



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**“MECANISMOS ANTI-INFLAMATORIOS  
GENERADOS EN EL HUÉSPED  
DURANTE LAS INFECCIONES CON  
GÉRMENES GRAM NEGATIVOS”**

*Respuesta anti-inflamatoria en el Síndrome  
Urémico Hemolítico*

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de  
Buenos Aires en el área de Biología.

***Autor: Lic. Sonia Alejandra Gómez***

*Director de Tesis: Dra. Marina S. Palermo*

*Consejero de Estudios: Dr. Eduardo Artz*

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

Buenos Aires, 2005.

# “MECANISMOS ANTI-INFLAMATORIOS GENERADOS EN EL HUÉSPED DURANTE LAS INFECCIONES CON GÉRMENES GRAM NEGATIVOS”

## *Respuesta anti-inflamatoria en el Síndrome Urémico Hemolítico*

### RESUMEN

El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) es una enfermedad que afecta principalmente a niños entre 0-5 años causada habitualmente por *Escherichia coli* productoras de toxina shiga (STEC). El índice de mortalidad es bajo (2-6%) pero el 30% sufre secuelas renales o neurológicas. La acción de la toxina shiga (Stx) junto a la activación de la respuesta inflamatoria montada por el huésped son determinantes para el desarrollo completo del SUH. Nuestros objetivos fueron (a) estudiar los efectos de Stx *in vivo* sobre la respuesta inflamatoria y el balance oxidativo, y (b) analizar los mecanismos montados por el huésped para contrarrestar dichos efectos. En particular, investigamos el papel de los glucocorticoides (GC) y de los antioxidantes. Para esto utilizamos el modelo murino por inoculación endovenosa de Stx de tipo 2 (Stx2). Para analizar los efectos de los GC endógenos utilizamos el antagonista del receptor para GC (R-GC), Ru486. Stx2 indujo la neutrofilia y activación de los neutrófilos. El tratamiento simultáneo Stx2+Ru486 exacerbó la mortalidad, no alteró la concentración de citoquinas, aumentó el daño renal y la activación de los neutrófilos. La Stx2 indujo la expresión receptores para GC en neutrófilos y éstos fueron más sensibles a los efectos de la dexametasona. Stx2 indujo el estrés oxidativo depletando glutatión y aumentando la peroxidación lipídica del riñón, y la generación de intermediarios reactivos del oxígeno en neutrófilos. Este nivel de estrés oxidativo fue bloqueado parcialmente por agentes antioxidantes N-Acetil-L-Cisteína y S-Etil-L-Cisteína, aumentando la supervivencia y suprimiendo la oxidación. En conclusión, Stx2 genera un estado proinflamatorio y oxidativo que contribuyen al daño tisular. Los GC y los antioxidantes endógenos juegan un papel central frenando este efecto. Estos resultados nos permiten proponer el estudio de los efectos beneficiosos de los agentes antioxidantes o antiinflamatorios durante la infección con STEC, antes del desarrollo del SUH.

**PALABRAS CLAVE:** Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), toxina shiga de tipo 2 (Stx2), glucocorticoides (GC), polimorfonucleares neutrófilos (PMN), intermediarios reactivos del oxígeno (IROs), estrés oxidativo, dexametasona (DEX), N-Acetil-L-Cisteína (NAC), S-Etil-L-Cisteína (ETH).

# "ANTI-INFLAMMATORY MECHANISMS INDUCED BY THE HOST DURING INFECTIONS WITH GRAM NEGATIVE GERMS"

## *Antiinflammatory response in Hemolytic Uremic Syndrome*

### SUMMARY

Hemolytic Uremic Syndrome (HUS) is a disease that affects children between 0-5 years and is generally caused by Shiga toxin producing *Escherichia coli*. Mortality rate is low (2-6%) but 30 % of the infected children suffer from renal or neurological *sequelae*. The cytotoxic action of Shiga toxin (Stx) together with the immune response raised by the host determines the complete development of HUS. Our objectives were (a) to study the effects of Stx *in vivo* on the inflammatory response and the oxidative balance, and (b) to analyze the mechanisms raised by the host to counteract such effects. In particular, we investigated the role of glucocorticoides (GC) and antioxidants using the murine model by intravenous injection of Stx type 2 (Stx2). To analyze the effects of endogenous GC we used Ru486, antagonist of GC receptor (GR). Stx2 caused neutrophilia and neutrophil activation. Simultaneous treatment with Stx2+Ru486 enhanced mortality, did not alter cytokine levels, decreased renal function and rendered profoundly activated neutrophils. Moreover, Stx2 induced GR expression in neutrophils and these cells were more sensitive to the effects of dexamethasone. Stx2 induced oxidative stress shown by renal glutathione depletion and increased lipid peroxidation, and increased and ROS generation in neutrophils. The oxidative stress induced by Stx2 was partially blocked by antioxidants N-Acetyl-L-Cysteine and S-Ethyl-L-Cysteine, increasing survival and reducing oxidation. In conclusion, Stx2 generates a proinflammatory and oxidative state that contributes with renal damage. GC and endogenous antioxidants play a key role modulating these effects. These results allow us to propose the study of the beneficial effects of antioxidants and anti-inflammatory agents during STEC infections, before de development of HUS.

**KEY WORDS:** Hemolytic uremic syndrome (HUS), shiga toxin type 2 (Stx2), glucocorticoids (GC), polymorphonuclear neutrophils (PMN), reactive oxygen intermediates (ROS), oxidative stress, dexamethasone (DEX), N-Acetyl-L-Cysteina (NAC), S-Etyl-L-Cysteina (ETH).

# Agradecimientos

*Esta tesis es el resultado de muchos años de trabajo que representan los primeros años de mi vida como "investigadora" en el área de las ciencias médicas. En estos años pude consolidar mis sentimientos hacia lo que hago, y hoy en día no podría trabajar en ningún otro tema de investigación que no sea relevante para la salud pública. Espero que este pequeño aporte sirva para algo en esta búsqueda, que parece interminable, de una cura definitiva para el Síndrome Urémico Hemolítico.*

*Quiero agradecer a todos los que me acompañaron y me ayudaron a realizar este trabajo en estos años.*

*Especialmente quiero agradecerle a mi jefa, Marina Palermo, principalmente por guiarme, por enseñarme a razonar y a discutir cada experimento o tema de trabajo. Gran parte de lo que me llevo fue gracias a su dirección.*

*También quiero agradecerle profundamente al acompañamiento intelectual y humano de Martín Isturiz. Agradezco especialmente haberme enseñado a detectar lo "importante". Su típica pregunta siempre fue: ¿cuál es la figura más importante de tu trabajo?. Me enorgullece haberlo tenido como co-director, por su gran calidez humana, por su compromiso con los problemas de la salud pública y por su pasión por la ciencia.*

*Esta tesis no se hubiera podido realizar sin la ayuda de mis queridísimas compañeras de todos los días. Entre ellas están Gabriela Fernández y Carolina Rubel. Gracias, mil gracias por haber estado siempre ahí. Las quiero muchísimo. También a Fernanda Alves Rosa, amiga y colaboradora en muchos proyectos. Especiales gracias a Graciela Dran, a quien voy a extrañar horrores, junto a su becaria Gabriela Camerano que me ha ayudado quién sabe cuanto!!!!. a Paula Barrionuevo, Macarena Beigier Bompadre, Leticia Bentancor, María Victoria Ramos...*

*Agradezco, aunque ya no esté con nosotros, al queridísimo Juan Portaluppi. Cada vez que cruzo la puerta de doble hoja...me lo imagino yendo para el fondo.*

*A toda la sección de Leucemia Experimental, Isabel Piazzon, Irene Nepomansky, a las chicas, Dalia, Gaby, Juli., Tito por toda su asistencia con los animales*

*A Martita Filippo, Nora Galassi, Norma Riera de citometría de flujo.*

*A Nelly, Selma, Natalia, Ebelia y Pilar*

*A Oscar Bustoabad*

*Esta tesis fue redactada gracias a la ayuda infinita de mis dos primas Irene y Carina Zeroleni, y por supuesto de Guille, que sin el no funciona. Gracias a mis padres Graciela y Néstor que pacientemente cuidaron de Ana siempre que fue necesario.*

*Muchísimas Gracias*

## ABREVIATURAS

## NOMBRE COMPLETO

A/E	attaching and effacing/pegado y despegado
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ARNr	ácido ribonucleico ribosomal
Anti-PMN	anticuerpo anti polimorfonuclear
BSA	Suero de Albúmina Bovina
CTI	Colágeno tipo I
DEX	Dexametasona
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
ETH	S-Ethil-L-Cisteina
FGN	Fibrinógeno
FITC	Isiotiocianato de Fluoresceína
FvW	Factor VonWillebrand
Gb <sub>3</sub>	Gobotriaosilceramida
Gb <sub>4</sub>	Gobotetraosilceramida
GR	Góbulo rojo
GSH	Glutation
Hb	Hemoglobina
HPA	Eje hipotálamo-pituitaria-adrenal
HUVEC	células de cordón umbilical humanas
IL	Interleuquina
IMF	Intensidad media de fluorescencia
IROs	Intermediarios reactivos del oxígeno
LEE	isla de patogenicidad LEE
LPS	Lipopolisacárido
MAT	Microangiopatía trombótica
MDA	Malondialdheido
MEC	Matriz Extracelular
MoAc	Anticuerpo monoclonal
MPO	mieloperoxidasa
NAC	N-Acetil-L-Cisteina
NF-κB	Factor transcripción nuclear Kappa Beta
PMN	Neutrófilos
RE	Retículo endoplásmico
R-GC	Receptor para glucocorticoides
Ru486	Mifepristone
SFB	Suero Fetal Bovino
STEC	<i>E. coli</i> productoras de toxina shiga
Stx	Toxina shiga
SUH	Síndrome Urémico Hemolítico
TBARS	Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral- alfa

# Indice

	PAGINA
* Resumen y palabras clave en castellano	2
* Resumen y palabras clave en inglés	3
* Agradecimientos	4
* Abreviaturas	5
1.- Antecedentes y Objetivos	9
2.- Introducción	
2.1 Aspectos principales del Síndrome Urémico Hemolítico	12
2.1.1 Etiología	12
2.2 Epidemiología	13
2.3 Características de la toxina Shiga (Stx)	14
2.3.1 Serotipos	14
2.3.2 Estructura	15
2.3.3 Receptores de la toxina shiga.	16
2.3.4 Endocitosis de Stx.	17
2.4 Patogénesis del SUH	18
2.4.1 Adherencia difusa o localizada	19
2.4.2 Adherencia por intimina	19
2.4.3 Plásmido de 60MD (p0157)	20
2.5 Fisiopatogénesis	21
2.6 Fisiopatología y Cuadro Clínico	22
2.6.1 Trombocitopenia	23
2.6.2 Anemia Hemolítica	23
2.6.3 Insuficiencia Renal Aguda	24
2.6.4 Efecto de la Stx2 sobre las células del tejido renal	24
2.7 Participación de citoquinas en el SUH	25
2.8 Participación Polimorfonucleares Neutrófilos (PMN)	27
2.8.1 Características generales	27
2.8.2 Participación de los PMN en el SUH	29
2.9 Regulación Neuro-Endocrino Inmune	29
2.9.1 Eje Hipotálamo Hipófisis Adrenal (HPA)	30
2.9.2 Función de los GC sobre el Sistema Inmune	30
2.9.3 Receptores para Glucocorticoides (R-GC)	33
2.9.4 Antagonista del R-GC: Mifepristone (Ru486)	34
2.10 Estrés Oxidativo y SUH	34
2.10.1 Conceptos generales	34
2.10.2 Agentes Antioxidantes	35
2.10.3 Detección de estrés oxidativo	37
2.10.4 SUH y estrés oxidativo	37

2.11 Tratamientos	38
2.11.1 En Uso	38
2.11.2 En Estudio	39
2.11.3 Desarrollo de vacunas	40
2.12 Modelos Experimentales de SUH	40
3.- Materiales y Métodos	43
3.1 Anticuerpos y Reactivos	43
3.2 Ratones	43
3.3 Preparación de Stx2	43
3.4 Ensayos de toxicidad en células Vero	44
3.5 Tratamientos <i>in vivo</i> e <i>in-vitro</i>	44
3.6 Estudios de Flujo Renal	45
3.7 Determinaciones de TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$	46
3.8 Determinación bioquímica de urea en plasma.	46
3.9 Determinación de Glutación total (GSH)	46
3.10 Determinación nación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)	47
3.11 Estudios Histológicos	47
3.12 Recuento y Fórmula	48
3.13 Purificación de Neutrófilos Polimorfonucleares (PMN)	48
3.14 Estudios de función del Neutrófilo	48
3.14.1 Adhesión de Neutrófilos	48
3.14.2 Ensayo de Quimiotaxis.	49
3.14.3 Expresión de CD11b	49
3.14.4 Intermediarios Reactivos del Oxígeno (IROs)	49
3.14.5 Fagocitosis inespecífica de Zymozán-FITC (Zy-FITC).	49
3.14.6 Cuantificación de la Apoptosis Espontánea	
de Neutrófilos	50
3.15 Estudios de depleción de neutrófilos	50
3.16 Estadística	51
4.- Resultados	
Sección 4.1	
4.1.1 Efecto de los glucocorticoides endógenos y exógenos a distintos intervalos de tiempo sobre la toxicidad de Stx2.	52
4.1.2 Citoquinas inflamatorias luego de la inoculación con Stx2	53
4.1.3 Flujo renal <i>in vivo</i>	54
4.1.4 Expresión de receptores para GC (R-GC) en neutrófilos	56

4.1.5 Ensayo de depleción de PMN en animales tratados con Stx2 y Ru486 o DEX	57
<i>Resumen Sección 4.1</i>	60
<i>Sección 4.2</i>	
4.2.1 Recuento de neutrófilos.	62
4.2.2 Adhesión de neutrófilos	63
4.2.3 Ensayo de migración	66
4.2.4 Expresión del marcador CD11b en los PMN circulantes	67
4.2.5 Generación de Intermediarios Reactivos del Oxígeno (IROs)	
por PMN	68
4.2.6 Capacidad fagocítica de PMN	71
4.2.7 Apoptosis de PMN	73
<i>Resumen sección 4.2</i>	75
<i>Sección 4.3</i>	
4.3.1 Peroxidación lipídica	77
4.3.2 Glutación total (GSH) intracelular	78
4.3.3 Efecto de NAC y ETH sobre la generación de IROs	
en neutrófilos.	79
4.3.4 Efecto de NAC y ETH sobre la peroxidación lipídica en riñón	80
4.3.5 Efecto de NAC y ETH sobre le contenido de GSH total en riñón	80
4.3.6 Efecto de NAC y ETH en el índice de sobrevida.	81
4.3.7 Efecto de NAC y ETH sobre la función renal: Determinación de uremia	83
4.3.8 Efecto de NAC y ETH sobre la función renal: Apariencia histológica	84
<i>Resumen Sección 4.3</i>	86
5.- Discusión	88
Bibliografía	108

La forma típica del síndrome urémico hemolítico (SUH) es precedida generalmente por diarrea sanguinolenta y se caracteriza como una microangiopatía trombótica, anemia hemolítica con fragmentación de eritrocitos, trombocitopenia y falla renal aguda. Esta enfermedad es la principal causa de daño renal en la población pediátrica y nuestro país posee la mayor incidencia mundial. El agente etiológico es predominantemente la enterobacteria gram negativa *Escherichia coli* productora de toxina shiga (STEC). De todos los pacientes infectados por STEC, solo alrededor del 10-15 % evoluciona a SUH. Los índices de mortalidad son bajos ( $\approx$ 2-6% en el período agudo) debido a las terapias de soporte que se utilizan para tratar los síntomas, fundamentalmente la diálisis peritoneal, pero el 30% de los infectados pueden presentar distintos grados de secuelas renales crónicas o neurológicas. El SUH se desarrolla luego de la ingestión de alimentos o bebidas contaminadas con STEC. La bacteria presente en los alimentos contaminados coloniza el intestino y secreta la toxina shiga (Stx) que luego de atravesar la barrera intestinal, entra a la circulación sistémica, alcanzando al órgano blanco (riñón), en donde interactúa con su receptor específico (Gb<sub>3</sub>) para internalizarse e inhibir la síntesis proteica. En el riñón la toxina causa destrucción de las células epiteliales tubulares y del endotelio glomerular [1]. Durante este proceso se expone el subendotelio, se activa la cascada de coagulación, se liberan factores de agregación plaquetaria y mediadores inflamatorios. Como consecuencia, hay obstrucción de la microvasculatura que genera focos de daño por isquemia dando lugar a la insuficiencia renal aguda, fragmentación mecánica de glóbulos rojos (anemia hemolítica), y la activación y consumo de plaquetas a la trombocitopenia [2].

La toxina shiga es necesaria pero no suficiente para causar el nivel de daño que se observa en biopsias de pacientes. Numerosas evidencias han dado cuenta del papel determinante de la respuesta inflamatoria para el desarrollo del SUH.

- Trabajos *in vivo* como *in vitro* demostraron que mediadores inflamatorios como los lipopolisacáridos (LPS), el TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  potencian el daño inducido por la toxina. [3-5].

- En el modelo murino, la inoculación intravenosa de Stx2 pura, libre de LPS provoca neutrofilia prolongada, sin alterar otras poblaciones de leucocitos. Estos neutrófilos muestran un incremento en la expresión de la molécula CD11b, en la adhesión a vasos de pulmón y en la capacidad citotóxica. Además se demostró una correlación positiva entre porcentaje de neutrófilos y daño renal [6].

\* El LPS puede aumentar o disminuir la toxicidad de Stx2 dependiendo de la dosis y el tiempo de inoculación. Esto sugiere que el efecto del LPS sobre la toxicidad de la Stx2 es una consecuencia de los efectos opuestos inducidos por la respuesta inflamatoria o antiinflamatoria del huésped [7].

\* La Stx2 es capaz de estimular al eje hipotálamo hipófisis adrenal (HPA) induciendo la secreción de glucocorticoides (GC). Más aun, la depleción de GC endógenos aumenta el daño renal inducido por la acción tóxica de Stx2 y en consecuencia la mortalidad [8].

En conclusión, la Stx2 genera un estado proinflamatorio, protagonizado por neutrofilia y activación de los PMN. La respuesta anti-inflamatoria es capaz de contrarrestar en forma parcial los efectos tóxicos de la Stx2.

Teniendo en cuenta dichos antecedentes, el objetivo central de esta tesis fue estudiar (a) estudiar los efectos de Stx *in vivo* sobre la respuesta inflamatoria y el balance oxidativo, y (b) analizar los mecanismos montados por el huésped para contrarrestar dichos efectos. En particular, investigamos el papel de los glucocorticoides (GC) y de los antioxidantes.

**Como objetivos particulares nos planteamos:**

**(a) Estudiar aspectos aún no investigados de los efectos de la toxina shiga *in vivo* sobre la respuesta inflamatoria.**

Para lograr estos objetivos analizamos:

- a(i) la concentración de citoquinas proinflamatorias en plasma.
- a(ii) el recuento y la funcionalidad del neutrófilo

**(b) Estudiar de qué manera los GC endógenos ejercen protección parcial contra la toxicidad de Stx2.**

Para determinar el papel de los GC endógenos neutralizamos el efecto de los mismos gracias al tratamiento con Ru486, antagonista específico del receptor para GC (R-GC) y nos preguntamos lo siguiente:

b(i) A qué tiempos respecto de la entrada de la toxina a la sangre los GC ejercen máxima protección.

b(ii) Si los GC actúan alterando los niveles de citoquinas proinflamatorias en plasma.

b(iii) Si actúan modificando la neutrofilia inducida por Stx2.-

b(iv) Si actúan alterando el potencial citotóxico (patogénico) del neutrófilo.

b(v) Si los neutrófilos presentan mayor sensibilidad a los efectos antiinflamatorios de los GC (dexametasona). Para esto analizamos los efectos directos de la dexametasona sobre los neutrófilos de animales tratados con Stx2.

**(c) Estudiar los efectos de la toxina shiga *in vivo* sobre el balance oxidativo.**

Sobre este punto nos preguntamos si la toxina shiga también es capaz de romper el balance oxidativo llevando al organismo a un estado de estrés oxidativo. Para resolver dicha pregunta estudiamos si Stx2 es capaz de alterar la concentración basal de antioxidantes endógenos, y/o de aumentar el daño por oxidación *in vivo*.

## **2.1 Aspectos principales del Síndrome Urémico Hemolítico**

El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) es una enfermedad caracterizada por la tríada de anemia hemolítica no inmune, trombocitopenia e insuficiencia renal aguda debido a los trombos de plaquetas que se forman en la microcirculación del riñón. Luego se desarrolla una microangiopatía trombótica (MAT) propia de esta enfermedad. La forma típica del SUH es de carácter infeccioso y epidémico y se presenta principalmente en niños entre 0 y 5 años aunque pueden ser mayores también, precedida generalmente por diarrea hemorrágica. Las formas atípicas del SUH pueden manifestarse con signos neurológicos transientes secundarios a la agregación plaquetaria y la obstrucción de la microcirculación del cerebro pero sin diarrea [9].

### **2.1.1 Etiología**

#### **(a) Forma Típica o Infecciosa**

El agente etiológico del SUH típico es la infección con cepas de bacterias *Escherichia coli* enterohemorrágicas (EHEC) o *E. coli*, productoras de toxina shiga (STEC). La cepa O157:H7 es la de mayor importancia epidemiológica, aunque existen muchas otras también capaces de causar la enfermedad (O26, O111, O113, O121, O145, etc) [10]. En este trabajo nos centraremos en el estudio de los efectos de la toxina shiga (Stx) en el huésped, responsable de la forma típica de infección.

#### **(b) Forma Atípica o no infecciosa [2]**

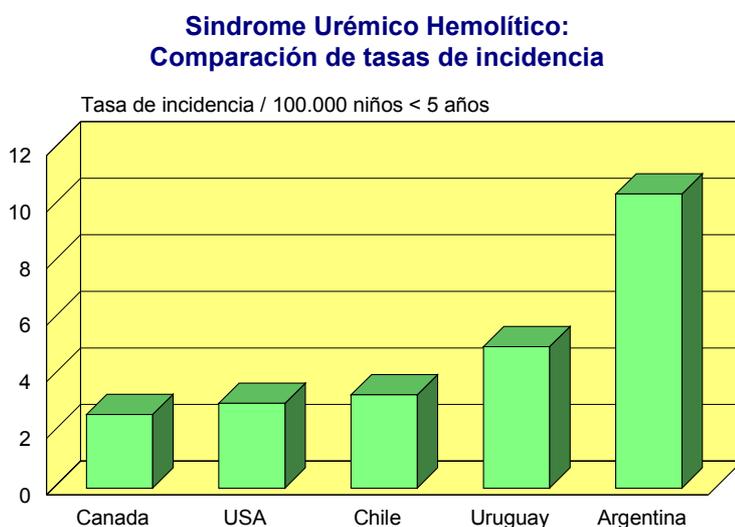
Existen otras etiologías de SUH, y en conjunto corresponden a las así llamadas SUH no típico o atípico, no epidémico:

- i. **hereditarias:** autosómica dominante-recesiva, errores del metabolismo B12, deficiencia Factor H, deficiencia prostaciclina, deficiencia ADAMTS 13.
- ii. **por drogas:** mitomicina, contraceptivos, cocaína, ciclosporina A, quinina, etc.
- iii. **post transplante:** riñón, hígado, intestino, médula ósea.
- iv. **otros:** post parto, cáncer, o hipertensión maligna.

## 2.2 Epidemiología

El SUH es la causa más frecuente de insuficiencia renal aguda en la infancia a nivel mundial. Ocurre en mayor grado en los meses más cálidos, entre Septiembre y Marzo para el hemisferio sur, que coinciden con un mayor aislamiento de ECEH del ganado bovino, pero existen casos esporádicos durante todo el año. La variación de la incidencia en distintos países y aún en distintas regiones de un mismo país puede estar relacionada con los métodos de procesamiento y los hábitos de consumo de la carne propios de cada región. Estudios realizados en USA informaron una incidencia anual de casos 1.42/100.000 niños [11]. En América del Sur el problema se concentra en países del cono Sur donde las tasas de infección son similares a las comunicadas por países industrializados. Por ejemplo en Chile y Uruguay, la incidencia anual es entre 3-4/100.000 niños menores de 5 años [12].

En nuestro país se registran entre 400 a 500 nuevos pacientes por año, correspondiendo a una incidencia de 11,5/100.000, niños menores de 5 años. Las estadísticas indicaron que entre los años 1965-2004 se registraron más de 7.000 casos de SUH con un porcentaje de insuficiencia renal crónica del 30 % y de mortalidad en el período agudo de 2.9%, según estudios realizados por el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) ANLIS, Malbrán y el Ministerio de Salud de la Nación Argentina (ver **figura 2.1**) [12]. Si bien el rango de edad de infectados es entre 0 y 5 años de edad, la incidencia máxima se encuentra en niños entre los 6 y 24 meses de edad, sin distinción de sexo [11].



