Cortenbach IC, Kleijer M, von dem Borne AE, van Oers RH. Recombinant granulocyte colony-stimulating factor administration to healthy volunteers: induction of immunophenotypically and functionally altered neutrophils via an effect on myeloid progenitor cells. *Blood*. 1993;82:3265-3272
242. Leavey PJ, Sellins KS, Thurman G, Elzi D, Hiester A, Silliman CC, Zerbe G, Cohen JJ, Ambruso DR. In vivo treatment with granulocyte colony-stimulating factor results in divergent effects on neutrophil functions measured in vitro. *Blood*. 1998;92:4366-4374
243. Roberts PJ, Pizzey AR, Khwaja A, Carver JE, Mire-Sluis AR, Lynch DC. The effects of interleukin-8 on neutrophil fMetLeuPhe receptors, CD11b expression and metabolic activity, in comparison and combination with other cytokines. *Br J Haematol*. 1993;84:586-594
244. Yong KL. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) increases neutrophil migration across vascular endothelium independent of an effect on adhesion: comparison with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). *Br J Haematol*. 1996;94:40-47
245. Brach MA, deVos S, Gruss IU, Herrmann F. Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed cell death. *Blood*. 1992;80:2920-2924
246. Rees DD, Cunha FQ, Assreuy J, Herman AG, Moncada S. Sequential induction of nitric oxide synthase by *Corynebacterium parvum* in different organs of the mouse. *Br J Pharmacol*. 1995;114:689-693
247. Ramsay B, Radomski M, De Belder A, Martin JF, Lopez-Jaramillo P. Systemic effects of S-nitroso-glutathione in the human following intravenous infusion. *Br J Clin Pharmacol*. 1995;40:101-102
248. de Belder AJ, MacAllister R, Radomski MW, Moncada S, Vallance PJ. Effects of S-nitroso-glutathione in the human forearm circulation: evidence for selective inhibition of platelet activation. *Cardiovasc Res*. 1994;28:691-694