**Figura 2.1.**  
Comparación de  
tasas de incidencia  
de SUH.

El ganado vacuno es el mayor reservorio de cepas de STEC, pero también se encontró en otros animales domésticos (ovejas, cerdos, cabras, perros y gatos [13]). Pero la entrada de la bacteria a la cadena alimentaria se produce en general por la contaminación de la carne vacuna con heces o contenidos del intestino del animal durante el faenamiento. La carne picada en particular representa el mayor riesgo porque al ser picada, la contaminación en la superficie es distribuida al interior. La cocción insuficiente de este alimento lo transforma en el mayor factor de riesgo asociado al SUH. Otras fuentes de contagio son los productos lácteos no pasteurizados, el agua de natatorios, el salame, y el contacto persona-persona [14]. Esta bacteria es muy virulenta ya que se necesitan menos de 70 bacterias O157:H7 vivas en la carne mal cocida o en la leche no pasteurizada para producir síntomas gastrointestinales severos [15]

De todos los pacientes infectados con STEC, solo entre el 10-15 % desarrolla SUH. Por otra parte, el riesgo de mortalidad se encuentra entre el 2 y el 6% durante el período agudo, dependiendo de factores tales como la oportunidad de diagnóstico y la precocidad del tratamiento de la insuficiencia renal [12]. Aproximadamente el 30 % de los pacientes con SUH sufren secuelas graves como insuficiencia renal crónica con requerimiento de diálisis o de transplante, otros presentan secuelas a largo plazo como hipertensión, defectos en la capacidad de concentración en orina, proteinuria o reducción del clareado de creatinina [16]. Otros órganos comúnmente afectados son el sistema nervioso y el páncreas [11]. Los síntomas de daño neurológicos severo en el comienzo de la enfermedad anuncian un mal pronóstico, que puede revertirse con el tratamiento inmediato de los desarreglos metabólicos renales. Algunos pacientes experimentan letargia, dolor de cabeza intenso, convulsiones y encefalopatía [17]. Las lesiones del páncreas se caracterizan por microangiopatía trombótica en los islotes de células de Lagerhans [11]

## **2.3 Características de la toxina shiga (stx)**

### **2.3.1 Serotipos**

Existen varios serotipos de *E. coli* productoras de una o más toxinas proteicas que son de la familia de la Stx producida por *Shigella dysenteriae*. Esta toxina es también conocida como verotoxina por sus efectos líticos sobre células Vero (línea celular derivada del mono verde africano) [18]. Estas bacterias pueden producir dos tipos de toxina Stx, Stx1 y Stx2, aunque existen variantes de la Stx2: Stx2a, Stx2c, Stx2d, Stx2d-activable, y Stx2f [19]. Las cepas de origen humano pueden producir Stx1, Stx2, solas o en combinación de las 2 toxinas o sus variantes (Stx1/Stx2, Stx2/Stx2c, etc) [19].

Cada una de las variantes se diferencian por poseer distinta actividad biológica, reactividad a anticuerpos o por la unión a su receptor [19]. Pero las cepas de *E. coli* con mayor probabilidad de inducir SUH son las productoras de Stx2 o sus variantes, posiblemente porque el nivel de transcripción de *stx<sub>2</sub>* *in vivo* es más alto que el de *stx<sub>1</sub>* [20, 21]. Además se ha visto que la microvasculatura renal es 1000 veces más sensible a la acción citotóxica de Stx2 que de la Stx1 [22]. Estas toxinas se encuentran codificadas dentro del genoma de un bacteriófago integrado al cromosoma bacteriano. Este dato posee cierta relevancia teniendo en cuenta que existen factores externos, como los antibióticos, capaces de inducir la transcripción de los genes del fago y así co-expresar a los genes *stx* [23].

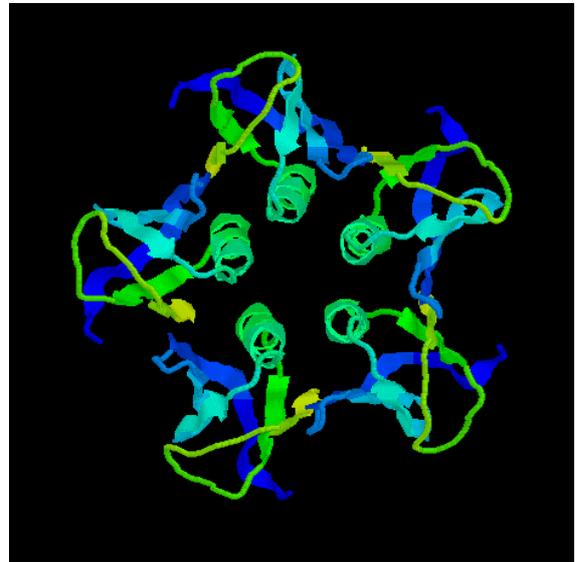
### **2.3.2 Estructura**

Estas toxinas poseen una estructura AB<sub>5</sub> donde una única subunidad A se asocia a 5 subunidades B. La subunidad A posee actividad catalítica que tiene como función interrumpir la síntesis de proteína en la célula blanco eucariota y llevarla a la muerte celular por apoptosis. [19]. El pentámero que forma la *subunidad B* es el responsable de la unión al receptor. Las 5 subunidades están asociadas no covalentemente en forma de anillo estabilizado por las interacciones de las hojas  $\beta$  antiparalelas, mientras que el eje central está rodeado por cinco hélices  $\alpha$  y allí acomoda al carboxiterminal de la subunidad A para mantener la estructura de la holotoxina (**Figura 2.2**)

(a) *Holotoxina: 1 A: 5 B*  
(vista lateral)



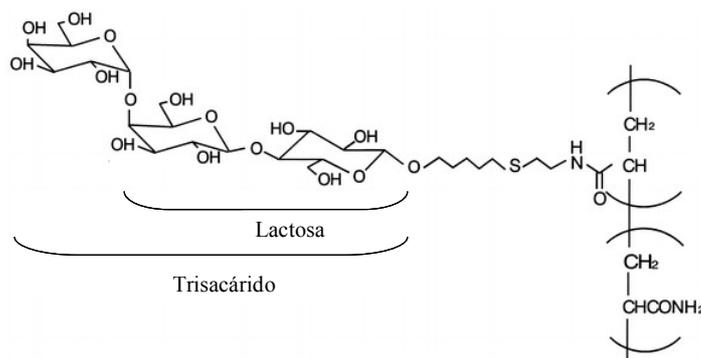
(b) *Pentámero B*  
(vista superior)



**Figura 2.2.** Estructura de la toxina shiga. (a) vista lateral de la holotoxina, (b) vista superior del pentámero B de unión al receptor [19].

### 2.3.3 Receptores de la toxina Shiga

El pentámero de la subunidad B (**Figura 2b**) de Stx contiene sitios de unión a glicolípidos que se encuentran en la superficie de las células blanco y por lo tanto estas estructuras median la entrada de la subunidad catalítica 'A' a las células. El receptor es conocido como globotriaosilceramida ( $Gb_3$ ) o CD77 o el antígeno Pk de eritrocitos, es un marcador del centro germinal B en los ganglios linfáticos, además de ser el antígeno del linfoma de Burkitt. Las toxinas de tipo Stx, Stx1, Stx2 y Stx2c reconocen al trisacárido terminal del receptor  $Gb_3$ , glicoesfingolípidos globotriaosilceramida [Gal $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 4)-Gal $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4) glucosil ceramida, donde Gal refiere galactosa], (Figura 2.3) con la excepción de Stx2e que se une preferentemente al globotetraosilceramida ( $Gb_4$ ) [24].



**Figura 2.3** Estructura del Gb<sub>3</sub> y de los trisacáridos terminales necesarios para la unión de Stx, Stx1 o Stx2 [25].

En humanos, este receptor ha sido encontrado sobre el epitelio renal de túbulo distales, en el endotelio de la microvasculatura y en las células glomerulares del mesangio [18]. De todas formas la sensibilidad de la toxina shiga no siempre se correlaciona con la cantidad de receptores en el órgano blanco. Esto se debe a que la composición de glicolípidos presente en los receptores también regula la unión de la toxina y por lo tanto el grado de citotoxicidad [26].

El reconocimiento y unión de la toxina Shiga al receptor Gb<sub>3</sub> dependen no solo de la presencia del mismo en el tejido blanco, sino también de su composición lipídica. Es decir que la forma de presentación del glicolípido tendrá influencia sobre la capacidad de la toxina para reconocer la estructura del receptor. Por ejemplo, cuando la composición de ácidos grasos es heterogénea, la unión de la toxina al Gb<sub>3</sub> es mejor que cuando es homogénea. Por otra parte, la longitud de la cadena de carbonos de los ácidos grasos, así como el grado de saturación, también afecta la unión a la toxina: Stx1 une en forma óptima a Gb<sub>3</sub> conformados por ácidos grasos de 20-22 carbonos, mientras que Stx2c une mejor a receptores que posean cadenas de 18 átomos de carbono en sus ácidos grasos [24]. Para ambos subtipos de toxina la unión al receptor mejora cuando los ácidos grasos son insaturados. Esta característica estructural podría explicar las variaciones que se observan *in vivo* en la especificidad de unión o susceptibilidad de la toxina a los diversos tejidos o tipos celulares [18].

Existen evidencias que demuestran la interacción de los receptores glicolípidos presentes en la membrana plasmática de glóbulos rojos (GR) con Stx. Los antígenos P del grupo sanguíneo humano son glicolípidos que incluyen a los antígenos: Pk (que es Gb<sub>3</sub>), P (que es Gb<sub>4</sub>) y P1 (un neolactoceramida que también posee un extremo Gal $\alpha$ 1-4Gal). La exposición relativa de cada uno de estos antígenos varía con el grupo sanguíneo, por lo tanto se ha hipotetizado que la unión de la toxina a la superficie de los GR puede secuestrar toxina del sistema y así sacarla de la circulación, previniendo el acceso de la misma a las células endoteliales renales más sensibles [24, 27]. De todas formas todavía no existen pruebas suficientes que demuestren la participación de los eritrocitos en la patogénesis del SUH.

### **2.3.4 Endocitosis de Stx**

Una vez que la Stx se une a su receptor sobre la membrana de la célula blanco, las moléculas de la toxina son internalizadas por endocitosis mediada por receptor [28]. La internalización involucra la formación de hoyos de clatrina dentro de la membrana celular, que más tarde se desprenden para formar vesículas selladas con la toxina fusionada a la superficie interna. Algunos tipos celulares que expresan Gb<sub>3</sub> son insensibles a la citotoxicidad de la Stx. Esto se debe a que la toxina entra por vesículas que se funden con lisosomas, y cuyo contenido degrada a la toxina [24]. En células sensibles a Stx, la toxina entra por endosomas y de ahí es llevada a la red del trans-Golgi por transporte retrogrado hacia el retículo endoplasmático rugoso, a la membrana nuclear o al citoplasma donde tiene acceso a los ribosomas [29, 30]. Durante este proceso la subunidad A es clivada por la proteasa furina generando un fragmento A1, N-terminal de 27 kDa catalíticamente activo y un fragmento A2 en el C terminal que permanece unido a A1 por un puente disulfuro [31]. Finalmente, éste puente es reducido para liberar completamente el fragmento A1. El fragmento A1 libre posee actividad RNA N-glicosilasa y corta la unión N-glicosiladas de la adenina en la posición 4324 del extremo 5' en la subunidad ribosomal 28s [32, 33]. Este corte inhibe la elongación en la síntesis proteica y más tarde causa la muerte celular por apoptosis dado que la adenina extraída es crítica para la unión del factor de elongación-1 aminoacetil, dependiente del t-RNA, al ribosoma [16].

## **2.4 Patogénesis del SUH**

La patogénesis del SUH es un proceso multifacético que involucra la interacción tanto de factores bacterianos como del huésped. Dosis muy bajas de esta bacteria son suficientes para causar la enfermedad dado que una vez ingeridas con los alimentos sobreviven al ambiente ácido del estómago, ya que son resistentes al pH bajo, y más tarde deben competir con otros microorganismos para establecer la colonización intestinal.

La colonización de las *E. coli* enterohemorrágicas (ECEH) se establece a través de la adhesión de la bacteria al epitelio intestinal. En general se sabe que la bacteria coloniza el intestino delgado distal pero principalmente el colon.

Estudios realizados en cultivos *in vitro* de células intestinales humanas han demostrado que la unión inicial de las *E. coli* O157:H7 ocurre en el folículo asociado al epitelio de las placas de Peyer, en el intestino delgado. Luego se produciría la colonización del colon [34, 35]. La mayoría de los estudios de adhesión han sido realizados utilizando líneas celulares de intestino donde se pudieron detectar los distintos fenotipos de adherencia [36]. Dentro de las cepas de ECEH existe mucha heterogeneidad en la forma de adherirse al epitelio, aquí se describen las más relevantes.

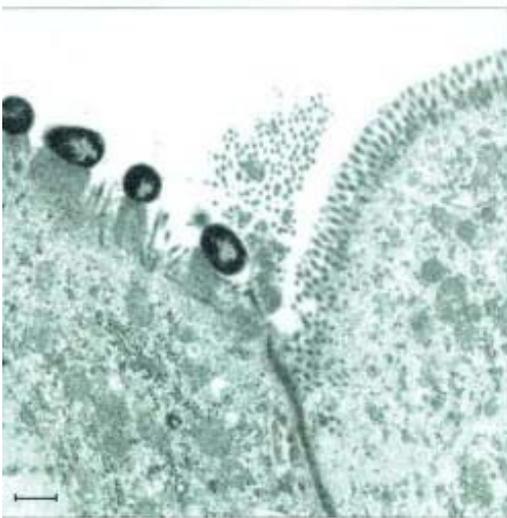
#### **2.4.1 Adherencia difusa o localizada**

La adherencia difusa se observa en algunas cepas EHEC o EPEC (*E. coli* enteropatógenicas), donde la bacteria se encuentra distribuida uniformemente sobre la superficie de las células epiteliales. Otras cepas EHEC se adhieren en forma localizada, formando grupos estrechos o microcolonias en un número determinado de sitios sobre la superficie epitelial.

#### **2.4.2 Adherencia por intimina.**

La unión de la bacteria a los enterocitos depende de las adhesinas que son proteínas codificadas dentro del cromosoma de las ECEH. La adhesión de la bacteria ocurre en forma localizada, es decir, que la bacteria se adhiere formando focos de lesión conocidos como “*attaching and effacing A/E*” (en inglés) que significa “pegado y borrado” [35]. El nombre viene de las lesiones que se caracterizan por la pérdida de las microvellosidades de los enterocitos, la adherencia íntima de la bacteria a la superficie celular y además porque en los enterocitos afectados por la unión, se acumulan componentes del citoesqueleto celular, como actina polimerizada que forman pedestales (Figura 2.4). Estas transformaciones son mediadas por proteínas que se encuentran codificadas en la isla de patogenicidad LEE del cromosoma bacteriano, conocido como locus para el borrado de los enterocitos. El gen *eaeA* codifica para la proteína de membrana **intimina**, que media la adhesión de la bacteria al enterocito, y para su receptor (*Tir* o EspE) que luego de ser secretado por la bacteria se inserta en la membrana del enterocito [18]. Esta isla también posee genes *esp* que codifican para proteínas que se secretan y que son responsables de inducir la

transducción de señales en las células epiteliales que derivan en el desarrollo de las lesiones A/E [23] La dirección o control de todos los mecanismos puestos en marcha por la bacteria para colonizar el colon, por ejemplo la expresión del aparato de secreción de tipo III que es necesaria para generar las lesiones A/E, está regulada por **quórum sensing**, un mecanismo por el cual la bacteria puede regular su propia población y la de otras bacterias que la rodeen (como las *E. coli* no patógenas presentes en el intestino humano) [35]. Si bien las lesiones A/E no han sido observadas en pacientes, se cree que la asociación íntima entre la bacteria y el epitelio promueve la deposición o secreción de toxina shiga a la mucosa, y las lesiones A/E estarían aumentando la permeabilidad del intestino facilitando la absorción de la toxina a través del epitelio intestinal a la sangre [23].



**Figura 2.4.** Micrografía por microscopio electrónico de transmisión que muestra lesiones A/E (izquierda) y microvellosidades conservadas (derecha), inducidas por *E. coli* O111 en biopsias del epitelio del colon bovino (adaptado de Stevens PM, et al , 2002) [37]

#### **2.4.2 Plásmido de 60MD (p0157)**

Las bacterias *E. coli* O157:H7 y otras cepas también poseen un plásmido de 75-100 kb (pO157) que codifican genes que podrían poseer importancia patogénica. Este plásmido lleva consigo los genes *hly* que da como producto una hemolisina, *katP*, que corresponde a una catalasa-peroxidasa bifuncional, *espP*, que codifica para una serino-proteasa extracelular que cliva al factor de coagulación humano V y a la pepsina A y por último *etp*, que es un conjunto de genes que codifican para el sistema de secreción tipo II [23]. A pesar de esto, el papel exacto que cumple este plásmido en la patogénesis de la ECEH no ha sido elucidado todavía [23, 35].

## **2.5 Fisiopatogénesis**

Es probable que la diarrea hemolítica sea producto de la acción tóxica directa de Stx sobre la vasculatura de la mucosa [9] y sobre los enterocitos dado que en conejo se demostró que la toxina tiene efectos enterotóxicos directos sobre las vellosidades de células epiteliales que tienen Gb<sub>3</sub>. De todas formas aún no se ha detectado la presencia de Gb<sub>3</sub> en el epitelio intestinal de humanos [35]. Dado que las bacterias ECEH no invaden a las células epiteliales, es decir que colonizan en la forma que se explicó anteriormente pero permanecen en el lumen intestinal, la toxina shiga una vez producida pasa a la circulación por diversos mecanismos para llegar al tejido endotelial y epitelial susceptible. El mecanismo por el cual la toxina pasa a la sangre no ha sido demostrado *in vivo*, pero todos los estudios realizados *in vitro* con el uso de líneas epiteliales polarizadas de intestino humano han demostrado lo siguiente:

(i) Stx1 cruza la barrera epitelial polarizada (CaCo2A y T84), sin alterar la estructura de la monocapa y sin perder su actividad biológica. Este mecanismo es dependiente de energía y de los microtúbulos, y el pasaje es transcelular [38].

(ii) Stx2 posee un mecanismo de pasaje distinto al de Stx1, aunque tampoco altera la integridad del epitelio polarizado pero es independiente de los microtúbulos. Además, el pasaje de Stx2 es menos eficiente que el de Stx1, aunque la sensibilidad a la toxina de las células endoteliales intestinales y glomerulares es significativamente mayor para Stx2 que para Stx1 [39].

(iii) La infección por ECEH también depende de la interacción entre el huésped y la bacteria. En este sentido, la respuesta inmune tiene un papel determinante en el desarrollo de la enfermedad. La toxina Stx2 induce la síntesis de IL-8 en la submucosa *in vitro*, induciendo el reclutamiento, activación y migración de neutrófilos al intestino [40]. El proceso migratorio y la activación de estas células estarían causando la desestabilización o ruptura de la integridad del epitelio y por lo tanto aumentando la absorción de Stx con la subsiguiente iniciación de las complicaciones sistémicas características del SUH [41].

Una vez que la Stx2 cruza el epitelio intestinal, entra a la sangre desde donde se traslada hacia los órganos blanco que poseen el receptor específico. Se cree que debido a la presencia de Gb<sub>3</sub> en el riñón del humano, y a la compleja estructura de la microvasculatura, es allí donde se produce la mayor cantidad de daño en los distintos tipos celulares [18]. De todas formas esta es una enfermedad sistémica, y otros órganos pueden ser afectados ya sea por la presencia de Gb<sub>3</sub> o como consecuencia del desbalance general ocasionado por la toxina. Por ejemplo, la oligoanuria y la retención de líquido, que en concomitancia con la uremia y la anemia y ocasionalmente miocarditis o pericarditis, pueden dar falla coronaria congestiva. La uremia y la hiponatremia pueden coincidir con disfunción neurológica [9]. Las complicaciones neurológicas son las más serias dentro de las extrarrenales y extraintestinales causadas por Stx. La examinación histopatológica de los tejidos de pacientes sugiere que la toxina shiga daña a las células endoteliales en forma directa. Por otra parte las células endoteliales de la microvasculatura del cerebro humano son relativamente resistentes a los efectos de la Stx pura [42], pero el pretratamiento con TNF- $\alpha$ , aumenta la sensibilidad a la toxina través del aumento de la expresión de Gb<sub>3</sub> sobre el endotelio [43]

## **2.6 Fisiopatología y cuadro clínico**

Las características histopatológicas que se observan en el SUH se denominan “microangiopatía trombótica” (MAT), término que también engloba a otras condiciones como SUH no asociado al prodromo de diarrea (D-SUH) y a la púrpura trombótica trombocitopénica (PTT). El daño endotelial es el sello característico de la MAT observado en pacientes con D+HUS. [35].

El período del prodromo se caracteriza por las manifestaciones gastrointestinales como la diarrea que en la forma típica (D+) la sufren aproximadamente el 90% de los pacientes. Primero aparece la diarrea acuosa que más tarde cambia a sanguinolenta (74-95% de los pacientes) junto a los otros síntomas característicos del prodromo que son el dolor abdominal, la distensión, los vómitos, y menos comunes la invaginación intestinal, el infarto colónico, el prolapso rectal, etc. Luego de un período variable de tiempo (3 y 5

días) la diarrea desaparece y se desarrolla el cuadro clínico completo de insuficiencia renal aguda (IRA), trombocitopenia y anemia hemolítica [16].

### **2.6.1 Trombocitopenia**

La trombocitopenia ocurre por el consumo de plaquetas en microtrombos luego de su activación. En consecuencia, las plaquetas circulantes poseen bajo contenido de  $\beta$ -trombomodulina, se degranulan y no pueden agregarse. Se infiere que las plaquetas han sufrido un proceso de activación previa a la degranulación porque el plasma de pacientes con SUH induce la agregación de plaquetas normales. Además se ha observado que este plasma posee altos niveles de P-selectina,  $\beta$ -trombomodulina y factor plaquetario 4, todos factores inductores de la agregación. Las plaquetas poseen un tipo de receptor glicolípido conocido como banda 0.03 que actúa como receptor de la toxina [44]. Sin embargo, existe controversia sobre la acción directa de la toxina Shiga sobre las plaquetas dado nosotros hemos encontrado que la toxina pura no puede agregar plaquetas en un agregómetro *in vitro* en forma directa [45]. Mientras que Karpman y grupo mostraron que Stx1 puede unirse a las plaquetas e internalizarse en 2 horas, lo que deriva en agregación plaquetaria vista por microscopía confocal [44]. Es posible que la consumición de plaquetas en el SUH puede estar asociada a un efecto indirecto debido al daño sobre la pared vascular que causa la toxina y que expone al subendotelio, liberando por lo tanto factores que inducen la adhesión y la agregación plaquetaria (factor von Willebrand y fibrinógeno). A su vez, al agregarse, las plaquetas disparan reacciones de coagulación local formando pequeños trombos [35, 46].

### **2.6.2 Anemia Hemolítica**

La causa de la anemia hemolítica, se cree que se debe a la fragmentación de los GR ocasionada por la ruptura mecánica que sufren al pasar por la microvasculatura dañada y obstruida por los trombos de plaquetas [35]. Las células endoteliales de la microvasculatura expresan grandes cantidades de Gb3, entonces una vez que la toxina Shiga accede a ellas, las daña y elimina por apoptosis exponiendo al subendotelio y liberando factores de coagulación que

inducen la agregación y activación plaquetaria. Estas plaquetas a su vez colaboran con la liberación de factores de coagulación induciendo la formación de trombos y la deposición de fibrina ocluyendo a los pequeños vasos [46]. Otras lesiones de la membrana del GR ocurren por peroxidación lipídica (daño por oxidación de los fosfolípidos de la membrana plasmática)[9]. Por otra parte, la oclusión es agravada por el daño que ejerce la toxina Shiga sobre el epitelio renal [14].

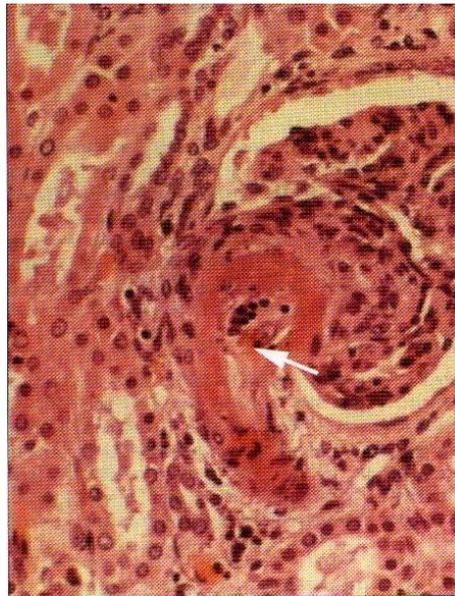
### **2.6.3 Insuficiencia Renal Aguda (IRA)**

La IRA se presenta en el 100% de los casos, en diversos grados. La mayoría de los niños que presenta IRA muy severa tienen en general períodos de oligoanuria prolongados en los primeros días de la enfermedad. También se observa hematuria microscópica en el 100% de los casos y el grado de proteinuria es variable. Además pueden detectarse manifestaciones de daño tubular proximal, y alteraciones en las concentraciones de metabolitos excretados en orina (glucosuria, hiperaminoaciduria, bicarbonaturia) o presentes en la sangre como la hiperpotasemia, hiponatremia, hipocalcemia y acidosis metabólica. El filtrado glomerular sufre un deterioro rápido y la concentración de urea en sangre (uremia) y de creatinina (creatininemia) se elevan rápidamente. Muchos niños superan los 400mg/% de uremia (valor normal: 20-60mg/%) con creatininas superiores a 7 mg/% (valor normal: 0.7 mg/%) [16].

### **2.6.4 Efecto de la Stx2 sobre las células del tejido renal.**

Las lesiones histopatológicas del SUH se deben principalmente a la interacción de la Stx con las células endoteliales y epiteliales del riñón. Cortes histológicos provenientes de biopsias de pacientes muestran trombos y deposición de fibrina y plaquetas dentro de los vasos pequeños (Figura 2.5), a lo que le sigue el daño por isquemia, la hinchazón de las células endoteliales del glomérulo, la oclusión de la luz de las células epiteliales del túbulo renal, la expansión del mesangio y la mesangiólisis. La deposición de fibrina y plaquetas en la microvasculatura renal (particularmente en el glomérulo) derivan en la oclusión capilar que además de inducir la anemia hemolítica por el daño físico a

los eritrocitos, también genera la disminución del flujo sanguíneo al riñón que lleva a la insuficiencia renal. Por otra parte, las lesiones trombóticas mencionadas también son sistémicas [47]. En los casos más severos también se observan extensas regiones de necrosis cortical (túbulos y glomerulos) e infiltrado de células proinflamatorias como neutrófilos polimorfonucleares (PMN) y macrófagos [35].



**Figura 2.5** Corte histológico de biopsia de paciente. Se muestra un trombo con deposición de fibrina y plaquetas dentro de los vasos pequeños [47].

## **2.7 Participación de citoquinas en el SUH.**

Cada vez más evidencia experimental demuestra que la respuesta inmune del huésped a la Stx está involucrada en la patofisiología del SUH. Teniendo en cuenta que solo el 10% de los pacientes infectados genera SUH, es probable que, durante la infección con *E. coli* O157:H7, el desarrollo del daño endotelial máximo requiera de la presencia de Stx, de otros componentes bacterianos, y de sustancias inflamatorias secretadas o producidas por el huésped, ya que la toxina es necesaria pero no suficiente para el desarrollo de la enfermedad [48].

Se ha visto que pacientes con SUH poseen niveles circulantes de IL-6, IL-8, IL-10 y del antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra) en concentraciones de dos a tres veces mayores que los controles, y también que el aumento de estos

mediadores pro y anti inflamatorios están asociados al aumento en la severidad de la disfunción renal que aparece luego de desarrollarse el SUH [49]

Por otra parte, existen trabajos *in vitro* que demuestran la capacidad de la toxina pura para inducir la producción de citoquinas proinflamatorias. Por ejemplo Khoan y equipo encontraron que Stx1 puede inducir la producción de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 en células endoteliales de glomérulo humanas y en células epiteliales de túbulo proximal en cultivo [50]. Al mismo tiempo se sabe que la toxina shiga es capaz de inducir la secreción de IL-8 por las células epiteliales del intestino *in vitro* [51]

Uno de los componentes centrales comunes a todas las bacterias gram negativas, causantes del SUH, es la endotoxina o lipopolisacáridos (LPS). El LPS puede ser uno de los agentes responsables de la inducción de citoquinas en la patofisiología del SUH, entre las que se destacan el TNF- $\alpha$ , la IL-1 $\beta$  y la IL-6 [48]. El LPS puede combinarse con la Stx para amplificar el potencial citotóxico de Stx, induciendo la liberación de citoquinas proinflamatorias. De todas formas no se ha encontrado endotoxemia en pacientes con SUH típico. Pero existen evidencias indirectas de que el LPS ha estimulado a la respuesta inmune ya que se han detectado anticuerpos anti LPS en pacientes [52]. Pero no existen evidencias de endotoxemia en pacientes con SUH, por lo tanto el LPS estaría actuando desde el lumen intestinal. Por otra parte, también se ha visto que el pretratamiento de ratones o conejos con Stx aumenta los efectos letales del LPS [53]. Más aun, el pretatamiento con LPS en ratones puede aumentar o disminuir la toxicidad de la Stx2, dependiendo de la dosis y el tiempo de inoculación, y estos efectos podrían estar modulados por TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  [7].

El TNF- $\alpha$  es un mediador de la inflamación y de la coagulación microvascular, que se encuentra aumentado en el SUH [35]. Esta citoquina es muy relevante en el SUH, ya que se ha demostrado en ratones que la Stx induce la síntesis de TNF en riñón aumentando la sensibilidad a los efectos tóxicos de la toxina [54]. Por otra parte, en monos, la infusión de Stx aumenta la excreción urinaria de TNF- $\alpha$  e IL-6 [55]. Más aun, *in vitro* se ha visto que la Stx1 estimula la producción de citoquinas proinflamatorias en el túbulo proximal [56] y que la preincubación de células epiteliales de túbulo humanas con TNF- $\alpha$  aumentan la apoptosis inducida por Stx2 [57]. Está demostrado que la Stx actúa sinérgicamente junto al TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  para causar los efectos citotóxicos sobre las células endoteliales [58]. El TNF- $\alpha$  aumenta la adherencia de leucocitos a células endoteliales (CE) estimuladas con Stx y aumenta la

expresión de moléculas de adhesión sobre la membrana externa de las CE [59]. En pacientes se han detectado niveles de TNF- $\alpha$  e IL-6 en orina [55].

## **2.8 Participación de los Polimorfonucleares Neutrófilos (PMN).**

### **2.8.1. Características Generales.**

Los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) poseen un papel importante en todas las fases de la defensa del huésped. Estas células abundan en la sangre pero están ausentes en el tejido circundante. Tienen vida corta, ya que luego de dejar la médula ósea, sobreviven unas horas y luego mueren por apoptosis, salvo que sean reclutadas al sitio de la infección o inflamación.

El primer efecto importante de los neutrófilos es ingerir partículas opsonizadas o recubiertas con anticuerpos y/o complemento, pero también pueden ingerir patógenos directamente. Además de ser fagocíticos, los neutrófilos poseen gránulos que contienen enzimas, proteínas y péptidos que median la respuesta intracelular antibacteriana. Los fagocitos pueden dañar bacterias a través de la generación de productos tóxicos liberados al espacio extracelular. Los más importantes son el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el anión superóxido ( $O_2^-$ ) y el óxido nítrico (NO), que son directamente tóxicos para la bacteria. Estos productos son generados en el proceso de estallido respiratorio (explicado más adelante). El efecto colateral de estos agentes microbicidas es que también pueden dañar al tejido circundante. Sin embargo, existe una serie de enzimas y agentes que tratan de controlar este desborde (catalasa, superóxido dismutasa y glutatión oxidasa). Esta respuesta inmune innata es inmediata y puede ser suficiente para prevenir el establecimiento de una infección.

El segundo efecto importante de la interacción del patógeno con el neutrófilo es la secreción de citoquinas. Los neutrófilos activados producen citoquinas que contribuyen con la defensa del huésped. Por ejemplo, la liberación de IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$  inducen la elevación de la temperatura corporal, que beneficia al huésped inhibiendo enzimas el patógeno e induciendo la producción de proteínas de fase aguda. El neutrófilo también

libera quimioquinas que luego de la infección funcionan como quimioattractantes. La más importante es la IL-8 que pertenece a la clase CXC de quimioquinas, es sintetizada además por monocitos, macrófagos, fibroblastos, keratinocitos y células endoteliales entre otras. Esta quimioquina tiene la capacidad para inducir la movilización del neutrófilo de la sangre al tejido infectado, gracias a que estabiliza la unión del neutrófilo a la célula endotelial y que dirige la migración por gradiente de concentración. Por otra parte, IL-8 induce la activación y degranulación del PMN [60].

Los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) son células efectoras pertenecientes a la respuesta inmune innata que participan en la defensa del huésped contra infecciones de diversos tipos [61]. Los PMN circulantes que salen de la médula ósea, deben activarse para migrar a los sitios inflamatorios y para poder eliminar eficientemente a los patógenos [62]. Este es un proceso complejo, mediado principalmente por moléculas de adhesión que se expresan sobre el PMN y sobre el endotelio también activado, pero también es inducido por factores quimiotácticos (IL-8) que ejercen un efecto sobre los PMN induciendo su adhesión, migración y posterior degranulación [63] [64]. El reclutamiento de neutrófilos al tejido inflamado ocurre por el proceso de “rolling” o desplazamiento reversible del PMN sobre el endotelio de las vénulas post capilares, mediado por moléculas de adhesión llamadas selectinas. Luego, la adhesión es más firme ya que está mediada por las moléculas de adhesión conocidas como integrinas, sobre el leucocito y por su contraparte sobre el endotelio [63]. Por último, el proceso de extravasación involucra interacciones coordinadas y transcientes entre las integrinas (LFA-1, Mac-1, CD11/CD18) y las proteínas de la matriz extracelular (MEC) [65]. Este movimiento también es dirigido por un gradiente de concentración de quimioattractantes, principalmente IL-8, al foco infeccioso [64].

Una vez presentes en el foco infeccioso, los PMN fagocitan al microorganismo invasor y lo matan a través de diversos mecanismos entre los que se destacan la fagocitosis, el estallido respiratorio a través de la producción de intermediarios reactivos del oxígeno (IROs), y con la liberación de enzimas proteolíticas [66]. El proceso fagocítico induce la producción de IROs, y ambos procesos a su vez derivan en la inducción de la muerte celular programada o apoptosis del neutrófilo para ser fagocitado por los monocitos y así resolver el foco inflamatorio [67]. La inducción de la apoptosis lleva a una disminución en

la actividad funcional del PMN (quimiotaxis, fagocitosis, degranulación, IROs) lo cual también contribuye con la resolución de la inflamación aguda [68].

Cuando los PMN son reclutados al sitio inflamatorio, la expresión del programa apoptótico puede ser alterada por diversos agentes, algunos capaces de retardar (LPS, GC, etc) [68], otros de inducir (IROs, TNF- $\alpha$ ) la activación del programa apoptótico [69]. La desregulación en el balance de los procesos funcionales del neutrófilo puede resultar en patologías diversas (renales, hepáticas, pulmonares o sistémicas) y contribuir a la condición de inflamación crónica y al daño tisular [70].

### **2.8.2 Participación de los PMN en el SUH.**

En el SUH, la leucocitosis con predominio de PMN o neutrofilia es un parámetro frecuente y diversos autores la han descrito como factor de mal pronóstico [9] [71] [18]. También es común observar, como se dijo en el capítulo anterior, niveles elevados de interleuquina-8 (IL-8) en el plasma de pacientes, citoquina que recluta y activa preferencialmente al PMN además de ser un poderoso quimioattractante [51, 71-73]. Además, los PMN de pacientes con SUH tienen mayor capacidad para adherirse a células endoteliales de cordón umbilical humanas y de inducir daño endotelial degradando fibronectina [74].

Trabajos recientes realizados en nuestro laboratorio en el modelo murino de SUH, mostraron que la inoculación intravenosa (i.v.) con dosis letales de Stx2 pura libre de LPS, provoca neutrofilia que se prolonga hasta la muerte del animal, sin alterar otras poblaciones de leucocitos. Estos neutrófilos muestran un incremento en la expresión de CD11b, en la adhesión a vasos de pulmón y en la capacidad citotóxica [6]. El pre-tratamiento con LPS potencia la neutrofilia y la inducción temprana de CD11b, luego de la inoculación con Stx2. Además se observa una correlación positiva entre porcentaje de neutrófilos y daño renal evaluado por los niveles de urea en plasma.

## **2.9 Regulación Neuro-Endócrino-Inmune**

El Sistema Inmune, el Sistema Endócrino y el Sistema Nervioso Central operan constantemente en comunicación construyendo una red de interacciones

funcionales neuroendócrino-inmune. Los glucocorticoides (GC) son mediadores importantes en la comunicación bidireccional entre ambos sistemas.

### **2.9.1 Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HPA).**

El eje Hipotálamo-Hipófisis (Pituitaria)-Adrenal (HPA) posee como función principal mantener la homeostasis basal y la asociada al estrés. Los componentes centrales de este eje se encuentran en el Hipotálamo y el tallo del cerebro ("brain stem") [75]. El hipotálamo contiene neuronas que producen y secretan hormona liberadora de corticotropina (CRH), específicamente en el núcleo paraventricular del hipotálamo. Las terminales de estas neuronas están localizadas en la eminencia media y tras un estímulo determinado (infección o estrés) secretan CRH-41. Esta hormona secretada por el hipotálamo actúa sobre la hipófisis para inducir la secreción de ACTH. Este péptido, a su vez, estimula la secreción de glucocorticoides (GC) por la corteza adrenal [76]. Por otra parte, la actividad del eje HPA es regulada por retroalimentación negativa ejercida por los GC sobre el hipotálamo [77].

### **2.9.2 Función de los GC sobre el sistema inmune.**

La activación del sistema inmune durante ciertos estadios de enfermedades infecciosas, o luego de la administración de endotoxina bacteriana (LPS) en animales, es acompañada por un incremento marcado y duradero de los niveles circulantes de GCs [78, 79]. Esta notable activación del eje HPA por el sistema inmune, se debe principalmente a la secreción de CRH que a su vez es inducida por el nivel de citoquinas proinflamatorias (IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6) liberadas por la estimulación de las células inmunes. Los GCs, producto final de dicha activación, ejercen profundos efectos moduladores sobre los procesos inmunes, metabólicos, endócrinos y de comportamiento, que acompañan al proceso infeccioso que les dio origen. Dicha modulación incluye efectos permisivos sobre la respuesta de fase aguda [80] y la fiebre [81], (b) efectos supresores sobre (i) la respuesta inmune celular y humoral, (ii) la secreción de mediadores inflamatorios y (iii) los efectos fisiológicos de las citoquinas [82, 83]. Estos efectos supresores de los GCs previenen de los efectos deletéreos del sistema inmune sobreactivado durante la infección [84].

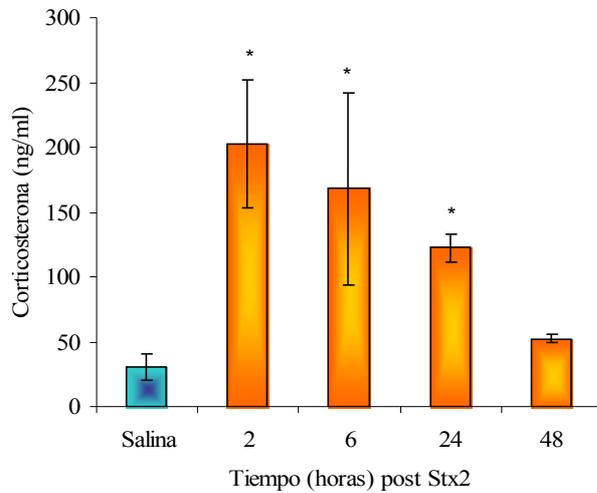
Muchos de los mecanismos que inician y amplifican la respuesta inmune ante la inflamación aguda son susceptibles a la inhibición por GCs [85]. Actualmente se encuentra plenamente aceptado el hecho de que los GC liberados bajo situaciones fisiológicas contribuyen al control endógeno de la inflamación [86]. Los mecanismos supresores son diversos e incluyen la regulación negativa de la expresión génica de citoquinas (IL-1, IL-2, IL-4, TNF, Factor Estimulador de Colonias e interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ) [87] [88]), el bloqueo de la actividad de la fosfolipasa A2, y la inhibición del tráfico de PMN [89].

Los GC son capaces de modular la maduración, la distribución y la función de las células fagocíticas, y en particular ejercen su efecto sobre los neutrófilos polimorfonucleares. Por ejemplo, los GC inhiben la acumulación de PMN en el tejido inflamado [90], suprimen la fagocitosis, la quimiotaxis, la degranulación, la adherencia, la generación de IROs y la citotoxicidad mediada por anticuerpos [91]. La función de los PMN es alterada por los GC además en forma indirecta, a través de la inhibición de factores que regulan su función, por ejemplo sobre la liberación de quimioattractantes y de activadores endoteliales [92].

En un trabajo previo, nosotros demostramos que la toxina Stx2 inoculada de forma intravenosa en ratones es capaz de estimular al eje HPA induciendo la secreción de GC (Figura 2.6). El aumento fue significativo desde las dos horas luego de la inyección con la toxina y fue disminuyendo progresivamente [8]. También demostramos que la depleción de GC endógenos por adrenalectomía o a través del bloqueo de su receptor específico utilizando un antagonista sintético de los GC (Ru486), aumenta el daño renal y en consecuencia la mortalidad (Figura 2.7) inducido por la acción tóxica de Stx2 [8]. Estos resultados demuestran la capacidad de los corticoides endógenos de atenuar parcialmente la toxicidad de la toxina shiga.

Si bien se conocen las propiedades antiinflamatorias de los glucocorticoides sobre las células inmunes, los mecanismos involucrados en la protección parcial otorgada contra la acción deletérea de la toxina shiga no han sido investigados.

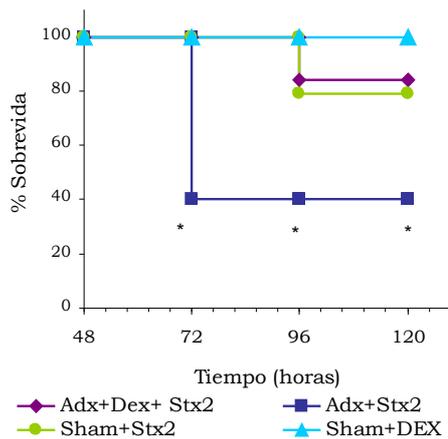
**Figura 2.7 Corticosterona Plasmática.**



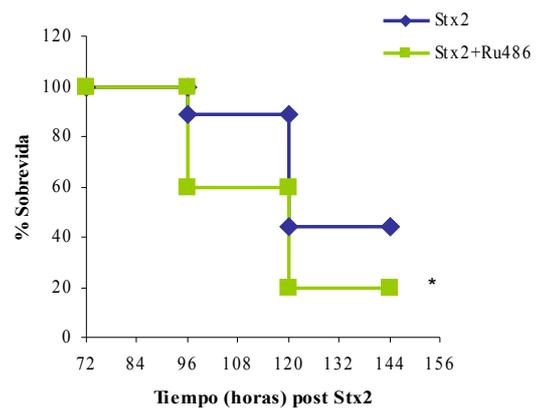
**Figura 2.6. Concentración de corticosterona en plasma de ratones tratados con Stx2.** Las determinaciones de corticosterona fueron realizadas a distintos tiempos posteriores a la inoculación con toxina Shiga iv (250pg/ratón), según se indica en la figura. Los valores están expresados como la media  $\pm$  ES de 6 ratones por tiempo., #  $p < 0.0001$ , \*  $p < 0.05$  vs el control con salina por el *test t* de Student.

**Figura 2.7 Efectos de los GC endógenos sobre la sobrevivencia.**

(a) Adrenalectomizados



(b) Tratamiento con Ru486



**Figura 2.7 Papel de los GC en la protección contra la toxina Stx2.** (a) ratones adrenalectomizados (ADX) y sham operados (Sham) fueron inoculados con Stx2 iv (250pg/mice) 5 días después de la cirugía. DEX (300  $\mu$ g/ml) fue administrada en el agua de bebida desde 6 horas antes de la inoculación con Stx2 hasta el final del experimento. \* $p < 0.05$  vs todos los controles (b) RU486 (600  $\mu$ g/mice, i.p.) fue administrado diariamente desde 12 horas antes de la inoculación con Stx2 (n=24/grupo) \* $p < 0.05$ , vs Stx2. Todas las comparaciones fueron realizadas utilizando el test exacto de Fisher.

### **2.9.3 Receptores para Glucocorticoides (R-GC)**

La acción de los GC depende de dos factores muy importantes: la disponibilidad relativa de la hormona, la cual está determinada por el nivel de GC en la circulación y el acceso del mismo a células y tejidos relevantes [93] y por el número y función de los receptores para los GC (R-GC) [94].

Los GC ejercen sus efectos en el tejido inmune blanco a través de dos subtipos de receptores, el receptor de mineralocorticoide (R-MC) y el receptor de glucocorticoides (R-GC), ambos pertenecen a la familia de receptores nucleares y poseen un mecanismo de acción similar. El R-MC tiene más afinidad por GC circulantes que el R-GC, pero este último se encuentra en mayores cantidades en los tejidos inmunes [95]

La forma más aceptada que tiene el GC para entrar a la célula es por difusión simple a través de la bicapa lipídica de la célula hacia el citoplasma. El receptor de GC, se localiza en el citosol de la célula blanco, asociado a "heat shock protein 90" (hsp 90). Al mismo tiempo esta conformación inactiva le confiere gran afinidad por el ligando. Cuando el GC entra a la célula se une a su receptor formando un complejo (GC+Receptor+hsp90) que luego es hiperfosforilado. En esta forma activa se transloca rápidamente al núcleo celular, y el complejo une la proteína nuclear p59. Al estar cargado positivamente la hsp90 y p59 liberan al receptor que se dimeriza y se une al DNA [96, 97]. El sitio de unión al DNA se encuentra sobre la región del promotor de genes que responden a GC y se denomina elemento respondedor de glucocorticoides (GRE) [98]. . Una vez que el homodímero del R-GC se une al GRE, se induce o se reprime la transcripción de los genes blanco, tal vez gracias a la interacción con el aparato de transcripción basal [99].

El aumento en el número y/o afinidad de R-GC podrían proveer un mecanismo por el cual las células pueden regular su sensibilidad a los GC. Estudios previos han demostrado que las citoquinas no solo activan la liberación de los GC, sino que también influyen la expresión y la función del R-GC. Por ejemplo, el tratamiento *in vivo* o *in vitro* con LPS altera la expresión y función del R-GC en varias células y tejidos, incluyendo células T [100], monocitos/macrófagos [101, 102]. células bronquiales y pulmonares [103, 104] y hepáticas [105].

La expresión de R-GC se estudió en ensayos de unión de radioligando citosólico sobre homogenatos de tejido completo, que determinaron que el timo posee la expresión más alta de R-GC en el cuerpo, y es seguido por los nódulos linfático, el bazo y los leucocitos de sangre periférica, en particular neutrófilos y células mononucleares fagocíticas [95].

#### **2.9.4 Antagonista del receptor de glucocorticoides: Mifepristone (Ru486)**

El Ru486 es un antagonista efectivo de GC y progesterona. Ru486 posee gran afinidad por el receptor de GC (R-GC) y luego de unirse al ligando, se incrementa la afinidad entre el receptor y las proteínas asociadas hsp90 y p59. Se cree que la proteína hsp 90 tapa al sitio de unión al DNA del receptor y como consecuencia queda imposibilitada la interacción con el DNA en el sitio del elemento respondedor de la hormona [106]. Otros postulan que Ru486 promueve la disociación de hsp90 y la unión al DNA, pero el complejo no puede estimular la transcripción de los genes bajo el control de los GC [107] El Ru486 tiene una vida media metabólica de alrededor de 20 horas y durante ese período no permite la unión del GC con su receptor. La dimerización del receptor y la unión al DNA ocurren, pero esto no es seguido por la transcripción, por esto se lo utiliza frecuentemente como antagonista del R-GC [108, 109].

## **2.10 Estrés Oxidativo y SUH.**

### **2.10.1 Conceptos Generales**

El metabolismo aeróbico genera ciertos niveles de estrés oxidativo fisiológico e intermediarios reactivos del oxígeno (IROs) que se producen continuamente en muchos procesos biológicos dentro y fuera de los tejidos. Actualmente, los productos del estrés oxidativo son los mayores mediadores de las enfermedades humanas como el síndrome de distrés respiratorio, enfermedad de obstrucción crónica pulmonar, asma, fibrosis intersticial del pulmón, ictericia obstructiva, sepsis [110].

En condiciones fisiológicas, existe un balance homeostático entre la formación de IROs y su remoción por compuestos endógenos antioxidantes. El estrés oxidativo ocurre cuando este balance se rompe o por la excesiva producción de IROs y/o por defensas antioxidantes insuficientes o inadecuadas.

La NADPH oxidasa es una enzima que se encuentra en el neutrófilo y posee subunidades citoplasmáticas y de membrana. Ante la activación del PMN por componentes inflamatorios del microorganismo invasor o del huésped, la enzima se activa y ensambla sus subunidades catalizando la producción del anión superóxido como agente citotóxico. El anión superóxido resultante es inmediatamente convertido en agentes oxidantes poderosos como hipohalitos, peróxido de hidrogeno, radical hidroxilo y cloraminas, que junto a las proteasas son los principales responsables de la eliminación de microorganismos mediada por el neutrófilo [111].

Aproximadamente el 50-70% de los IROs generado por la NADPH oxidasa es producido dentro de los compartimentos celulares cerrados incluyendo los fagosomas, endosomas y granulos intracelulares [111]. El resto (30-50%) son volcados al espacio extracelular antes de que se cierren y se internalicen dichas estructuras y en consecuencia exacerban el proceso inflamatorio causando daño sobre el tejido expuesto [66]. Específicamente, esta injuria puede consistir en daño o muerte celular a causa del daño oxidativo al DNA, a las proteínas, a los carbohidratos y a la membrana plasmática, esto último a causa de la peroxidación lipídica que lleva a alteraciones en la permeabilidad de la membrana y a modificaciones en la estructura y función de las proteínas que la conforman [112].

### **2.10.2 Agentes antioxidantes**

#### **(a) Agentes antioxidantes endógenos**

Las células y tejidos poseen mecanismos antioxidantes activos que previenen o revierten el daño oxidativo. En general, la acumulación del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) es prevenida por las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasas y peroxidasas. Las tres enzimas tienen como propósito minimizar la exposición de las células a los intermediarios reactivos del oxígeno. La SOD específicamente cataliza la conversión del anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) a  $H_2O_2$  más  $O_2$ . La catalasa convierte  $H_2O_2$  en agua y oxígeno libre y las peroxidasas catalizan la reducción de  $H_2O_2$  a agua. Entre los

donantes de electrones utilizados por las peroxidasa para llevar a cabo estas reacciones, se encuentran los alcoholes, los fenoles, las aminas, NADPH, y los tioles [113]. Entre los últimos, el más importante es el glutatión (GSH) dado que es el mayor antioxidante en células eucariotas que actúa como un reductor intracelular y protege a las células secuestrando especies reactivas del oxígeno y detoxificando sustancias tóxicas [114]. El GSH también se encuentra involucrado en muchas funciones celulares: es un reservorio de cisteína, mantiene el estatus de tioles de proteínas previniendo la oxidación de grupos sulfhidrilos (-SH) o reduciendo uniones disulfuro inducidas por el estrés oxidativo, es un modulador de procesos celulares como síntesis de DNA, procesos asociados a los microtúbulos, y funciones inmunes [110, 115].

Las síntesis de GSH también depende de la disponibilidad del aminoácido precursor : glutamato, glicina o cisteína [116]. El GSH es el sustrato de la enzima *GSH peroxidasa* que reduce peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) o peróxidos lipídicos (lípidoo-OOH), formando glutatión oxidado (GSSG) (figura 2.8). La acumulación de GSSG es nociva para la célula dado que puede interrumpir la función proteica, y además, como resultado del estrés oxidativo los niveles de GSH disminuyen y en consecuencia la capacidad antioxidante de la célula [115].

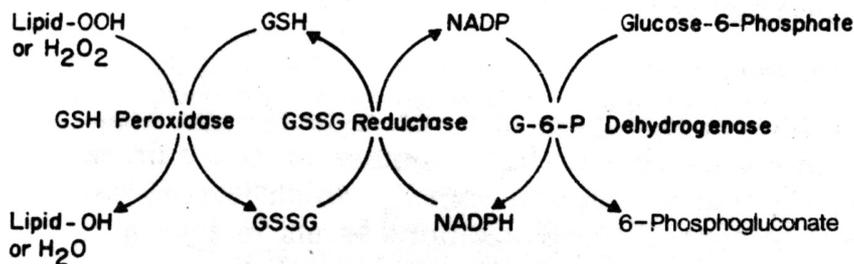


Figura 2.8.

Oxidación y reducción del glutatión [115].

### (b) Antioxidantes exógenos

N-Acetil-L-Cisteína (NAC) es un agente sintético derivado de la cisteína que actúa como antioxidante disminuyendo la concentración de IROs [117]. El efecto antioxidante del NAC puede ser directo por neutralización de los agentes reactivos del oxígeno o indirecto aumentando la biosíntesis de GSH.

Más aun, las funciones de NAC sobre el sistema inmune son diversas:

- (i) Inhibe la quimiotaxis y la invasión de células malignas.
- (ii) Posee efectos estimuladores *in vitro* e *in vivo* sobre el proceso de fagocitosis así como sobre otras funciones del leucocito.
- (iii) NAC *in vitro* inhibe la activación del factor de transcripción nuclear

NFkB

- (iv) Posee propiedades anti-inflamatorias inhibiendo la expresión y liberación de citoquinas proinflamatorias (IL-8) [118] la expresión de moléculas de adhesión [119], la síntesis de prostaglandinas, y puede promover la sobrevida celular estimulando la expresión de NFkB [117].

S-Ethil-L-Cisteina (ETH) es otro compuesto que posee propiedades antioxidantes dado que es un compuesto orgánico con azufre, capaz de reducir grupos tioles. ETH es un derivado del ajo, contiene cisteína, es hidrofílico y las propiedades antioxidantes son similares a las del NAC. Así como NAC, ETH es efectivo porque actúa a través de sus propiedades enzimáticas y no enzimáticas y secuestrando radicales del oxígeno directa o indirectamente [120].

### **2.10.3 Detección de estrés oxidativo**

Existen varias herramientas para monitorear los niveles de liberación de radicales libres generado por el estrés oxidativo. En primer lugar, IROS puede ser detectado por métodos colorimétricos utilizando un espectrofotómetro o por citometría de flujo. Este último utiliza un producto llamado dihidrorodamina-123, que en presencia de peróxido de hidrógeno emite fluorescencia verde. Este compuesto es permeable, por lo tanto detecta IROs dentro y fuera de la célula [86]. Por otra parte, uno de los productos generados por la peroxidación lipídica es el malondialdehído (MDA) y comúnmente se mide por la derivatización del ácido barbitúrico (TBA) para dar un compuesto rojo detectable con un espectrofotómetro (TBARS) [121].

### **2.10.4 SUH y estrés oxidativo.**

El estrés oxidativo ha sido tenido en cuenta en varios estudios con niños enfermos de SUH cursando por el período agudo (1ra y 2da semana luego del

diagnóstico) y en la recuperación (semana 12 luego del diagnóstico) [122-125]. Estos trabajos han tratado de relacionar la hemólisis característica de estos pacientes con los niveles de estrés oxidativo. Por lo tanto, estos estudios fueron realizados sobre los glóbulos rojos (GR) de pacientes.

En general, estos estudios encontraron que el paciente durante la fase aguda de SUH posee altos niveles de glutatión oxidado (GSSG), y mayor peroxidación lipídica sobre la membrana plasmática de los glóbulos rojos, con valores de malondialdehído (MDA) significativamente mayores que los controles durante el período agudo. Estos valores elevados se normalizan en los pacientes recuperados (semana 12). La actividad de la enzima catalasa y de otras enzimas con actividad antioxidantes como la súperóxido dismutasa (SOD) en GR se han encontrado elevadas en los pacientes, también con recuperación de los valores normales en la semana 12. Estos trabajos sugieren que el daño oxidativo sobre la membrana plasmática de los GR sería uno de los factores responsables de la anemia hemolítica característica de los pacientes con SUH [122-125].

Hasta el momento no existen trabajos que documenten la relevancia del estrés oxidativo ejercido por los PMN activados directamente sobre el tejido renal o indirectamente a través de la activación del endotelio.

## **2.11 Tratamientos**

Hasta el momento no existen tratamientos específicos en uso que controlen el nivel de daño renal ejercido por la toxina shiga. Los tratamientos vigentes para tratar a pacientes con SUH son básicamente de soporte, ya que consisten en mantener la homeostasis y eliminar los metabolitos tóxicos generados.

### **2.11.1 En uso.**

Las terapias que se utilizan incluyen la restricción de la ingesta de líquido, sodio, potasio y proteínas y la diálisis del paciente si fuera necesario. La diálisis peritoneal se inicia cuando los pacientes están oligoanúricos o anúricos por 72 horas o el paciente tiene manifestaciones neurológicas o

hipertensión arterial severa. La anemia se trata con transfusiones de glóbulos rojos sedimentados [126].

El uso de antibióticos no es recomendado para combatir a infección bacteriana porque aumentan el riesgo de contraer SUH. Algunos antibióticos pueden inducir la expresión de bacteriófagos que poseen el gen *stx* aumentando la producción de toxina, o también la lisis de la bacteria en el intestino podría provocar la liberación masiva de Stx y/o LPS [127] [128]. De la misma forma los agentes anti-espasmódicos impiden la liberación de la bacteria por las heces aumentando el tiempo de exposición a la toxina por lo que resultan perjudiciales para el paciente.[129, 130]. También no se recomienda el uso de agentes anti-inflamatorios no esteroides porque pueden disminuir el flujo sanguíneo del riñón [131]. También se desaconseja el uso de agentes antitrombóticos en chicos con SUH porque la hipertensión, la asotemia y la trombocitopenia pueden aumentar el riesgo de hemorragia intracraneal [14].

### **2.11.2 En estudio.**

El Synsorb Pk (SYNSORB Biotech, Inc., Calgary, Alberta, Canada) o cromosorb, son sustancias cubiertas con oligosacáridos que fueron diseñadas para captar a la toxina en el lumen intestinal, y así limitar la cantidad y el tiempo de exposición de la misma al epitelio [132, 133]. Esta sustancia se encuentra todavía en estudio dado que ha sido probada en modelos animales pero no ha tenido buen resultado en pacientes [134, 135]. Un estudio realizado por Takeda et al, encontró que la coincubación de esta sustancia con la Stx1 o Stx2 protege a un 50% de células de adenocarcinoma renal humano del efecto citotóxico. Además se encontró que Stx1 tiene más afinidad que Stx2 por Synsorb Pk, pero Stx1 no posee relevancia epidemiológica [136]. Por otra parte, al ser administrada en forma oral, esta sustancia estaría bloqueando a la toxina producida en la luz intestinal pero no podría neutralizar a la toxina que pasa a la circulación sistémica a través de las células epiteliales del intestino.

Existen muchos protocolos de tratamientos, después de los realizados con el synsorb pk, que se encuentran en estudio. A través de la ingeniería genética, se desarrollaron bacterias *E coli* no patogénicas que expresaban la sección terminal del trisacárido de Gb<sub>3</sub> (Gal $\alpha$ (1-4)-Gal $\beta$ (1-4)-Glc $\beta$ 1- y fueron probadas como agentes "probioticos" contra la infección por STEC. Esta

bacteria probó ser muy eficiente para neutralizar Stx1, Stx2, Stx2c, Stx2d y el tratamiento via oral protegió 100% a ratones infectados con una cepa de STEC muy virulenta para ese modelo particular de ratón [137]. También se han probado compuestos solubles administrados en forma parenteral, como los polímeros ramificados conocidos como "SUPER TWIGS" (del inglés), donde varios Gb3 se ubican con distintas orientaciones. Esto fue probado en un modelo murino por infección con bacterias STEC y este compuesto fue administrado en forma intravenosa logrando un índice de sobrevivencia significativo [138]. Otro compuesto desarrollado por Wantanabe y grupo es otro análogo del Gb<sub>3</sub> sintético que se administra en forma oral, que posee una configuración diferente a la del SUPER TWIG, y se conoce como "polímero Gb<sub>3</sub>". Este polímero tiene afinidad por Stx1 y Stx2 la cual es mayor que los compuestos mencionados anteriormente y protegen a ratones infectados con dosis letales de *E. coli* O157:H7, aun cuando los polímeros fueron administrados después de establecida la infección, por lo tanto demostrando que este compuesto tiene la capacidad para atrapar Stx en el intestino y prevenir su entrada a la circulación [139].

### **2.11.3 Desarrollo de vacunas**

Estudios de inmunización en cerdos y conejos con el toxoide Stx2e protegió a los animales desafiados con *E. coli* productora de la misma variante de la toxina [140, 141].

También se ha visto que Stx acoplada a liposomas da una respuesta específica de anticuerpos neutralizantes anti-Stx en ratones y monos, confiriendo protección ante el desafío con la bacteria productora de toxina [142, 143].

En nuestro laboratorio se ha desarrollado un plásmido eucariota codificante para el gen modificado de Stx2, que fue capaz de generar una respuesta de anticuerpos neutralizantes para la Stx2 *in vitro* [144].

## **2.12 Modelos experimentales de SUH.**

Todos los modelos animales utilizados hasta el momento presentan algún tipo de limitación. Muchos de ellos se asemejan a la enfermedad en el

humano solo en algunos aspectos, entonces son útiles para estudiar aquellas características comunes de la patofisiología del SUH.

En conejo, la administración intravenosa (i.v.) de Stx1 tiene propiedades enterotóxicas directas y selectivas, que son causadas por la acción directa de la Stx sobre su célula blanco: células epiteliales del intestino, que poseen Gb<sub>3</sub>. Esta susceptibilidad está asociada a la edad del conejo dado que hay más biosíntesis de Gb<sub>3</sub> en la tercera semana de vida. [145] [146]. La Stx (i.v.) en estos animales causa daño vascular (microangiopatía trombótica) particularmente en el cecum, colon y sistema nervioso central [147] [148]. Las células endoteliales en estos tejidos también son el blanco principal de Stx. De todas formas, el tejido renal del conejo no es afectado y no une toxina [147], lo cual es consistente con la falta de Gb<sub>3</sub> en ese tejido [148]. En este modelo junto con el de ratón se ha demostrado que la Stx produce daño en el sistema nervioso central y microangiopatía por acción directa [149, 150].

En vacas la infección con STEC puede causar diarrea con lesiones principalmente en el colon, sin otro síntoma, dado que no hay evidencias de toxemia o daño vascular sistémico [151]. En estos animales, la patogenicidad también parecería estar asociada a la edad, dado que las lesiones son menos frecuentes y menos extensivas en vacas que en terneros que tienen 12 horas de vida [151].

En cerdos jóvenes, lo más común es la enfermedad del edema, que ocurre naturalmente e involucra daño vascular sistémico como resultado de la infección intestinal causada por STEC. En estos animales estas bacterias son huéspedes naturales [152]. El evento más importante de la enfermedad de edema clínico es falla neurológica y muerte. Otras lesiones importantes son edema del párpado, mesenterio y tracto gastrointestinal [153] [154]. Microscópicamente presentan lesiones que indican necrosis de las arteriolas en el tracto intestinal y en el cerebro [155] [156]. Como en el SUH, la enfermedad de edema tiene como etapa previa a la diarrea no hemorrágica, pero ésta es causada por la enterotoxina estable al calor y solo raras veces se asocia con diarrea hemorrágica [154].

El perro Galgo desarrolla vasculopatías idiopáticas cutáneas y glomerulares luego de la infección con STEC [157].

Un estudio hecho en monos reproduce la microangiopatía trombótica glomerular que se encuentra en el SUH pero solo cuando las dosis de Stx inyectadas son bajas. De todas formas no se registran cambios en el

hematocrito, y no hay un incremento de los linfocitos en general. En las lesiones del tracto gastrointestinal se incluyen hemorragias y trombosis pero no necrosis [55].

Trabajos presentados por diversos autores, han mostrado que el ratón es un modelo válido para estudiar diversos aspectos del SUH humano, particularmente la participación de la respuesta inflamatoria y anti-inflamatoria. Se vió que el ratón infectado en forma intragástrica con *E. coli* O157:H7 desarrolla síntomas gastrointestinales, neurológicos y sistémicos, semejantes al SUH humano. Particularmente presenta un patrón de toxicidad muy parecido al humano, tanto con la presencia de focos necróticos en el colon, como el daño histopatológico en los glomérulos y los túbulos renales, además de la presencia de eritrocitos fragmentados y trombocitopenia. Esto se presenta aún en ratones C3H/ HeJ, que es una cepa que no responde al LPS, demostrando entonces que los síntomas son producto de la Stx2 *per se* [158].

En nuestro laboratorio, utilizamos el modelo murino inoculando la toxina Stx2 pura por vía i.v. Estos ratones sufren letargia, a veces parálisis de los miembros posteriores, dejan de comer y de acuerdo a la dosis inoculada, mueren entre las 96 y 168 horas luego de la inoculación. La muerte del ratón se debe principalmente a la necrosis tubular bilateral de los riñones. El daño renal presente en ratones es revelado primero a través de los valores de uremia y creatinina. En general, los valores de urea en plasma son normales (60 mg/%) hasta las 24 horas luego de la inoculación con Stx, y a las 48 horas los niveles suben significativamente (100-250 mg/%) [8]. Paralelamente los valores de creatinina pasan de 0.7 mg/dl a 3.5 mg/dl. Por otra parte, existe correlación entre dichos valores y la mortalidad de los animales. Dosis de Stx2 inductoras de 50% de muerte producen valores intermedios de ambas sustancias. Por lo tanto, los valores séricos de creatinina y urea se correlacionan directamente con el daño renal y la mortalidad [7].

Este modelo nos permite analizar independientemente las acciones específicas producidas por la Stx2 y en todo caso la modulación por los distintos componentes bacterianos o del huésped (LPS, citoquinas inflamatorias o glucocorticoides) [53, 54].

### **3.1 Anticuerpos y Reactivos**

Dexametasona (DEX), S-Etil-L-Cisteina (ETH), N-Acetil-L-Cisteina (NAC), Anticuerpo policlonal (conejo) anti IgG1 (anti ratón) marcado con FITC, Ru486 [17-hidroxi-11-(4-dimetilaminofenil) 17-(1-propinil) estra-4,9-dieno-3-uno], dihidrorrodamina-123 (DHR-123), Forbol-Acetato Miristato (PMA), Ioduro de Propidio (IP), Tripsina, Zymozan A (Zy), quimioattractante de neutrófilos formyl-Met-Leu-Phe (fMLP), isiotiocianato de fluoresceína (FITC), colágeno tipo I de cola de rata soluble en ácido (CTI), albúmina sérica bovina (BSA) y fibrinógeno de ratón (FGN) fueron obtenidos en Sigma (St. Louis, MO). Anticuerpo monoclonal anti CD11b/CD18 murino (M1/70.15 clon IgG2b de rata anti CD11b) libre de azida fue un generoso obsequio del Dr F. LePault de Unit 1461 CNRS URA. Hopital Necker, 161 Sevres 75743, Francia. El anticuerpo policlonal anti IgG1 marcado con FITC fue obtenido de Caltag Laboratories (Burlingame, CA).

### **3.2 Ratones**

Los ratones BALB/c fueron criados en el bioterio del Departamento de Leucemia Experimental de la Academia Nacional de Medicina (ILEX), Buenos Aires. Para todos los experimentos utilizamos machos de 9 semanas de edad que pesaban entre 20-25 gr. Todos los animales fueron mantenidos bajo ciclos de luz y oscuridad de 12 horas a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  de temperatura y fueron alimentados con una dieta estándar y con agua *ad libitum*. Los experimentos realizados para este trabajo fueron conducidos de acuerdo a los principios establecidos por la Guía para el Cuidado y el Uso de los Animales de Laboratorio (Instituto Nacional de Salud de EEUU, 1985).

### **3.3 Preparación de Stx2**

La Stx2 fue provista 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 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*. Los resultados de este ensayo determinaron que la preparación de toxina

utilizada para los experimentos contenía menos de 40 pg LPS/ $\mu$ g de proteína de Stx2.

### **3.4 Ensayos de toxicidad en células Vero.**

Las células Vero son útiles para el estudio de la toxicidad de la Stx debido a poseen alta sensibilidad a los efectos citotóxicos de la toxina. La actividad citotóxica de la Stx2 en células Vero se analizó como se ha sido descrito previamente [10, 159]. 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  $\mu$ 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% CO<sub>2</sub>. La dosis citotóxica 50 (CD<sub>50</sub>) 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..

### **3.5 Tratamientos *in vivo* e *in vitro***

#### **(a) Stx2**

El poder letal de la Stx2 fue evaluado inoculando a los ratones de forma intravenosa (iv) por el plexo retroorbital, como se describe en un manuscrito previo [6] con diluciones seriadas en solución salina libre de pirógenos con 0.2% SFB. Esta dosis corresponde a 50 ng/kg (aprox.1 ng/ratón) y fue la utilizada para todos los ensayos de sobrevivencia donde indujo  $\approx$  50% de mortalidad entre las 72 y 96 horas luego de la inoculación, y 2 ng/ratón para obtener aproximadamente 100% de muerte para los ensayos donde se determinó protección por otros factores o agente detallados en esta tesis.

#### **(b) Ru486 (Mifepristone)**

Para evaluar el papel de los GC endógenos sobre las funciones inflamatorias de los PMN generadas por la Stx2, utilizamos el antagonista específico de GC y progesterona Ru486 (Mifepristone), el cual bloquea a los receptores de GC (R-GC) y de progesterona. La vida media metabólica del Ru486 es aproximadamente de 24 h [160], por lo tanto, inoculando Ru486 intraperitonealmente (ip) todos los días se bloquea totalmente el efecto de los

GC endógenos [86]. El Ru486 se utiliza para determinar la especificidad de las funciones mediadas por el R-GC en diversos modelos de inflamación [61]. Los ratones fueron tratados con una única dosis iv de Stx2 y con 600 µg/ratón/día de Ru486 hasta el fin del experimento [108]. La primera dosis de Ru486 fue siempre suministrada en simultáneo con la dosis única de Stx2.

### (c) Dexametasona (DEX)

El efecto de los glucocorticoides exógenos fue determinado utilizando dexametasona. Para los ensayos de sobrevida, la dexametasona fue administrada intraperitonealmente en un única dosis simultánea o no a la de Stx2, de 50 µg/ratón (0.5 mg/ml). Para determinar el efecto directo de DEX sobre la función del neutrófilo, una vez aislados ( $2 \times 10^5$  células/tubo) fueron incubados con o sin DEX (100 o 1000nM, según se indique en cada figura) por 30 minutos en las condiciones necesarias para cada ensayo.

### (d) N-Acetil-L-Cisteína (NAC) y S-Etil-L-Cisteína (ETH).

En primer lugar los tratamientos con antioxidantes se realizaron con dos protocolos de tiempo de administración diseñados para actuar en el período del desarrollo del SUH que va desde la entrada de la bacteria a la declaración de la enfermedad. Determinamos que para el modelo murino correspondería el tratamiento 48 horas antes de la inoculación de la toxina (t-48) y en simultáneo (t0). Para **t-48h** los ratones fueron tratados con 1 mg/ml de NAC y ETH en el agua de bebida (1mg/ml o 100mg/kg/día) en agua potable teniendo en cuenta que los ratones beben aproximadamente 1 ml de líquido por día. Para el protocolo **t0h** los ratones fueron tratados con 3.5 mg/ratón ip en solución salina (175 mg/kg/día). En ambos protocolos de administración del tratamiento se prolongó hasta el final del experimento (entre las 72 y 168 horas) para todos los ensayos realizados. Luego incorporamos dos tiempos más, con el fin de analizar el papel de estos compuestos en el modelo murino de SUH. Para esto ensayamos los compuestos a **t-168h** (1 mg/ml por el agua de bebida) y **t0** (3.5 mg/ratón/día).

## 3.6 Estudio de Flujo Renal

**Centellograma con [<sup>99m</sup>Tc]-Glucoheptanato.** Se utilizó una cámara gama Elscint Dycon 80, equipada con un colimador pinhole. Los ratones fueron

anestesiados i.p. con pentobarbital sódico y ubicados en posición ventral, extendidos e inmovilizados para incluir el cuerpo entero en la imagen. Se adquirieron imágenes de 1.5 minutos inmediatamente después de la inoculación i.v de 55.5 MBq de [99mTc]-glucoheptanato (Bacon, Argentina) preparado de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El flujo renal se registró a través de las imágenes obtenidas desde la computadora de la cámara gáma que fueron fotografiadas con una cámara digital.

### **3.7 Determinaciones de TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$**

La sangre fue obtenida por punción del plexo retroorbital. El suero obtenido fue guardado a 20°C hasta el momento de la determinación. *TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$*  fueron cuantificadas por un ensayo de ELISA sandwich (enzyme linked immunosorbent assay) con un equipo de Endogene, MA. También se determinó la actividad biológica de TNF- $\alpha$  por un ensayo citotóxico sobre células L929 en presencia de actinomicina D para inhibir el crecimiento de las células [161].

### **3.8 Determinación bioquímica de urea en plasma.**

La determinación bioquímica de la uremia de ratones fue realizada utilizando los reactivos para la determinación de uremia de Weiner lab (Buenos Aires), y la lectura de la concentración fue realizada en un autoanalizador CCX Spectrum (ABBOTT DIAGNOSTICS SYSTEM, Buenos Aires, Argentina) siguiendo las instrucciones estandarizadas del equipo. Las concentraciones de urea se muestran en mg/%.

### **3.9 Determinación del Glutati3n total (GSH)**

#### **(a) Preparaci3n de las muestras.**

Los 3rganos en estudio se homogeneizaron en HClO<sub>4</sub> 0,5 N en una proporci3n de 1 gramo de 3rgano en 50 ml de 3cido. Se centrifugaron a 5000 g durante 10 minutos, y los sobrenadantes se neutralizaron con Na<sub>3</sub> PO<sub>4</sub> 0,44 M (1 mL de sobrenadante y 0,5 ml de Na<sub>3</sub> PO<sub>4</sub>).

### **(b) Procedimiento para la determinación del Glutación total**

El sobrenadante obtenido, como se explicó en la sección anterior, se agregó a una mezcla de reacción formada por 1 mL de buffer fosfato 0,1 M pH:7 y EDTA 1 mM; ácido 5-5' di-tio-bis-nitrobenzoico (RSSR) 0,1 mM (en solución amortiguadora fosfato de sodio y potasio, pH 7); NADPH 4 mg/mL en NaCO<sub>3</sub> 0,5 % P/V y glutatión reductasa 6 U/mL. Se utilizó glutatión oxidado 10 M como patrón. Se midió la absorbancia a 412 nm a temperatura ambiente. La concentración de GSH se calculó considerando un  $\epsilon_{412 \text{ nm}} = 13,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y se expresó en  $\mu\text{moles/g}$  de órgano en estudio.

### **3.10 Determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

Las reacciones en cadena que ocurren durante la oxidación de los lípidos conducen a la formación de hidroperóxidos, los cuales se descomponen en muchos productos secundarios como aldehídos, cetonas, etc. Dentro de los aldehídos generados se puede formar el malondialdehído (MDA). Este compuesto se puede evaluar por medio de una técnica colorimétrica donde el ácido tiobarbitúrico se une al MDA formando un compuesto que absorbe a 532 nm. Medio de Reacción: homogeneizado de riñón (1 gr/ 9 mL de buffer fosfato 30 mM, KCl 120 mM, pH= 7,4), butilhidroxitolueno (BHT) 4 % P/V en etanol, ácido tricloroacético 20 % P/V, y ácido tiobarbitúrico 0,7 % P/V. La mezcla se calentó durante 1 hora a 100 °C y luego se leyó la absorbancia a 532 nm. ( $\epsilon = 1,56 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Los resultados se expresan en nmol de MDA/mg proteína.

### **3.11 Estudios Histológicos**

Los estudios histológicos de ambos riñones fueron obtenidos 72 h luego de cada tratamiento. Los riñones fueron disectados longitudinalmente, fijados en formalina 10% neutral y embebidos en parafina. Luego, el tejido fue teñido con hematoxilina y eosina (H&E) y examinado por microscopía electrónica. Se examinó la apariencia histológica glomerular y tubular, además de daño

endotelial y epitelial en un número promedio de tres secciones de cada riñón de cada ratón

### **3.12 Recuento y Fórmula.**

El recuento total de leucocitos fue determinado con una cámara Neubauer con un microscopio óptico, luego de diluir las células en una solución al 2% de ácido acético. Las muestras de sangre fueron obtenidas con capilares heparinizados por punción del plexo retro-orbital en los tiempos correspondientes luego del tratamiento. El conteo y porcentaje total de PMN circulantes fue determinado luego del conteo diferencial sobre extendidos teñidos con May-Grunwald Giemsa.

### **3.13 Purificación de Neutrófilos Polimorfonucleares (PMN).**

Los PMN fueron aislados desde una mezcla de sangre heparinizada proveniente de 2-3 ratones de acuerdo con el experimento. Los PMN se aislaron por centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque (densidad utilizada para aislar PMN 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 [162]. Los eritrocitos contaminantes fueron removidos mediante una lisis hipotónica. Luego de un lavado, las células (>96% de PMN en preparados teñidos con May-Grunwald/Giemsa) se resuspendieron en medio RPMI 1640 suplementado con 2% de SFB.

### **3.14 Estudios de función del neutrófilo**

#### **3.14.1 Adhesión de Neutrófilos**

Los ensayos de adhesión fueron realizados por triplicado en placas de cultivo de 96 pozos (Costar, Cambridge, MA) pre-recubiertos toda la noche a 37°C con las proteínas de matriz extracelular (MEC), Albúmina de suero bovino (BSA) (30 µg/ml), fibrinógeno (FGN) (200 µg/ml) o colágeno tipo-I (CTI) (30 µg/ml) como fue descrito previamente [163]. 100µl de la suspensión de PMN ( $2 \times 10^5$  cél/pozo) en RPMI con 0,5 % BSA fue cargado en los pozos y dejado en reposo para que decanten 60 min, y luego incubados a 37°C sin (basal) o con PMA (20ng/ml) (estímulo). Las células no adherentes fueron removidas cuidadosamente de las placas y las adherentes fueron lavadas y fijadas con 1.1% (v/v) glutaraldehído por 15 min. Luego de lavar bien 3 veces con agua destilada, las células fueron coloreadas con 0.1ml cristal violeta (0.1% en 20% metanol). La adhesión de los PMN fue evaluada por absorbancia a 550 nm en un lector para microplaca.

### **3.14.2 Ensayo de Quimiotaxis.**

La quimiotaxis de neutrófilos fue cuantificada utilizando la modificación de la técnica con la cámara de Boyden [62]. Una suspensión celular de 50 µl con  $2 \times 10^6$  células/ml en RPMI con 0.5% BSA, fue colocada en el hoyo superior de la cámara para microquimiotaxis de 48-hoyos. Una membrana libre de PVP de policarbonato (tamaño del poro 3µm; Neuro Probe Inc. Gaithersburg MD, USA) separó a las células de los hoyos inferiores que contenían RPMI 0.5% BSA o fMLP ( $10^{-8}$  M). La cámara fue incubada por 90 min a 37°C en 5% CO<sub>2</sub> con atmósfera húmeda. Luego de la incubación, el filtro fue teñido con TINCION-15 (Biopur SRL, Rosario, Argentina) y el número de PMN sobre la superficie inferior del filtro fue contado en cinco campos bajo el objetivo de inmersión (HPF x400) para cada uno de los tratamientos por triplicado en cada filtro.

### **3.14.3 Expresión de CD11b**

Se utilizó sangre periférica, se lisaron los glóbulos rojos y luego de lavar las células fueron incubadas primero con o sin DEX por 30 minutos y luego con un anticuerpo monoclonal anti CD11b murino 30 min a 4°C y posteriormente con un anticuerpo policlonal anti IgG1 marcado con FITC por 30 min a 4°C. Los controles de isotipo se ensayaron en paralelo.

#### **3.14.4 Intermediarios Reactivos del Oxígeno (IROs)**

Para determinar la producción del estallido respiratorio por citometría de flujo utilizamos DHR-123, un derivado de la rodamina 123, que utilizamos siguiendo el protocolo descrito por Leech et al. [86]. Brevemente, se toman  $2 \times 10^5$  PMN aislados por Ficoll-Hypaque y se los incuban por 30 min con o sin DEX, luego por 15 min con DHR-123 y por último por 15 min más con PMA. Todas las incubaciones se realizan a 37°C en estufa gaseada y sin lavar entre cada una. Por último las células son lavadas con medio (RPMI) y se mide la fluorescencia verde en el citómetro de flujo.

#### **3.14.5 Fagocitosis inespecífica de Zymozán-FITC (Zy-FITC).**

Partículas de zimozán (2mg/ml) fueron conjugadas con FITC (2mg/ml) en un buffer carbonato-bicarbonato pH 9.5 1M (Zy-FITC) por 4 horas a temperatura ambiente. Los PMN ( $2 \times 10^5$  cell) aislados fueron lavados e incubados con una suspensión de 100µl Zy-FITC (0.1 mg/ml) 30 minutos a 37°C con CO<sub>2</sub>. Finalmente las células fueron tratadas con tripsina 1% en PBS 5 minutos a 37° C para remover a las partículas de Zy-FITC pegadas sobre la membrana externa de los neutrófilos. Luego fueron lavadas y fijadas en paraformaldehído 0.5%. La intensidad media de fluorescencia (IMF) de las células fagocíticas fue determinada en el citómetro de flujo.

#### **3.14.6 Cuantificación de la Apoptosis Espontánea de Neutrófilos**

El porcentaje de PMN que mostraron un pico hipodiploide de DNA (células apoptóticas) fue determinado utilizando la modificación del protocolo de Nicoletti [164]. Los PMN puros, fueron pretratados por 18 horas con RPMI o DEX ( $10^{-6}$ M) a 37°C 5% CO<sub>2</sub> en una atmósfera húmeda. Luego, las células fueron resuspendidas en RPMI 50% (SFB) frío y luego en una solución 1.5 ml de etanol 70% helado que fue agregado gota a gota. Posteriormente las células fijadas fueron incubadas por 48 horas a 4°C. En el día de la determinación, la suspensión de células fue lavada y resuspendida en ioduro de propidio (IP) (50 µg/ml) durante 30' a T° ambiente. Más tarde se evaluó el porcentaje de células apoptóticas por citometría de flujo midiendo simultáneamente el "side scatter"

(dispersión lateral) y el “forward scatter” (dispersión delantera) y por microscopía óptica con bromuro de etidio y naranja de acridina. El residuo celular fue excluido del análisis aumentando el umbral de la dispersión delantera.

### **3.15 Estudios de depleción de neutrófilos**

#### **(a) Obtención de anticuerpos policlonales anti-PMN (anti-PMN) de ratón en conejo.**

Los PMNs se aislaron luego de sangrar a los ratones normales a blanco como se indicó anteriormente. Se mezcló la sangre de 3-4 ratones en un mismo tubo para obtener entre  $1.5-2 \times 10^6$  neutrófilos por dosis. Se realizó un esquema de inmunización en conejos adultos que consistió en 4 dosis endovenosas de la suspensión de PMN en solución salina cada una a los días 1, 10, 20 y 30. Al día 40, los conejos fueron sangrados a tubos de vidrio por corte en la vena marginal de la oreja y el suero fue separado y guardado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **(b) Tratamiento con los anticuerpos anti-PMN.**

En experimentos preliminares se determinó que 100  $\mu\text{l}$  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.

### **3.16 Estadística**

Todos los datos corresponden a la media $\pm$ ES de muestras de ratones agrupadas o individuales según se indique en cada figura. Para los ensayos de sobrevivencia las diferencias entre grupos fueron halladas utilizando el test exacto de Fisher o Chi Cuadrado según se indique en cada figura. El test  $t$  de Student fue utilizado según se indica en cada figura. Las comparaciones intergrupo de variables dimensionales fueron realizadas usando ANOVA (test de comparaciones múltiples) seguido por el Test  $t$  de Bonferroni. Para todos los ensayos  $p < 0.05$  fue considerado significativo.



#### 4.1.1.- Efecto de los glucocorticoides endógenos y exógenos a distintos intervalos de tiempo sobre la toxicidad de Stx2.

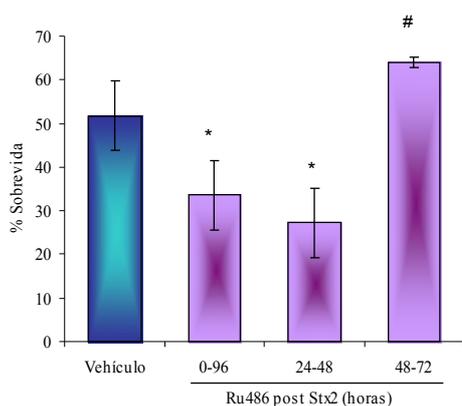
##### (a) Efecto de los Glucocorticoides endógenos

El desarrollo completo del SUH se lleva a cabo una vez que la toxina shiga tiene acceso a la sangre. En el humano, este proceso lleva entre 3 y 7 días aproximadamente desde la aparición de la diarrea hemolítica. En el modelo murino los síntomas observables a simple vista aparecen alrededor de las 72 luego de la inoculación iv de la toxina pura (1 ng/ratón), donde comienzan a verse letárgicos, a veces con parálisis de los miembros posteriores, dejan de comer y finalmente mueren entre las 96 y 144 horas. Pero la gran mayoría de los eventos que van a derivar en el desarrollo completo del SUH seguramente comienzan inmediatamente luego de la inoculación de la toxina. Como se mencionó en la introducción, la concentración de GC endógenos sube significativamente 2 horas después del tratamiento con Stx2. Para poder determinar en qué momento del desarrollo de la patología los GC endógenos deben estar presentes para ejercer protección, se utilizaron distintos protocolos de tratamiento con Ru486. El Ru486 es una sustancia que bloquea el efecto de los GC endógenos y fue inoculado en forma intraperitoneal (ip) diariamente, y la sobrevida fue evaluada desde las 48 horas hasta el fin del experimento (144-168h) siguiendo los protocolos que se detallan a continuación: (1) todos los días desde la inoculación de Stx2 hasta el fin del experimento (0-96h), (2) solo las primeras 48h (0-48h), o (3) a partir de 48 h después de la Stx2 (48h-96h). Los resultados mostrados en la **Figura 1** representan el % de Sobrevida final (144-168h). Estos resultados muestran que los ratones que fueron tratados con los protocolos (1) (0-96h) o (2) (0-48h), o sea que carecen de los efectos de los GC endógenos, son más susceptibles a los efectos tóxicos de la Stx2. Por el contrario, los ratones que recibieron el protocolo (3) (48-96h) tuvieron un porcentaje mayor de sobrevivientes comparando con el control. Estos resultados sugieren que la presencia de GC endógenos tempranamente, ejerce un efecto protector significativo.

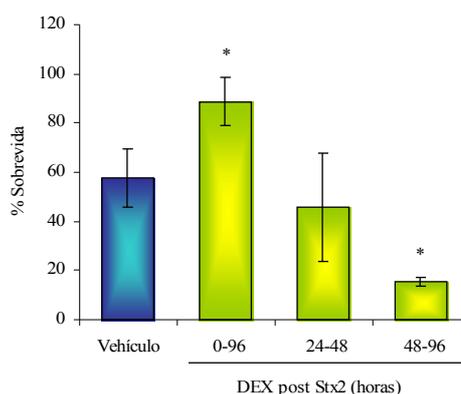
##### (b) Efecto de la dexametasona (DEX)

Teniendo en cuenta que la ausencia temprana de la acción de los GC vuelve a los ratones más susceptibles a la toxina, evaluamos los efectos del suministro exógeno de DEX siguiendo el mismo protocolo que para la **Fig. 1a**. Como se ve en la **Fig. 1b**, el tratamiento de ratones con DEX desde el momento de inoculación de la toxina hasta las 96 horas (0-96) aumenta la sobrevivencia en forma significativa con respecto al control. Por el contrario, los ratones tratados con DEX a partir de las 48 h (48-96) luego de la inoculación con Stx2 muestran una disminución en la sobrevivencia estadísticamente significativa con respecto al control. Estos resultados son complementarios a los obtenidos en la **Fig. 1a** y corroboran la relevancia de la acción de los GC endógenos a tiempos tempranos.

(a) Efecto del Ru486



(b) Efecto de la dexametasona



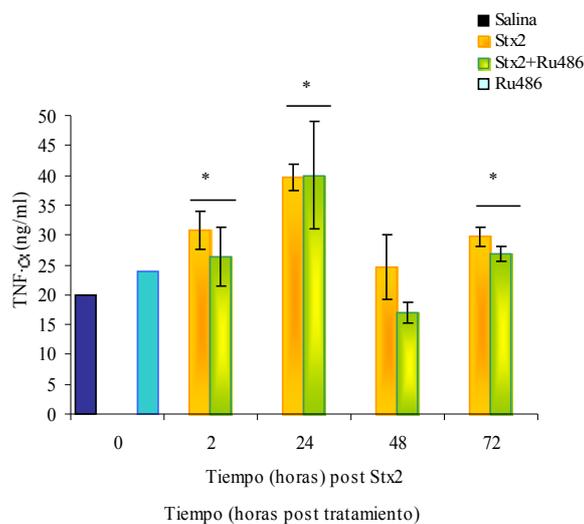
**Figura 1. (a) Efecto del tratamiento con RU486 a distintos intervalos de tiempo, sobre la modulación de la toxicidad de la Stx2 in vivo.** Los ratones fueron inoculados con Stx2 (0h) y vehículo, o con Stx2 (0h) y Ru486 (600 µg/ratón ip) a los tiempos indicados en la figura. Las barras representan el porcentaje de sobrevivientes (n=18/grupo) \*p<0.001 y #p<0.05 con respecto al control. (b) **DEX a distintos intervalos de tiempo, sobre la modulación de la toxicidad de Stx2, in vivo.** Los ratones fueron inoculados con Stx2 y vehículo (0h), o Stx2 y DEX (0.5 mg/ml i.p.) en los tiempos indicados en la figura. Las barras representan el porcentaje de sobrevivientes (n=18/grupo). \*p<0.05 respecto del control por el test de Fisher.

#### **4.1.2.- Citoquinas inflamatorias luego de la inoculación con Stx2.**

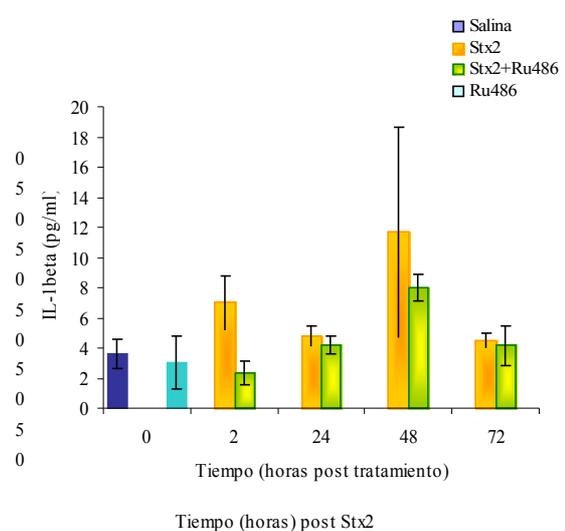
Para determinar si la incrementada susceptibilidad observada en los ratones tratados con Stx2+Ru486 se debe en parte a la superproducción de citoquinas proinflamatorias, determinamos la concentración de TNF-α e IL-1β a distintos tiempos luego de la inoculación con Stx2. Pudimos detectar que Stx2

per se aumenta la concentración de TNF- $\alpha$  en plasma y que dicho aumento es significativo a las 2, 24 y 72 horas post tratamiento (*Figura 2a*). El tratamiento con el antagonista del receptor para glucocorticoides no alteró los niveles inducidos por Stx2 sola a ningún tiempo (*Figura 2b*), determinado por ELISA y por actividad biológica sobre la línea celular L929 (no se muestra). Por otra parte, ningún tratamiento fue capaz de inducir la producción de IL-1 $\beta$  en plasma más allá del nivel basal a ninguno de los tiempos determinados medido por ELISA.

(a) TNF- $\alpha$



(b) IL-1 $\beta$



**Figura 2. Cinética de producción de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en plasma.** Los animales fueron tratados con Salina, Stx2, Stx2+Ru486 y Ru486 según se detalla en materiales y métodos. Luego fueron sangrados con capilares heparinizados a los tiempos que se indican en las figuras y la concentración de citoquinas fue determinada por ELISA para TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Endogene). **(a) TNF- $\alpha$**  donde \* $p < 0.05$  comparado con el control con salina. **(b) IL-1 $\beta$ .** Todas las comparaciones fueron realizadas con el test *t* de Student.

#### 4.1.3.- Flujo Renal in vivo

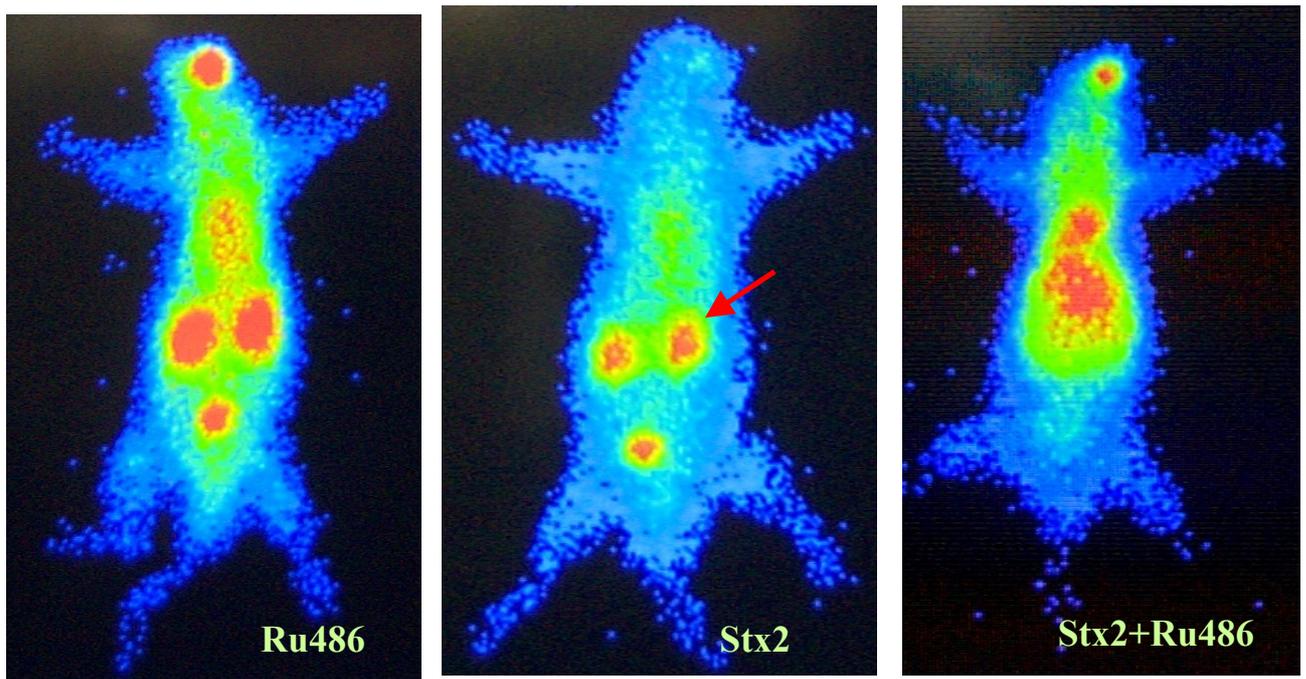
Como se explicó en la introducción, el órgano blanco por excelencia de la toxina shiga, tanto en humanos como en ratones, es el riñón. Es por eso que las alteraciones histológicas que se suelen observar son contundentes y derivan en una grave disminución de su funcionalidad, determinada en flujo renal. Particularmente, quisimos evaluar el efecto del Ru486 sobre el flujo renal de ratones tratados con Stx2 *in vivo*. Este estudio se realizó utilizando una herramienta utilizada en la clínica para evaluar la función renal *in vivo* a través de un centellograma. El agente de radiodiagnóstico utilizado fue el tecnecio radioactivo [99mTc]-glucoheptanato, que específicamente se utiliza para medir el flujo o función renal [165].

Los ratones fueron inoculados con Stx2, Stx2+Ru486, Ru486 y solución fisiológica (Salina) y 24 horas más tarde fueron dormidos con pentobarbital sódico e inoculados en forma i.v. con tecnecio-99 (Tc99)-glucoheptanato (**Figura 3**). Las imágenes fueron tomadas entre 1-2 minutos luego de la inoculación de agente radioactivo. Las imágenes tomadas de los ratones tratados con solución fisiológica (no se muestran) fueron iguales a los tratados con Ru486 (**Figura 3a**) donde se vio que los riñones aparecen en su forma completa y de color rojo intenso (médula y corteza). Por otra parte, se observa una disminución del flujo en la zona de la corteza (flecha) en el ratón tratado con Stx2 (**Figura 3b**) donde se observa que el tamaño de ambos órganos es menor, y el área de superficie en rojo también es menor. Este bloqueo es aún mayor en el ratón tratado con Stx2+Ru486 (**Figura 3c**) dado que directamente no se observa la marca del trazador en los riñones. Las fotos tomadas son representativas de cada grupo estudiado. Este estudio nos permitió observar de manera directa, *in vivo*, el efecto tóxico de la Stx2 sobre la función renal y el empeoramiento causado por la falta de GC endógenos, tan temprano como 24 horas posterior a la Stx2.

(a)

(b)

(c)



**Figura 3.-** Centellograma con [99mTc]-Glucoheptanato ([99mTc]-GHA). Los ratones fueron anestesiados i.p. con pentobarbital sódico y ubicados en posición ventral, extendidos e inmovilizados para incluir el cuerpo entero en la imagen. Se adquirieron imágenes de exactamente 1 minuto inmediatamente después de la inoculación i.v. de 55.5 MBq de [99mTc]-GHA Bacon, Argentina) preparado de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los ratones fueron tratados con (a) Ru486, los riñones aparecen rojos, y se observa la forma completa de los mismos. (b) Stx2, el [99mTc]-GHA se observa en ambos riñones pero en menor intensidad. La corteza renal aparece verde (flecha). (c) Stx2+Ru486 no se distingue el perfil de los riñones. Se muestra una foto representativa de cada grupo, n=3/grupo.

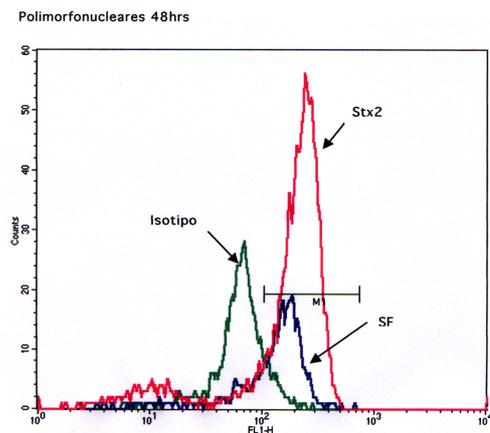
#### 4.1.4.- Expresión de receptores para GC (R-GC) en neutrófilos.

En experimentos previos evaluamos la función protectora de los GC sobre la toxicidad causada por Stx2. Se sabe que los GC son capaces de modular el desarrollo, la distribución, y la función de las células inmunes pero la acción de los GC depende no solo de la disponibilidad relativa de la hormona sino también del número de receptores y de la distribución de dichos receptores en los tejidos [166]. Teniendo en cuenta que varios estudios han informado sobre la acción de los neutrófilos en la patogénesis del SUH [6, 55], pensamos que los GC endógenos podrían estar actuando a través de sus efectos inhibitorios en esta célula. Por este motivo, primero buscamos la presencia del receptor específico en el neutrófilo (R-GC) a través del cual ejerce su efecto sobre la transcripción de genes modulables por GC sobre el DNA. Los ratones fueron inyectados con solución fisiológica (salina), Stx2, dexametasona (DEX),

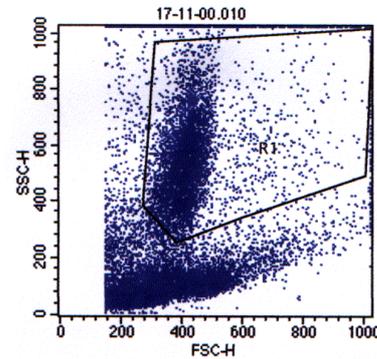
lipopolisacárido (LPS) e IL-1 $\beta$ , y la sangre fue extraída a distintos tiempos. Estos tres últimos compuesto fueron utilizados como control positivo, ya que se conoce su efecto inductor sobre la expresión de R-GC en distintos tipos celulares [167]. Como se observa en la *Figura 4c*, se detectó un incremento significativo en la expresión de R-GC en PMN desde las 24 h luego de la inoculación con Stx2 que se mantuvo hasta las 48 horas. Los tratamientos con LPS y DEX también indujeron un aumento significativo en la expresión de R-GC, sin embargo la cinética de este efecto fue diferente porque el aumento fue máximo a las 24 horas retornando a las 48 horas a valores casi normales. En la *Figura 4a* se observa un gráfico de puntos representativo para la identificación por tamaño y complejidad celular de las subpoblaciones de leucocitos PMN (G1). Para cada animal se identificaron ambas poblaciones con el análisis respectivo de intensidad de fluorescencia (MIF) de cada una. El histograma (*Figura 4b*) m

uestra un experimento representativo a 48 horas post tratamientos.

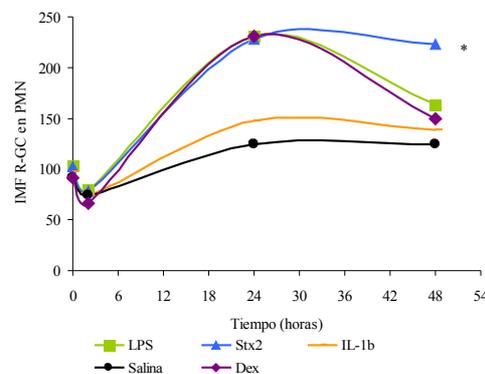
(a) Histograma Representativo



(b) Dot Plot (gráfico de puntos) representativo



(c) Cinética R-GC en PMN



**Figura 4. Expresión de R-GC en PMN.** Se utilizaron grupos de 4 ratones, que fueron sangrados antes de iniciados los tratamientos para determinar el valor basal de receptores. Los grupos fueron inoculados de forma i.v. con solución fisiológica (salina) (100µl/ratón), Stx2 (1ng/ratón), LPS (20 µg/ratón), IL-1β (100ng/ratón) y DEX ip (0.5 mg/ml) y sangrados a las 2, 8, 24 y 48 horas post tratamiento. Los PMN fueron aislados con Ficoll y resuspendidos con PBS. Las células fueron marcadas con un anticuerpo monoclonal específico anti R-GC marcado con FITC como se describe en Materiales y Métodos. (c) Se encontraron diferencias significativas a las 24 horas entre los grupos tratados con Stx2, LPS y DEX con respecto al control con salina, y a las 48 horas entre el grupo tratado con Stx2 y el control con salina (\*p<0.05). Las comparaciones fueron realizadas por el *test t* de Student.

#### **4.1.5.- Ensayo de depleción de PMN en animales tratados con Stx2 y Ru486 o DEX**

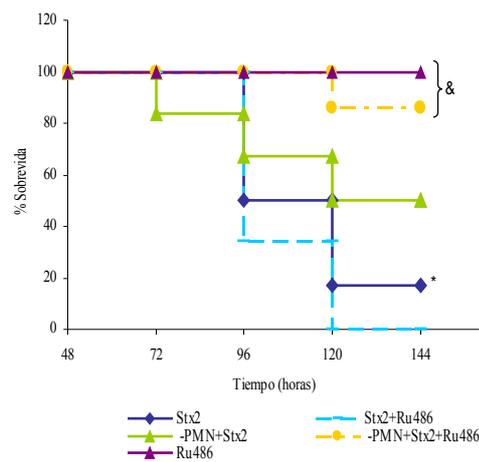
Teniendo en cuenta los datos sobre la participación del PMN en el SUH y los resultados mostrados en la figura 4, creímos necesario estudiar el grado de participación tanto de los neutrófilos como de los GC endógenos para poder comprender en mayor profundidad los mecanismos patológicos que se llevan a cabo en el desarrollo del SUH. Para lograr dicho objetivo, anulamos la acción biológica de los GC endógenos a través del tratamiento con Ru486, en animales previamente depletados de neutrófilos. De esta manera intentamos determinar la importancia de la interacción *in vivo* de ambos componentes en la patogénesis del SUH.

Para lograr la neutropenia los ratones fueron inoculados con anticuerpos policlonales, anti neutrófilos (anti-PMN) producido en conejo por inmunización i.v. con PMN purificados de ratón. El tratamiento se inició inoculando 200 µl de suero puro 4 horas antes de los tratamientos correspondientes, la segunda dosis en simultáneo con los tratamientos y luego cada 12 horas, para mantener la neutropenia. Se logró el 70% de reducción en los PMN, que se mantuvo durante todo el experimento (no se muestra). Una vez depletados de PMN, los animales fueron tratados desde el tiempo 0 con Stx2, Stx2+Ru486, Stx2+DEX Ru486 y DEX. Luego de iniciados los tratamientos correspondientes los animales fueron observados 4 veces por día para evaluar el porcentaje de sobrevida. Como se observa en la **Figura 5**, la depleción de PMN induce un aumento significativo en la sobrevida de ratones tratados con Stx2 con respecto al control. Por otra parte, esta protección también es evidente en aquellos animales tratados con Ru486 depletados de PMN (-PMN+Stx2+Ru486).

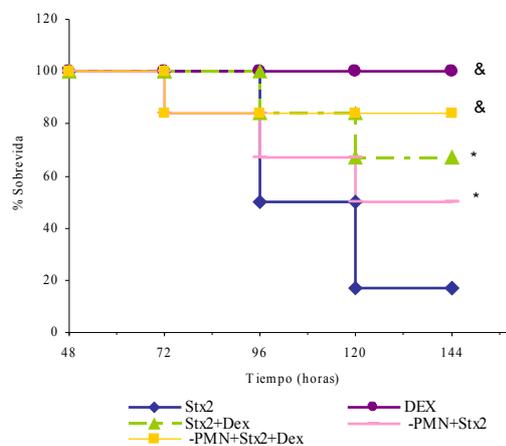
Paralelamente, el tratamiento con DEX i.v., resultó en un aumento significativo en la sobrevida con respecto al control (**Figura 5c**) con o sin la presencia de PMN (Stx2+DEX y -PMN+Stx2+DEX).

De estas observaciones se desprende en primer lugar que los efectos de la Stx2 sobre los neutrófilos son deletéreos para el animal (ya que la depleción de PMN aumenta la sobrevida). En segundo lugar que la acción protectora de los GC es mediada por los neutrófilos ya que en ausencia de los mismos la depleción de GC no tiene mayor influencia sobre el porcentaje de sobrevida. Por ultimo, la dexametasona en dosis farmacológicas, parecería estar actuando independientemente de los PMN, para ejercer protección contra los efectos letales de la toxina shiga.

**(a) Efecto de los GC endógenos sobre la depleción de PMN**



**(b) Efecto de la DEX sobre la depleción de PMN.**



**Figura 5. Depleción de PMN.** Los animales fueron inyectados con suero rico en anticuerpos anti PMN o suero normal de conejo previamente depleccionado según se describe en materiales y métodos. **(a)** Stx2, -PMN +Stx2, Stx2+Ru486, -PMN+Stx2+Ru486 y Ru486 (600µg/ratón). Se encontraron las siguientes diferencias estadísticas: \*p<0.05 vs -PMN+Stx2 y vs Stx2+Ru486 y p<0.001 vs -PMN+Stx2+Ru486; &p<0.001 vs Stx2+Ru486 **(b)** Stx2, Stx2+DEX, -PMN+Stx2, -PMN+Stx2+DEX y DEX (50µg/ratón), donde: \*p<0.05 y &p<0.001 vs Stx2. Todas las comparaciones entre curvas realizadas por el método *Chi Square*.

## RESUMEN capítulo 4.1

### 4.1.1.- Efecto de Ru486 a distintos intervalos de tiempo.

(i) El tratamiento simultáneo a la Stx2 con Ru486 generó un aumento en la mortalidad aplicado en forma temprana, aunque a tiempos tardíos disminuyó la mortalidad

(ii) El tratamiento con DEX indujo un efecto inverso: administrada en forma temprana protegió y en forma tardía indujo mayor mortalidad.

### 4.1.2.- Citoquinas inflamatorias luego de la inoculación con Stx2.

(i) La Stx2 indujo la secreción de TNF- $\alpha$  detectado en plasma entre las 2 y 24 hs posteriores a la Stx2, pero no de IL-1 $\beta$ .

(ii) La ausencia del efecto de los GC endógenos no tuvo efecto alguno sobre la secreción de CK.

### 4.1.3.- Flujo Renal *in vivo*

(i) La Stx2 induce una disminución en el flujo renal evaluado por centellograma *in vivo*.

(ii) La depleción de GC endógenos en animales tratados con Stx2 causó una disminución importante sobre el flujo renal *in vivo*, mayor a la causada por Stx2.

### 4.1.4.- Expresión de receptores para GC (R-GC) en neutrófilos.

La toxina shiga (Stx2) inoculada *in vivo* indujo la expresión de R-GC en neutrófilos de sangre periférica.

### 4.1.5.- Ensayo de depleción de PMN en animales tratados con Stx2 y Ru486 o DEX

(i) La depleción de PMN con anticuerpos policlonales disminuyó la mortalidad de ratones inoculados con Stx2 en forma significativa

(ii) La toxina shiga no aumentó la mortalidad en animales depletados de neutrófilos y de GC endógenos.

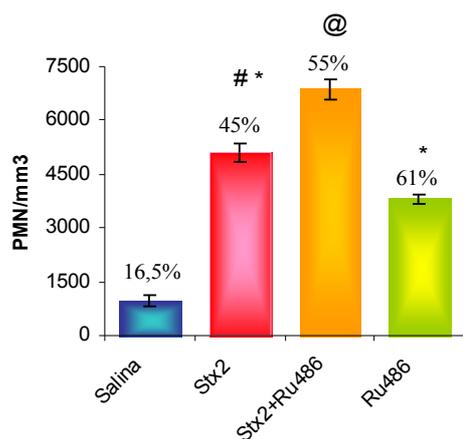
(iii) La dexametasona protegió a animales tratados con Stx2 con o sin neutrófilos.

A partir de estos resultados se puede inferir que los GC endógenos ejercen protección contra los efectos de Stx2 en forma temprana y que este efecto está probablemente mediado por su acción inhibitoria sobre la capacidad pro inflamatoria del PMN, aunque tampoco podemos descartar los efectos directos de los GC sobre la fisiología renal.

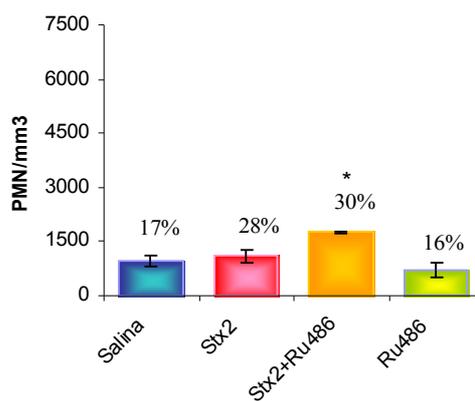
#### 4.2.1.- Recuento de neutrófilos.

El aumento en el número de leucocitos se genera como consecuencia de un proceso inflamatorio y además se sabe que los GC exógenos [90] y la Stx2 [6] inducen un incremento en el recuento total de leucocitos así como una pronunciada neutrofilia evidente 24 h luego del tratamiento. Por lo tanto, nosotros analizamos la influencia de los GC endógenos sobre la evolución en el número total de leucocitos bajo los efectos de Stx2. Todos los grupos fueron sangrados a las 2, 24, 48 y 72 h luego del tratamiento, y aunque todos los grupos experimentales mostraron un aumento transiente y significativo en el número total de leucocitos y PMN a las 2 h luego de la inoculación (**Figura 6a**), las diferencias entre grupos fue significativa recién a las 48 h (**Figura 6c**). En este punto, el número de PMN fue significativamente mayor en ratones tratados con Stx2+Ru486 que en el control. Ru486 solo también aumentó el número de leucocitos totales y de PMN, pero estos valores retornaron a los niveles basales a las 72 h (**Figura 6d**), contrario al comportamiento del grupo con Stx2 y Stx2+Ru486 cuyos valores permanecieron altos a través del tiempo (**Figura 6d**).

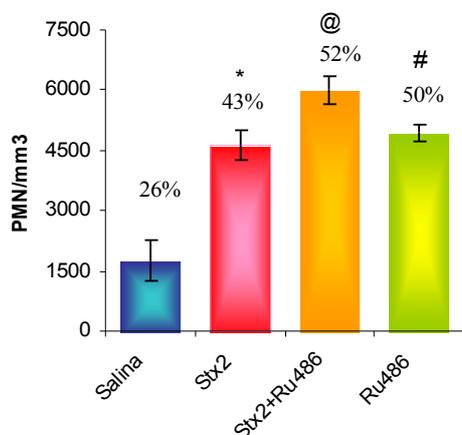
(a) 2h



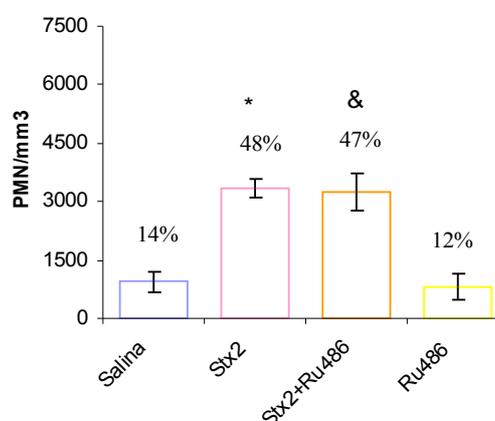
(b) 24 h



(c) 48h



d) 72



**Figura 6. Número absoluto y porcentaje de PMN de sangre periférica.** El número absoluto de PMN fue determinado bajo un microscopio óptico con una cámara de Neubauer luego de diluir la sangre en una solución de 2% de ácido acético (10µl sangre en 90 µl de ácido acético). Adicionalmente se cuantificó el porcentaje de PMNs con respecto al total de leucocitos en frotis de sangre teñidos con metanol/Giemsa 50% (se muestran por encima de cada barra). Los ratones fueron inoculados con solución salina, Stx2 y/o Ru486 y luego sangrados con capilares heparinizados para recuento y no heparinizados para el frotis a los tiempos que aparecen en cada figura (2, 24, 48 y 72). Cada barra muestra el promedio de 6 muestras para cada grupo (dos experimentos). Se encontraron diferencias significativas entre los grupos que se indican a continuación (a) 2h, \*p<0,0001 vs Salina; #p<0.001 vs Stx2+Ru486; @p<0.0001 vs Ru486 (b)24h, \*p<0.01 vs Stx2 y Ru486, (c) 48h; \*p<0.01 y #p<0.005 vs salina, @p<0.03 vs Stx2 y Ru486; (d) 72h, \*p<0.0001 vs salina, &p<0.002 vs Ru486. Todas las comparaciones según el test t- Student.

#### 4.2.2.- Adhesión de neutrófilos

Durante el proceso de interacción PMN-célula endotelial, los PMN no solo reconocen a las moléculas de adhesión ELAM-1 e ICAM-1 sobre el endotelio [168] sino que también interactúan con la membrana basal de los vasos sanguíneos y la matriz intersticial del estroma [169]. Más aún, la expresión y la deposición de proteínas de coagulación son incrementadas in el intersticio del tejido inflamado y lastimado [170]. Por lo tanto, analizamos la influencia del tratamiento *in vivo* con Stx2 sobre la capacidad adhesiva a FBG, BSA y CTI de los PMN aislados de éstos animales. Como puede verse en la Fig. 7b, el tratamiento *in vivo* con Stx2 indujo la adhesión ligando dependiente de PMN a las 24h post inyección, solo con BSA. A las 72 horas la capacidad

adherente de estas células fue incrementada con FGN y BSA solamente (Fig. 7a y b respectivamente).

La adhesión a placas cubiertas con FBG (**Fig. 7a**) fue incrementada en condiciones basales o con estímulo. La adhesión a BSA (**Fig. 7b**) fue menor pero aún así significativamente alta solo tras la estimulación con PMA. Por el contrario, la adhesión a CTI no se modificó bajo ninguna condición (basal o PMA) (**Fig. 7c**).

Luego analizamos si los GC endógenos son capaces de modificar las propiedades adhesivas de los PMN bajo los efectos de la Stx2. La adhesión basal a FGN y BSA no fue alterada por el tratamiento con Stx2+Ru486, dado que mostró el mismo nivel de adhesión basal que con Stx2 (**Fig. 7a y b, 24 y 72h**). Por otra parte, PMN aislados a las 72 horas post tratamiento *in vivo* con Stx2+Ru486 mostraron un incremento significativo en la capacidad adherente a CTI (**Fig. 7c**). Tras el estímulo con PMA, el mismo tratamiento contrarrestó los efectos de Stx2 en la adhesión a BSA (**Fig. 7b, 24h**) y FBG (**Fig. 7a, 72h**) llevándola a niveles basales. Por otra parte el PMA aumentó la adhesión a BSA y CTI de PMN aislados a las 72h (**Fig. 7b y c**). El tratamiento con Ru486 sólo indujo un aumento significativo en la adhesión a placas cubiertas con FBG en condiciones basales o con estímulo (**Fig. 7a, 72h**).

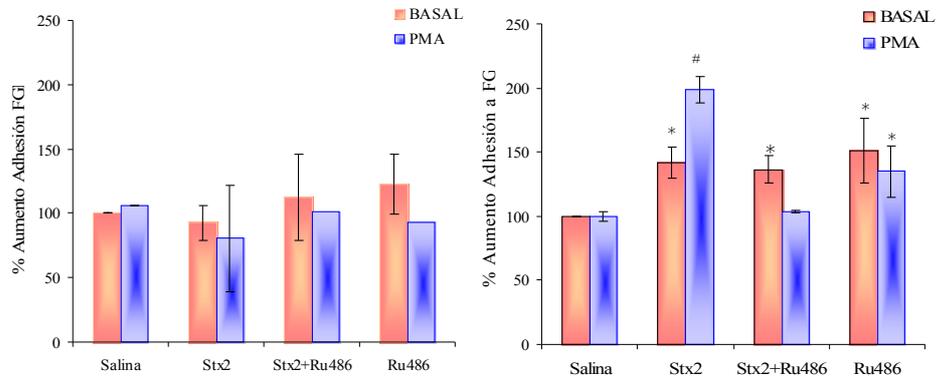
En su conjunto estos resultados reflejan la complejidad de los mecanismos de adhesión involucrados de acuerdo al sustrato, y sugieren que la Stx2 podría estar modulando diferencialmente la expresión y/o función de las familias de integrinas. Además, los GC endógenos podrían estar inhibiendo la adhesión de PMN inducida por Stx2 y a pesar de la variabilidad observada, la Stx2 y el Ru486 aumentaron la capacidad adhesiva de los PMN.

## Adhesión de neutrófilos.

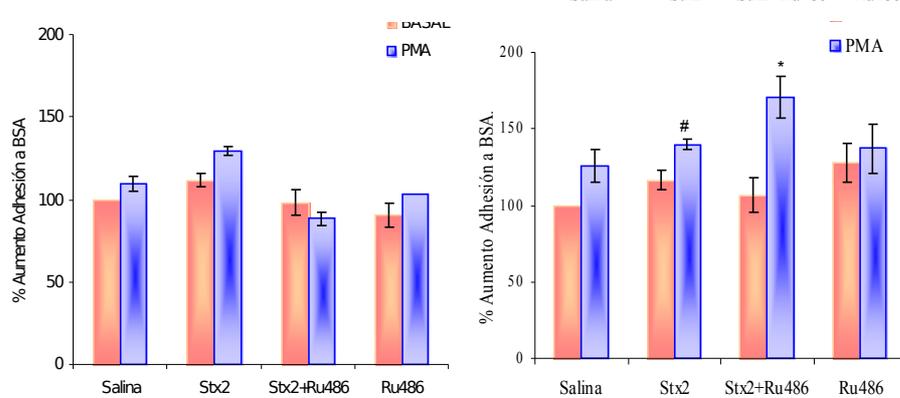
24 h

72 h

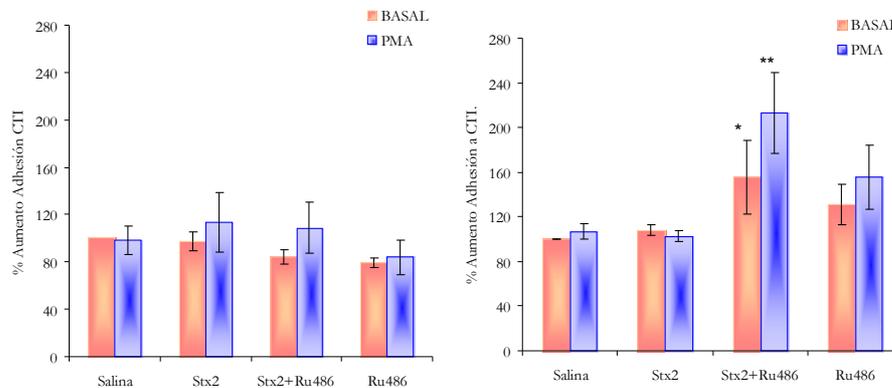
(a)BSA



(b)FGN



(c) CTI

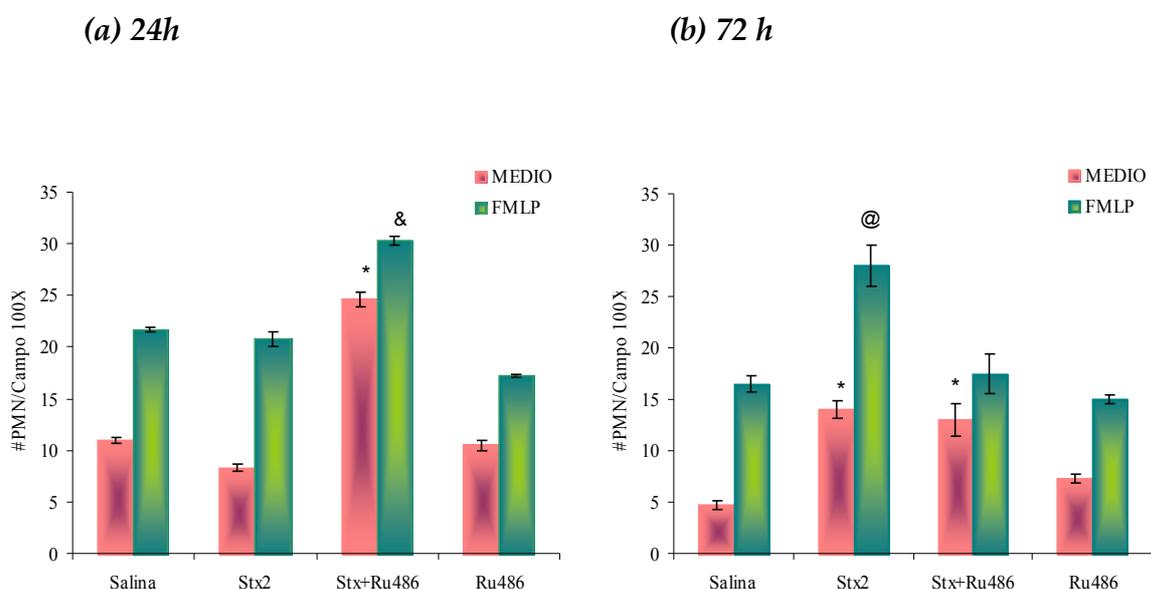


**Figura 7. Efecto de la toxina shiga y el Ru486 sobre la adhesión de PMN 24 y 72 horas luego del tratamiento.** PMN ( $1.5 \times 10^5$ ) fueron incubados con salina (Basal) o PMA (10ng/ml) 60 min. a 37°C y fueron sembrados sobre placas recubiertas con FGN (a) BSA (b) y CTI (c). Los resultados se expresan como porcentaje de aumento respecto al basal y cada valor representa la media  $\pm$  ES de 4-6 experimentos realizados con un pool de 3 ratones/grupo. **(a)** \* $p < 0.01$  comparado con salina (BASAL); # $p < 0.001$  comparado con salina (PMA) y Stx2 (basal); **(b)** 24h, \* $p < 0.01$  vs Stx2 basal, vs salina PMA y vs Stx2+Ru486 PMA; **72h**, # $p < 0.05$  comparado con salina (PMA) y Stx2 (BASAL), \* $p < 0.05$  vs Stx2 (PMA) y vs Stx2+Ru486 (BASAL), **(c)** \* $p < 0.05$  vs. Stx2 (BASAL) y \*\* $p < 0.001$  comparado con todos los grupos. Las comparaciones fueron realizadas por ANOVA seguida del test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

#### 4.2.3.- Ensayo de Migración

Luego investigamos los efectos del tratamiento *in vivo* con Stx2 sobre la capacidad migratoria a través de filtros con microporos de policarbonato, en respuesta a un gradiente quimioattractante de fMLP ( $10^{-8}$ M). La inoculación con Stx2 no generó ninguna diferencia en la migración de PMN a las 24 h luego del tratamiento (**Figura 8a**), pero esta migración fue significativamente mayor a las 72 h (**Fig. 8b**) bajo los efectos del medio o el estímulo con fMLP.

Los PMN aislados de ratones tratados con Stx2+Ru486 tuvieron una mayor capacidad migratoria a las 24 h (**Fig. 8a**), pero a las 72 h estos valores de migración retornaron a niveles basales (**Fig. 8b**). En consecuencia, los PMN provenientes de ratones tratados con Ru486 y Stx2, son más activos en la quimioquinesis (movimiento libre sin estímulo, MEDIO) y más sensibles al quimioattractante (fMLP), ya que este movimiento se vio aumentado y adelantado en el tiempo (Stx2+Ru486, 24 h **Fig. 8a**) respecto del control (Stx2, 72h, **Fig. 8b**).



**Figura 8. Migración de neutrófilos hacia fMLP.** Los neutrófilos ( $1 \times 10^5$ ) fueron incubados por 90 min para permitirles la migración a través de filtros de policarbonato (poro:  $3\mu\text{m}$ ) a  $37^\circ\text{C}$  con  $\text{CO}_2$  en respuesta al medio RPMI 0.5% BSA (control) o con fMLP ( $10^{-8}$ M) como estímulo. Luego los filtros fueron fijados y teñidos y el número de PMN quimiotácticos fueron contados en cinco regiones al azar bajo el lente de inmersión en aceite (x100) por cada uno de los triplicados en cada filtro. Los datos se muestran como # PMN/campo en el lente de inmersión en aceite. (a) 24 h (b) 72 h luego del tratamiento. \* $p < 0.001$  comparado con todos los grupos con MEDIO, & $p < 0.001$  comparada con todos los grupos con fMLP, #, @ $p < 0.001$  comparando todos los grupos con MEDIO o fMLP respectivamente. Las comparaciones fueron hechas con el test ANOVA seguida del test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

#### 4.2.4.- Expresión del marcador CD11b en los PMN circulantes

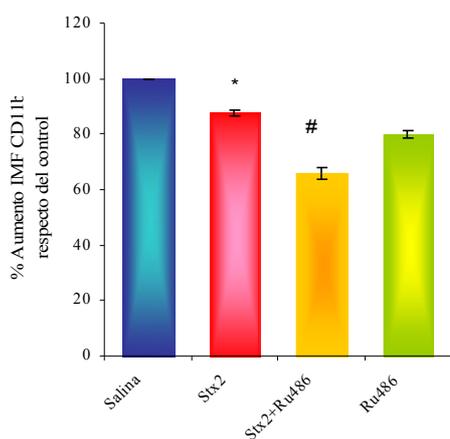
La activación temprana de los PMNs induce cambios cualitativos y cuantitativos en la expresión de la molécula CD11b [171]. Esta molécula participa en la adhesión al endotelio activado y a proteínas de la matriz extracelular. Por este motivo se evaluaron los efectos de los GC endógenos y exógenos sobre la expresión de dicha molécula.

Los resultados obtenidos 24 h post tratamiento (**Figura 9a**) revelan que la Stx2 induce la disminución en la expresión de CD11b en los PMN de sangre periférica, coincidentes con los resultados obtenidos en un trabajo previo publicado por nosotros [6]. La disminución observada fue más acentuada en neutrófilos de animales tratados con Stx2+Ru486. Por otra parte, Stx2 aumenta la expresión de CD22b a las 72 h y a este tiempo el tratamiento conjunto Stx2+Ru486 no altera los niveles de CD11b respecto del basal (**Fig. 9b**).

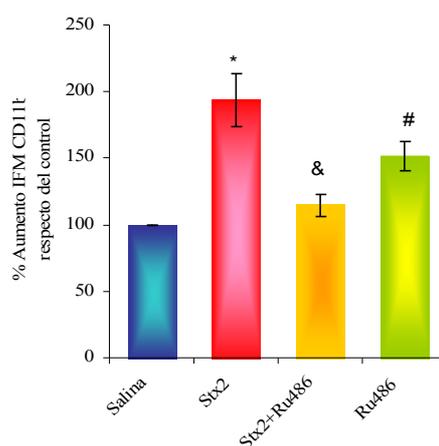
Teniendo en consideración que Stx2 *in vivo* aumenta los niveles de R-GC en neutrófilos, quisimos, por un lado estudiar los efectos de la dexametasona (análogo del GC sintético) directamente sobre el neutrófilo aislado de animales tratados con Stx2. Por el otro, investigar la capacidad de este esteroide para suprimir los efectos proinflamatorios deletéreos iniciados por Stx2 sobre el neutrófilo. La incubación de los PMN con DEX *in vitro* inhibió la expresión de CD11b tanto en el control como con Stx2 a las 24 y 72 h (**Figura 9 c y d**), aunque esta inhibición fue más importante en PMN provenientes de ratones tratados con Stx2 a 72h post tratamiento (**Fig 9d**).

#### Expresión de CD11b en membrana de PMN

(a) 24h



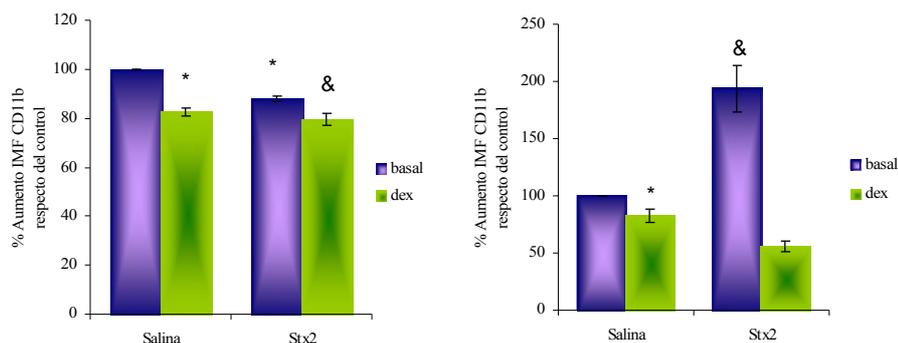
(b) 72h



## Efecto de la dexametasona *in vitro* sobre la expresión de CD11b.

(c) 24 h

(d) 72h



**Figura 9. Expresión del marcador de membrana de CD11b en PMN de sangre periférica a 24 y 72 horas post Stx2.** Los animales fueron sangrados con capilares heparinizados por el seno retroorbital al tiempo indicado luego de los tratamientos con salina, Stx2, Stx2+Ru486 o Ru486. Los eritrocitos fueron lisados y las células fueron incubadas con o sin DEX (100nM) por 30 min y luego con un anticuerpo anti-CD11b murino 30 min a 4°C. La intensidad de fluorescencia media (IFM) de las células positivas para el CD11b fue determinada en la región correspondiente a los PMN según tamaño y complejidad. Cada gráfico muestra el % de aumento de IMF con respecto al grupo de ratones control. Cada barra representa la media  $\pm$  ES de 4 experimentos independientes (n= 20-22 agrupados de a dos). **(a) 24h**, \*p<0.001 vs salina y Stx2+Ru486, #p<0.001 vs Ru486 **(b) 72h**, \*p<0.001 vs salina; &p<0.001 vs Stx2+Ru486, #p<0.05 vs salina. **Efecto de la DEX sobre la expresión de CD11b (c) 24h**, \*p<0.001 vs Salina; &p<0.001 vs Stx2+DEX. **(d) 72h** \*p<0.05 vs salina; &p<0.001 vs todos los grupos. Todas las comparaciones hechas con ANOVA seguida del test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

### 4.2.5.- Generación de Intermediarios Reactivos del Oxígeno por PMN (IROs)

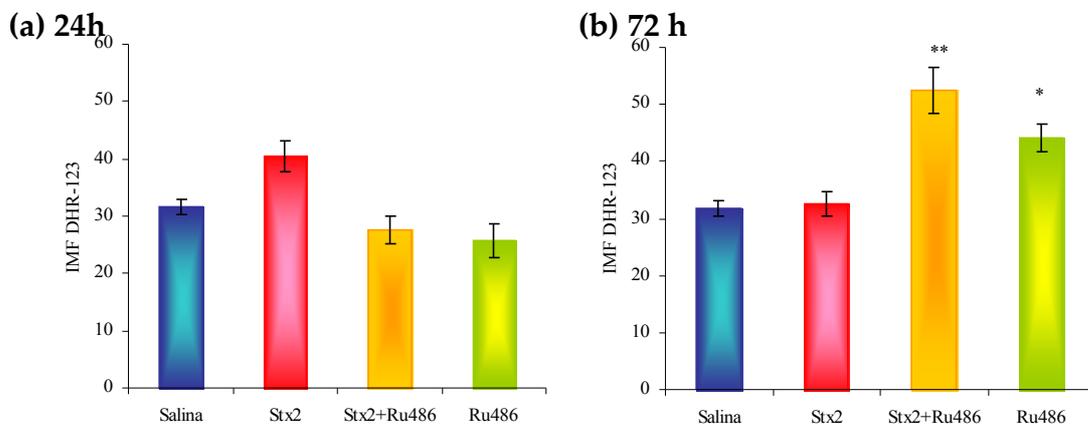
Una de las herramientas microbicidas más importantes del neutrófilo es el estallido respiratorio o la generación de IROs. En este estudio medimos la producción de IROs por citometría de flujo utilizando DHR-123 que en presencia de peróxido de hidrógeno emite fluorescencia verde. A nivel basal no se encontraron diferencias significativas en la producción de IROs de neutrófilos de animales tratados con Stx2 a ningún tiempo evaluado **Fig. 10 a y b**, 24 o 72 h post tratamiento, (Intensidad media de fluorescencia, IMF: salina =

31±1; Stx2= 40±3, n=24). La estimulación de los PMN *in vitro* con PMA (10 ng/ml) disparó la respuesta oxidativa, la cual fue significativamente mayor en los PMN de ratones tratados con Stx2 que el control con salina tanto a las 24 como a las 72 h (**Fig. 10c y d**).

La participación de los GC endógenos en la modulación de la generación de IROs fue evaluada a través del tratamiento simultáneo de los ratones con Stx2+Ru486. Este tratamiento indujo un aumento respecto de Stx2 que fue evidente a las 72 h a nivel basal (**Figura 10b**) (IMF: Stx2 = 32.5±2 vs Stx2+Ru486 = 52.5±4, n=24, p<0.001). y a las 24 h con estímulo (**Figura 10c**). El Ru486 *per se* también generó un incremento en la producción de IROs que fue significativo a las 72 h (basal o PMA) (**Figuras 10 b y d**). Esto sugiere que existiría un control fisiológico en la actividad de los PMN por los GC endógenos.

Con el objetivo de analizar el efecto de los GC exógenos que contrarresten la toxicidad de Stx2, determinamos los efectos *in vitro* DEX sobre la producción de IROs por los PMN. Como puede observarse en la **Figura 10e**, DEX (100nM) no modificó el nivel de estallido respiratorio inducido por PMA en los PMN de animales tratados con solución salina. Por otro lado, los PMN de ratones tratados con Stx2 fueron más susceptibles a los efectos de la DEX ya que la respuesta oxidativa fue significativamente inhibida a las 24 y 72 h (**Fig. 10 e y f**). Estos resultados muestran que la Stx2 es capaz de inducir la activación de los PMN para esta función y que la producción de IROs puede ser inhibida por los GC endógenos

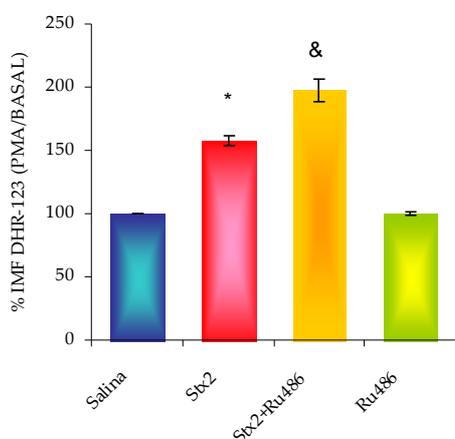
#### Producción basal de IROs



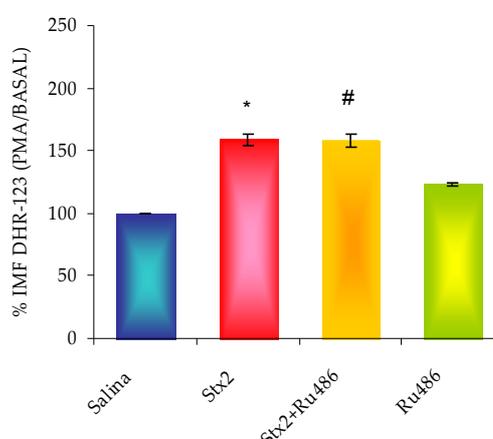


*Producción de Intermediarios Reactivos del Oxígeno, inducción por PMA.*

**(c) 24h**

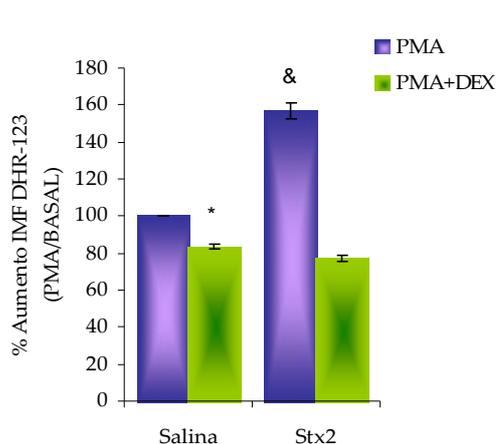


**(d) 72 h**

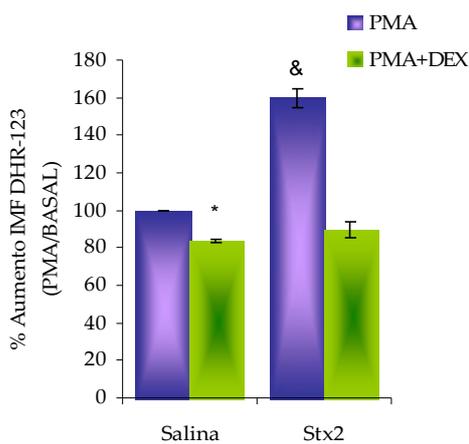


*Efectos de la dexametasona in vitro sobre la producción de IROs,*

**(e) 24 h**



**(f) 72 h**



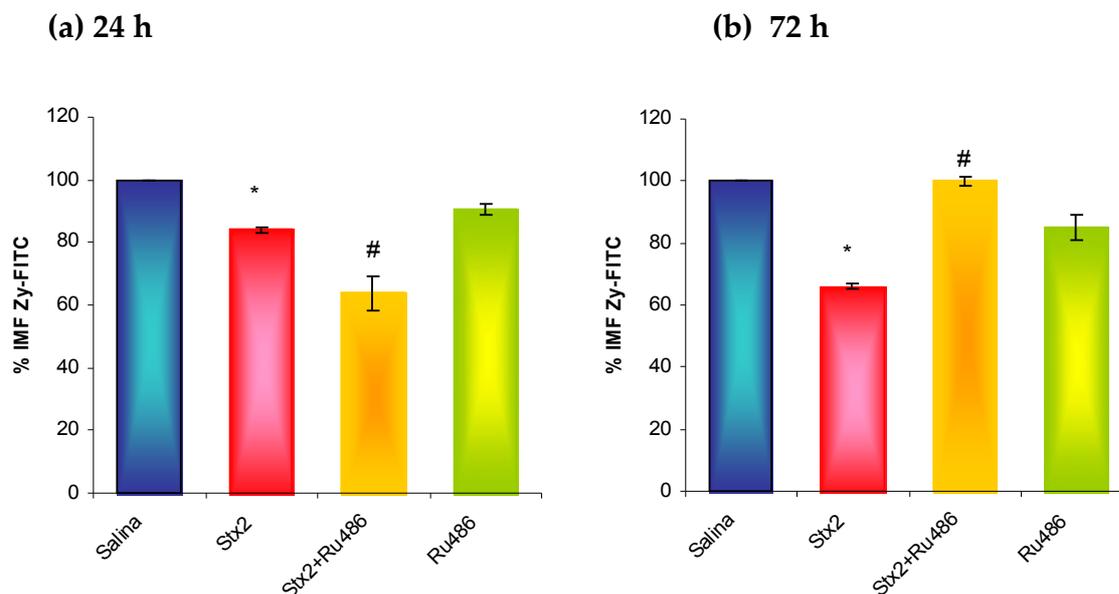
**Figura 10. Efecto de los GC endógenos y exógenos sobre la producción de IROs a nivel BASAL (a y b) y tras el estímulo con PMA (c-f).** Los PMN aislados fueron incubados con DHR-123, con o sin DEX 100nM. Por último, los PMN fueron incubados por 15' a 37°C con o sin PMA (5-20 ng/ml) y se midió la intensidad media de fluorescencia (IMF) por citometría de flujo. **Producción basal de IROs 24 h (a) y 72 h (b) post tratamiento.** \*\*p<0.001 respecto de Stx2, \*p<0.01 vs Stx2+Ru486. **IROs por inducción con PMA (c) 24 h y (d) 72h post tratamiento.** Los resultados están expresados como porcentaje de aumento de IMF de cada tratamiento con PMA respecto del basal. **c, 24h post tratamiento** \*p<0,001 vs salina; &p<0,001 vs Stx2 y vs Ru486 (n=16-24/grupo). **(d) 72h.** \*p<0,001 vs salina; #p<0,001 vs Ru486 (n=16-24/grupo). **Efecto de DEX sobre la producción de IROs en PMN. (e) 24h y (f) 72h post tratamiento.** \*p<0,001 comparado con salina y &p<0,001 vs Stx2 y vs Salina. Todas las comparaciones fueron hechas por ANOVA seguida del test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

#### 4.2.6.- Capacidad fagocítica de PMN.

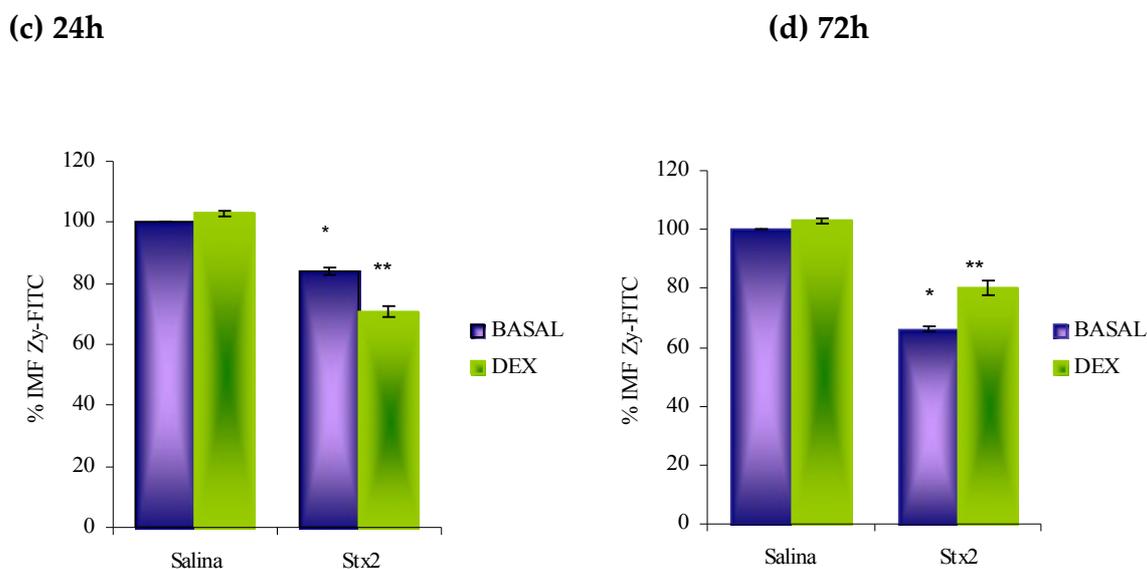
Estudiamos la función fagocítica de neutrófilos periféricos que fueron aislados e incubados con partículas de Zi-FITC y el índice de fagocitosis fue determinado por citometría de flujo 24 y 72 h luego de los correspondientes tratamientos *in vivo*. Como muestra la **Figura 11** la inoculación con Stx2 provocó una disminución significativa en la capacidad fagocítica 24 h luego del tratamiento (**Fig. 11a**) y esta inhibición fue aún más pronunciada a las 72 h (**Fig. 11b**). Por otra parte, para evaluar la participación de los GC endógenos sobre los efectos de la Stx2 en la fagocitosis de los PMN, tratamos a los ratones con Stx2 y Ru486. Este tratamiento generó una mayor inhibición en la fagocitosis, comparando con Stx2 a las 24h solamente (**Fig. 11a**). Los PMN de animales control inoculados con Ru486 no mostraron diferencias respecto de PMN de ratones tratados con salina a ningún tiempo evaluado. Estos resultados sugieren la existencia de un impedimento funcional en la fagocitosis inespecífica generada por Stx2 y agudizada por la ausencia de GC endógenos solo tempranamente (24h).

Para estudiar los efectos directos de los glucocorticoides sobre la función fagocítica de PMN de ratones tratados con Stx2, incubamos dichas células con DEX *in vitro*. Este tratamiento tuvo un efecto levemente inhibitor de la fagocitosis en el grupo tratado con Stx2 24h (**Fig. 11c**), pero no a las 72h. Esto sugiere una menor sensibilidad de esta función a la acción de los GC de fuentes tanto endógenas como exógenas.

Fagocitosis inespecífica de partículas de Zy-FITC.



Efecto de la dexametasona in vitro sobre la fagocitosis.



**Figura 11. Fagocitosis inespecífica de Zymozán-FITC (Zy-FITC).** Los PMN fueron lavados e incubados con o sin DEX (1000nM) 30 min a 37°C y luego con una suspensión de Zy-FITC 30 min 37°C en estufa gaseada. Finalmente las células fueron lavadas, fijadas en paraformaldehído 0.5% y luego se determinó la intensidad media de fluorescencia (IMF) de las células fagocíticas en el citómetro de flujo. Los resultados se expresan como % aumento en la intensidad media de fluorescencia (IMF) del Zy-FITC con respecto al control salina basal. Cada barra representa la media±ES de 5 experimentos independientes (n=24-30). **(a) 24 h, (b) 72 h.** \*p<0.001 comparado con Salina, Stx2+Ru486. #p<0.01 comparado con Ru486, para ambos tiempos. Además, \*p<0.001 entre Stx2 24h vs Stx2 72h. **Efecto de DEX in vitro. (c) 24h, (d) 72h.** \*p<0.001 comparado con salina, \*\*p<0.001 vs salina con DEX y vs Stx2. Las comparaciones fueron realizadas por el test de ANOVA seguida del test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

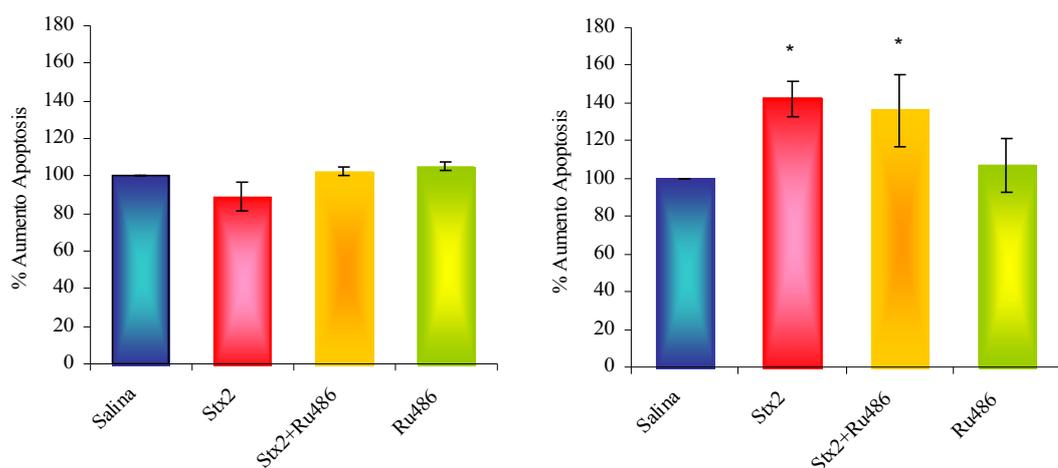
#### 4.2.7.- Apoptosis de PMN

Durante la inflamación aguda, los PMN infiltran al tejido dañado iniciando y amplificando la respuesta inflamatoria. La eliminación subsiguiente de los PMN a través de la apoptosis es imperativa para que el proceso inflamatorio pueda ser controlado y resuelto [172]. En el presente trabajo, nosotros evaluamos los efectos de la Stx2 *in vivo* sobre la apoptosis de los neutrófilos luego de 18 h en cultivo. El porcentaje de PMN apoptóticos no varió a las 24 h luego del tratamiento (**Fig. 12a**), pero se vio significativamente aumentada a las 72 h luego de la Stx2 (**Fig. 12b**).

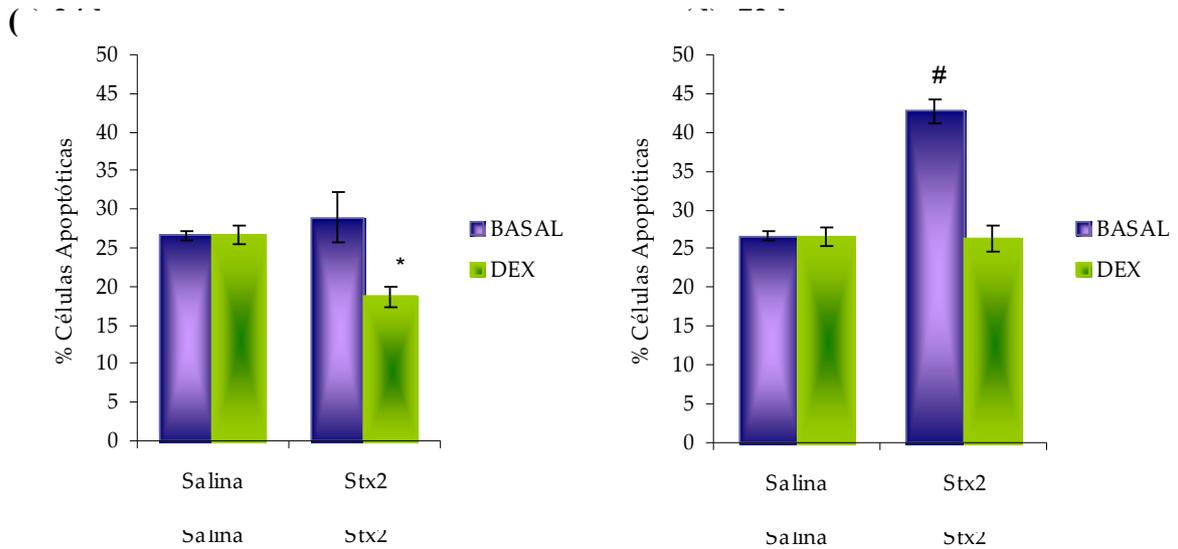
Los efectos de los GC endógenos revelaron que el tratamiento Stx2+Ru486 no tuvo incidencia sobre la capacidad apoptótica de los PMN, más allá de lo generado por Stx2 a las 72h (**Fig. 12b**). Por otra parte, el tratamiento con Ru486 tampoco altera la sobrevivencia de los PMN. En su conjunto, estos resultados indican que la toxina shiga *in vivo*, induce un aumento en la apoptosis espontánea de los PMN aislados 72 horas post inoculación, pero los GC endógenos no Stx2 *in vivo*.

El tratamiento *in vivo* con DEX llevó a un incremento en la sobrevivencia de los neutrófilos inhibiendo la apoptosis (Fig. 12c) como fue mostrado anteriormente [173]. Más aún, la inhibición inducida por DEX fue aún mayor en neutrófilos tratados con Stx2 al compararlos con salina. Este efecto inhibitorio contrarrestó el efecto de aumento generado por la Stx2.

Anontosis de PMN.



**Efecto de la dexametasona *in vitro* sobre la apoptosis de PMN.**



**Figura 12. Porcentaje de Células Apoptóticas.** Los PMN fueron pretratados por 18 horas con RPMI o DEX (1000nM). Luego de éste período las células fueron resuspendidas en RPMI 50% (SFB) frío y luego en una solución de etanol 70% y posteriormente incubadas por 48 horas a 4°C. Luego, la suspensión de células fue lavada y resuspendida en yoduro de propidio (IP) (50 mg/ml) durante 30 min a T° ambiente. Más tarde se evaluó el porcentaje de células apoptóticas por citometría de flujo. Los resultados se expresan como % de Aumento de células apoptóticas de cada tratamiento con respecto al control con salina. **(a) 24h y (b) 72h post tratamiento** donde, \*p<0,001 vs salina. **Efecto de la DEX *in vitro* (c) 72h,** \*p<0.01 comparado con Stx2 (24h) con DEX. **(d) 24h,** #p<0.001 comparado con Stx2 (72h) con DEX, con Salina y con Stx2 24 horas basal. n = 26/grupo. Las comparaciones fueron realizadas por el test de ANOVA seguida del test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

## RESUMEN sección 4.2

### 4.2.1.- Recuento de neutrófilos

- (i) La toxina shiga causó un aumento en la neutrofilia
- (ii) El tratamiento con Stx2+Ru486 profundizó la neutrofilia inducida por Stx2.

### 4.2.2.- Adhesión de neutrófilos

- (i) El tratamiento *in vivo* con Stx2 indujo el aumento en la adhesión de PMN a FGN y BSA
- (ii) Animales tratados con Stx2+Ru486 indujeron mayor adhesión de neutrófilos a FGN, BSA y CTI que los tratados con Stx2 a las 72 h post tratamiento.

### 4.2.3.- Ensayo de Migración

- (i) La toxina shiga indujo la quimioquinesis así como la quimiotaxis hacia el fMLP en forma tardía (72h).
- (ii) La depleción de GC endógenos en animales tratados con Stx2 (Stx2+Ru486) aumentó la migración y la aceleró en el tiempo ya que este incremento ocurrió antes (24 h post tratamiento) que el control con Stx2 (72 h post tratamiento).

### 4.2.4.- Expresión del marcador CD11b en los PMN circulantes

- (i) El tratamiento con Stx2 *in vivo* indujo un aumento significativo en la expresión de CD11b a las 72h post tratamiento.
- (ii) La depleción de GC endógenos en animales tratados con Stx2 tuvo un efecto inhibitorio sobre dicho aumento.
- (iii) La dexametasona *in vitro* causó la inhibición en la expresión de CD11b en neutrófilos. Esta inhibición fue significativamente mayor a las 72 horas post tratamiento con Stx2.

### 4.2.5.- Generación de Intermediarios Reactivos del Oxígeno (IROs) por PMN.

(i) La Stx2 no indujo la producción de IROs en forma basal, pero el estímulo con PMA indujo un aumento significativo respecto del control con salina, demostrando por un lado que la maquinaria oxidativa del PMN se encuentra intacta, y por el otro que estos PMN son más sensibles al estímulo respecto del control.

(ii) El tratamiento con Stx2+Ru486 provocó un aumento en la generación de IROs que pudo verse ya sea en la producción basal (72h) como tras el estímulo con PMA a las 24 horas luego del tratamiento con Stx2.

(iii) La dexametasona *in vitro* inhibió la generación de IROs, ejerciendo su efecto en forma directa sobre los neutrófilos aislados de ratones tratados con Stx2.

#### **4.2.6.- Capacidad fagocítica de PMN.**

(i) La toxina shiga *in vivo*, suprimió la fagocitosis de partículas de Zymozán-FITC en neutrófilos.

(ii) La depleción de GC endógenos profundizó el efecto inhibitorio generado por Stx2 a tiempos tempranos, ya que tardíamente los valores vuelven al nivel basal.

(iii) La incubación *in vitro* con DEX no tuvo efectos sobre la fagocitosis.

#### **4.2.7.- Apoptosis de PMN**

(i) La toxina shiga *in vivo* indujo un aumento en el porcentaje de células PMN apoptóticas en forma tardía (72h).

(ii) La depleción de GC no alteró el porcentaje de células apoptóticas inducido por Stx2 a ningún tiempo evaluado.

(iii) La incubación *in vitro* con DEX causó una disminución marcada en el porcentaje de PMN apoptóticas. Los neutrófilos provenientes de animales tratados con Stx2 fueron más sensibles a los efectos inhibitorios de la DEX que el control.

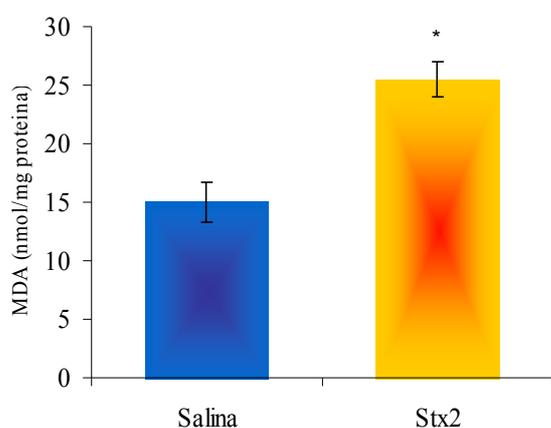
Estos experimentos demuestran que la toxina shiga ejerce un efecto activador en los neutrófilos y que esta activación puede ser controlada, al menos en forma parcial por los GC endógenos, ya que en su ausencia se observa la exacerbación de algunas funciones inflamatorias.

El estrés oxidativo es el desbalance que existe entre el estado pro-oxidante y el antioxidante a favor del primero. Este desbalance ocurre en ciertas condiciones patológicas como la endotoxemia donde el aumento en la producción de IROs sobrepasa a la capacidad de las defensas antioxidantes del huésped [174].

En la sección anterior mostramos que los neutrófilos polimorfonucleares son activados por Stx2 y que esta activación induce el aumento significativo en la generación de IROs luego de la activación con PMA (**Figura 9a**). Este aumento es una evidencia de que la toxina shiga rompe el balance oxidativo, por eso el objetivo de esta sección fue analizar en mayor profundidad el efecto de la toxina shiga sobre la ruptura de dicho balance.

#### 4.3.1.- Peroxidación Lipídica

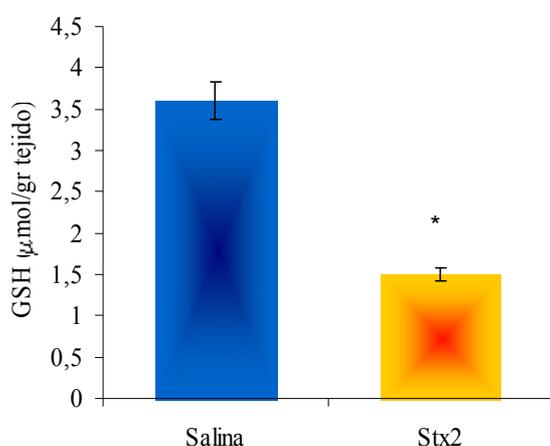
Durante la oxidación lipídica se forman hidroperóxidos que pueden ser decompuestos a varios productos, uno de ellos es el malondialdehído (MDA). Esta sustancia es reactiva del ácido tiobarbitúrico y en su presencia cambia de color pudiendo ser detectado por una técnica colorimétrica. Niveles elevados de MDA sugieren la presencia de peroxidación lipídica, es decir daño a membrana por especies reactivas del oxígeno. En este ensayo determinamos el grado de peroxidación lipídica en riñón a las 72 horas post inoculación, ya que es el mayor órgano afectado en el SUH. Los ratones fueron tratados Stx2 y a las 72 horas fueron sacrificados y procesados como se detalla en materiales y métodos para la remoción y procesamiento de los riñones. Pudimos ver que Stx2 es capaz de aumentar *in vivo* en forma significativa los niveles de MDA renales con respecto al control con salina (**Figura 13**).



**Figura 13. La toxina Stx2 aumenta la peroxidación lipídica en riñón.** Los animales fueron sacrificados 72 horas luego de la inoculación con Stx2 para extraer los riñones. Luego los riñones fueron homogeneizados en grupos de dos e incubados con 30mM bufer fosfato, 120mM KCL pH=7.4, 4%P/V BHT en etanol, 20% P/V ácido tricloroacético (TCA) y 0.7% P/V ácido tiobarbitúrico (TBA) y luego se procedió como se explica en materiales y métodos. Se muestra un experimento representativo donde cada barra muestra la media  $\pm$  ES de 6 ratones/grupo en nmol MDA/mg proteína. Se encontraron diferencias significativas donde, \* $p < 0.01$  comparado con el control por el test *t*-Student.

#### 4.3.2.- Glutación total (GSH) intracelular.

Como se explicó en la introducción, el glutación es un antioxidante endógeno de gran relevancia dado que protege a las células del estrés oxidativo. La disminución en el contenido intracelular de GSH es parámetro de aumento del estrés oxidativo, por eso determinamos los efectos de la Stx2 *in vivo*, sobre el contenido de glutación total en el tejido renal. A través de este ensayo pudimos determinar que la toxina shiga induce una disminución importante en los niveles intra-renales de GSH total (Figura 15).



**Figura 14. Stx2 reduce la concentración de GSH total.** Los animales fueron sacrificados 72 horas luego de la inoculación con Stx2 para extraer los riñones. Los homogenatos de riñón fueron mezclados con 0,5N HClO<sub>4</sub>, centrifugados y el sobrenadante fue neutralizado. Luego la muestra fue incubada con la mezcla de reacción como se detalla en materiales y métodos. El gráfico muestra un experimento de 20 ratones (agrupados de a dos), y cada barra muestra la media ± ES. Las diferencias entre ambos grupos fue significativa, donde \*p<0.0001 comparado con el control según Student *t*-test

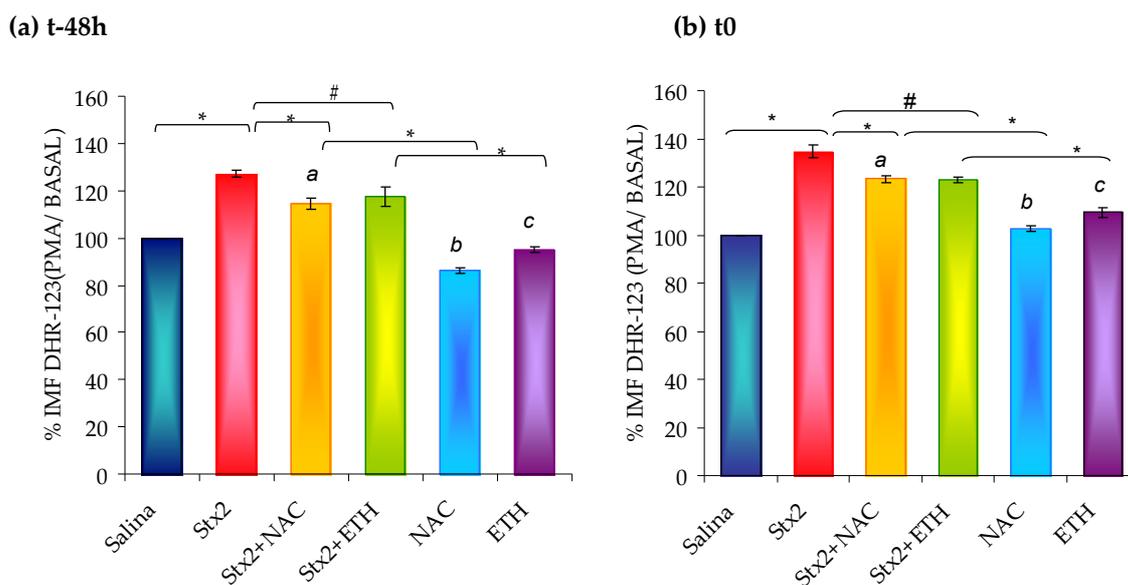
Teniendo en cuenta el desbalance oxidativo inducido por la toxina shiga tanto a nivel sistémico como local (riñón), consideramos importante evaluar el potencial efecto terapéutico de dos antioxidantes sintéticos, como N-Acetyl-L-Cisteína (NAC) y S-Ethil-L-Cisteína (ETH), que poseen conocidos efectos protectores contra sustancias reactivas del oxígeno. El objetivo fue utilizar ambos agentes para contrarrestar el estrés oxidativo y evaluar la capacidad para revertir el daño por oxidación inducido directa o indirectamente por la toxina shiga, ya que el mismo juega un papel importante en la patogénesis del SUH. Para tal efecto, se utilizaron cuatro protocolos de administración con el fin/objetivo de encontrar aquel que se adecue mejor a las características particulares del SUH (*ver introducción*): (a) **t-48** y (b) **t0**. En (a) ambas sustancias fueron administradas en el agua de bebida (1mg/ratón/día o 100 mg/kg/día), 48

horas antes de la toxina shiga, y en (b) se administraron intraperitonealmente (3.5 mg/ratón/día o 175 mg/kg/día) en simultáneo con la toxina. Para ambos protocolos, la administración de los antioxidantes se realizó desde el momento indicado hasta el final del experimento.

En primer lugar evaluamos la capacidad de estos compuestos de contrarrestar el estrés oxidativo inducido por Stx2.

#### 4.3.3.- Efecto de NAC y ETH sobre la generación de IROs en neutrófilos.

Teniendo en cuenta que Stx2 induce el aumento de IROs en PMN de sangre periférica *in vivo*, quisimos evaluar si NAC y ETH eran capaces de contrarrestar este efecto. Ambos agentes suprimieron en forma parcial el nivel de IROs (**Figura 15**). Esta inhibición fue leve pero significativamente más pronunciada para el tratamiento prolongado (t-48h) al comparar los grupos correspondientes con t0h. Esta diferencia fue más clara en los controles t-48h NAC y ETH.



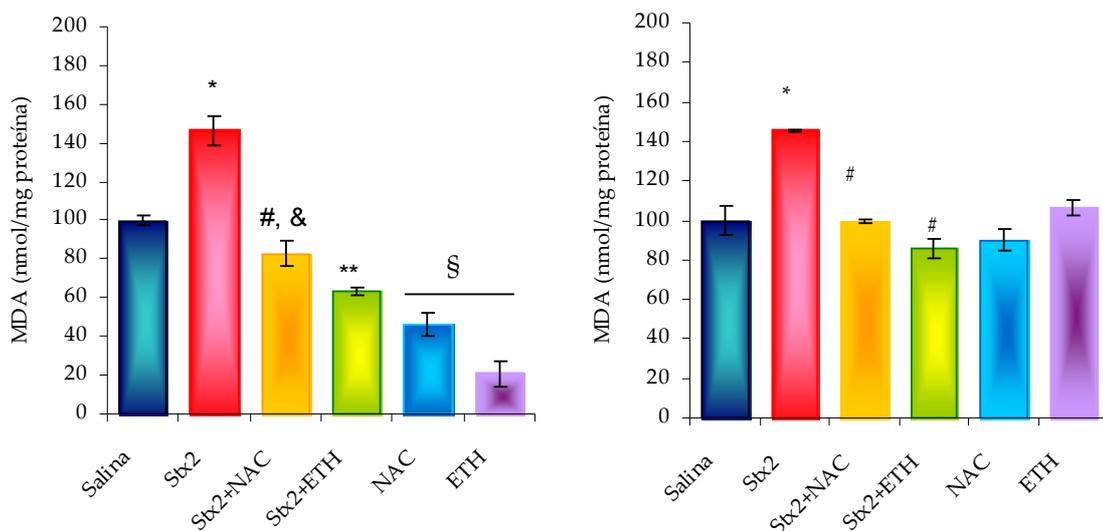
**Figura 15. NAC y ETH suprimen IROs en PMN.** PMN ( $2 \times 10^5$ ) aislados de sangre periférica 24 horas post inoculación con Stx2, fueron incubados con DHR-123 1mM 15' a 37°C. Luego, los PMN fueron incubados con o sin PMA por 15'a 37°C (5-20 ng/ml) para luego medir la fluorescencia verde en el citómetro de flujo como se detalla en materiales y métodos. Los datos se muestran como % de aumento de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de PMA/BASAL con respecto a al control. Cada barra representa la media  $\pm$  ES de dos experimentos para cada condición (n=12/grupo). **(A) t-48h** y **(B) t 0h**. Se encontraron diferencias significativas en cada experimento donde \* $p < 0.001$ , # $p < 0.05$  según se indica por arriba de las barras. Además, se encontraron diferencias significativas entre **t -48h** comparado con **t 0h** entre los grupos correspondientes, según se indica con las letras: *a*  $p < 0.05$ , *b*  $p < 0.001$  y *c*  $p < 0.05$ . Todas las comparaciones fueron realizadas por el test de comparaciones múltiples ANOVA seguida de Bonferroni.

#### 4.3.4.- Efecto de NAC y ETH sobre la peroxidación lipídica en riñón.-

Teniendo en cuenta que Stx2 per sé induce un aumento en el nivel de daño a membrana por estrés oxidativo (**Figura 13**), evaluado como aumento de MDA en riñón, quisimos determinar si NAC y ETH eran capaces de reducir dicho daño. Pudimos determinar que ambos antioxidantes lograron reducir los niveles de MDA a los valores basales (**Figura 16**). Mas aún, el tratamiento prolongado con NAC o ETH (t-48) lleva a los niveles de MDA a valores aun por debajo de los normales (**Fig. 16a vs Fig 16b**).

(a) t-48

(b) t0



**Figura 20. NAC y ETH reducen la peroxidación lipídica.** Los homogenatos de riñones fueron tratados como se explicó en materiales y métodos. Las barras muestran la media  $\pm$  ES de dos experimentos (n=12/grupo). (a) **t-48h**. \*p<0,001 comparado con todos los grupos; #p<0,05 comparado con Stx2+ETH y &p<0,001 comparado con NAC; \*\*p<0,001 comparado con ETH, § p<0,001 vs Stx2+NAC y Stx2+ETH respectivamente, vs salina. Además §p<0,001 respecto de los mismos grupos en **t0h**. (b) **t 0h**, \*p<0,001 vs todos los grupos, #p<0,05 vs NAC y vs ETH respectivamente. Todas las comparaciones fueron el test de comparaciones múltiples ANOVA seguida de Bonferroni.

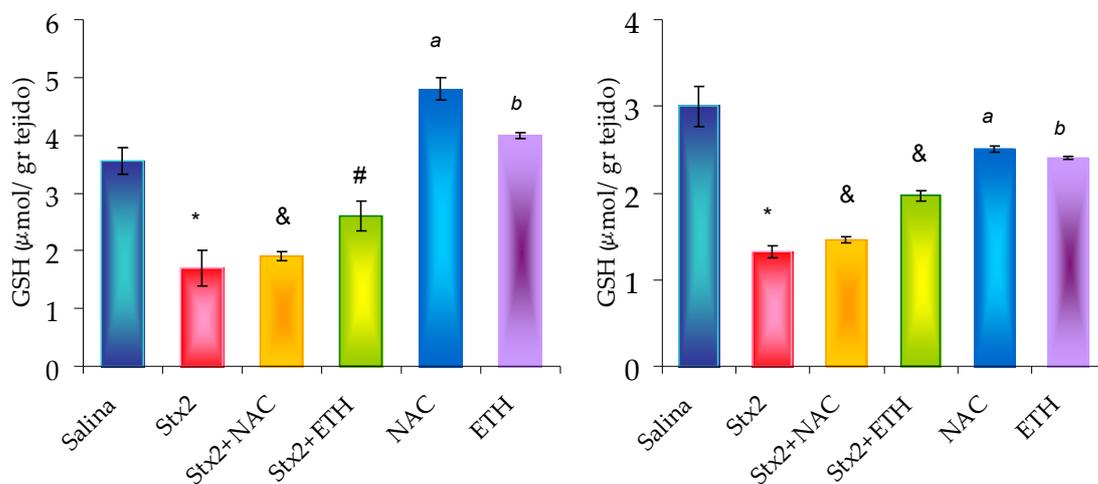
#### 4.3.5.- Efecto de NAC y ETH sobre la concentración de glutatión total en riñón.-

Habiendo demostrado que la toxina shiga induce una disminución significativa en los niveles de glutatión total (**Figura 14**) en el tejido renal, determinamos si los antioxidantes ensayados eran capaces de restaurar dichos niveles. Como se muestra en la **Figura 21 a y b**, encontramos que solo el ETH fue capaz de contrarrestar en forma parcial el efecto de Stx2 sobre los niveles de GSH en riñón. El tratamiento prolongado con NAC y ETH (t-48) incrementó el GSH total con respecto al basal con Salina (**Fig. 21a**).

(a) t-48

(b) t0

**Figura 21.** NAC y ETH restauran parcialmente la concentración de GSH intracelular. Los

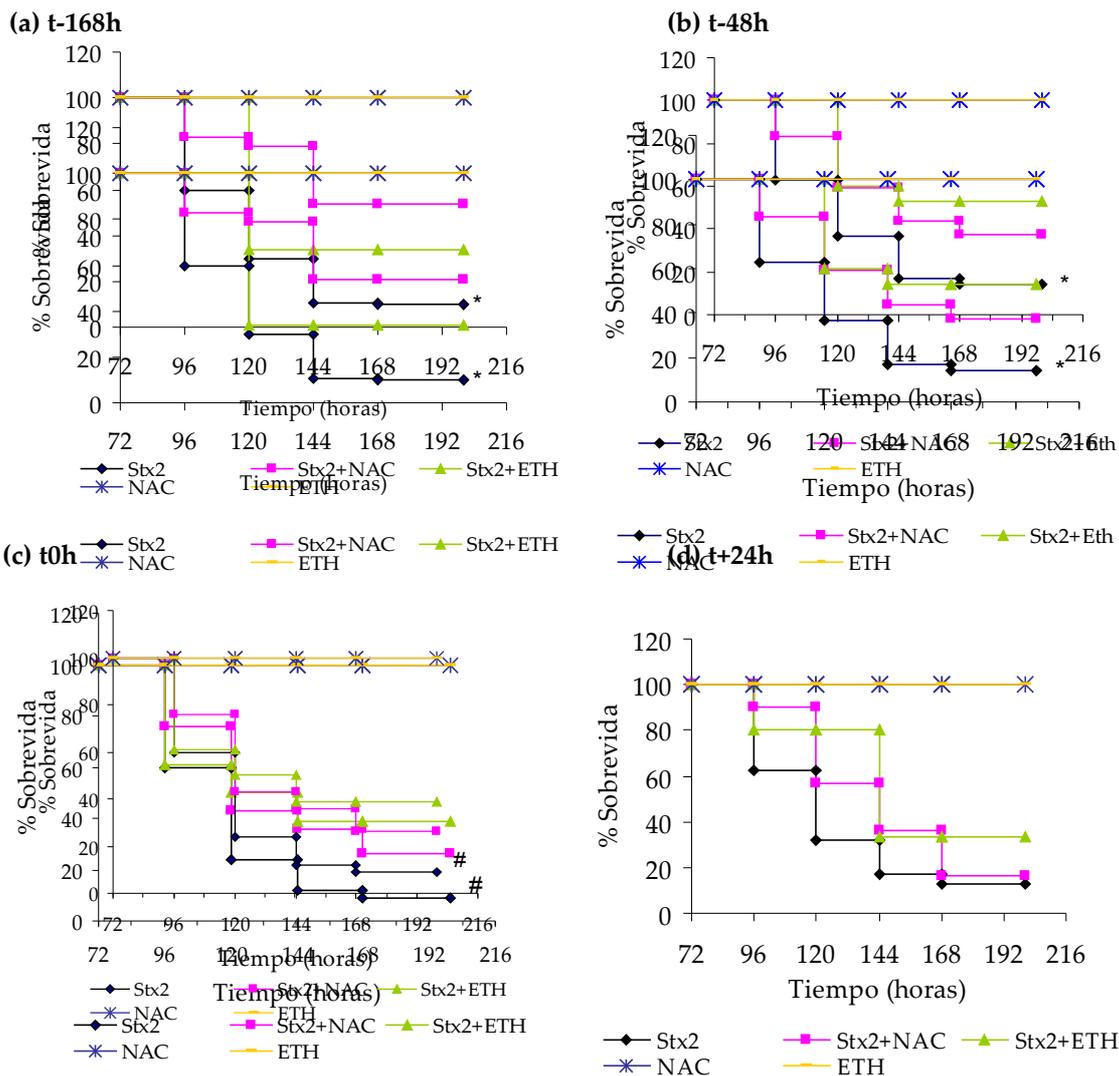


homogenatos de riñones fueron tratados como se indica en la Figura y en materiales y métodos. Cada barra muestra la media  $\pm$ ES de dos experimentos distintos (n=6-12/grupo). **(a) t-48h.** \*p<0.003 vs Stx2 y vs NAC, \*\*p<0.05 vs Stx2+ETH, &p<0.0001 vs NAC, #p<0.001 vs ETH. **(b) t 0h.** \*p<0.0001 vs Stx2, p<0.02 vs NAC y p<0.01 vs ETH; \*\*p<0.003 vs Stx2+ETH; &p<0.0001 vs NAC y vs ETH. Además, se encontraron diferencias significativas entre t -48h y t 0h entre los grupos correspondientes según se indica por las letras sobre las barras: ap<0.05, bp<0.0001. Todas las comparaciones fueron hechas por el test t-Student. Atención: notar la diferencia de escala en el eje y entre los dos gráficos.

#### 4.3.6.- Efecto de NAC y ETH en el índice de sobrevivencia.

Habiendo demostrado que NAC y ETH previenen efectivamente el estrés oxidativo en el modelo murino de SUH, quisimos determinar la efectividad de ambos antioxidantes para contrarrestar los efectos deletéreos de la Stx2 evaluando los índices de mortalidad inducido por la toxina. Debido a que encontramos mayor efectividad con el tratamiento prolongado de t-48h, incorporamos un grupo donde el tratamiento con los antioxidantes comenzó 168 horas antes de la Stx2 (**t-168h**). Además, pensando en fines terapéuticos y

considerando que actualmente gran parte de los niños llegan a la consulta con el SUH declarado, nos pareció interesante evaluar adicionalmente un punto posterior a la inyección de la toxina, por lo cual analizamos otro protocolo donde los antioxidantes fueron suministrados 24 horas después de la inoculación con la toxina (**t+24h**). NAC y ETH lograron atenuar los efectos letales de Stx2 (**Figura 22: a, b y c**). Coincidentemente, la sobrevida fue mayor en los tratamientos prolongados, y marginalmente significativa para el protocolo **t0** (**Fig. 22 a: t-168 y b: t-48**). No hubo diferencias estadísticamente significativas en el grupo tratado con NAC o ETH 24 horas después de la inoculación con Stx2.

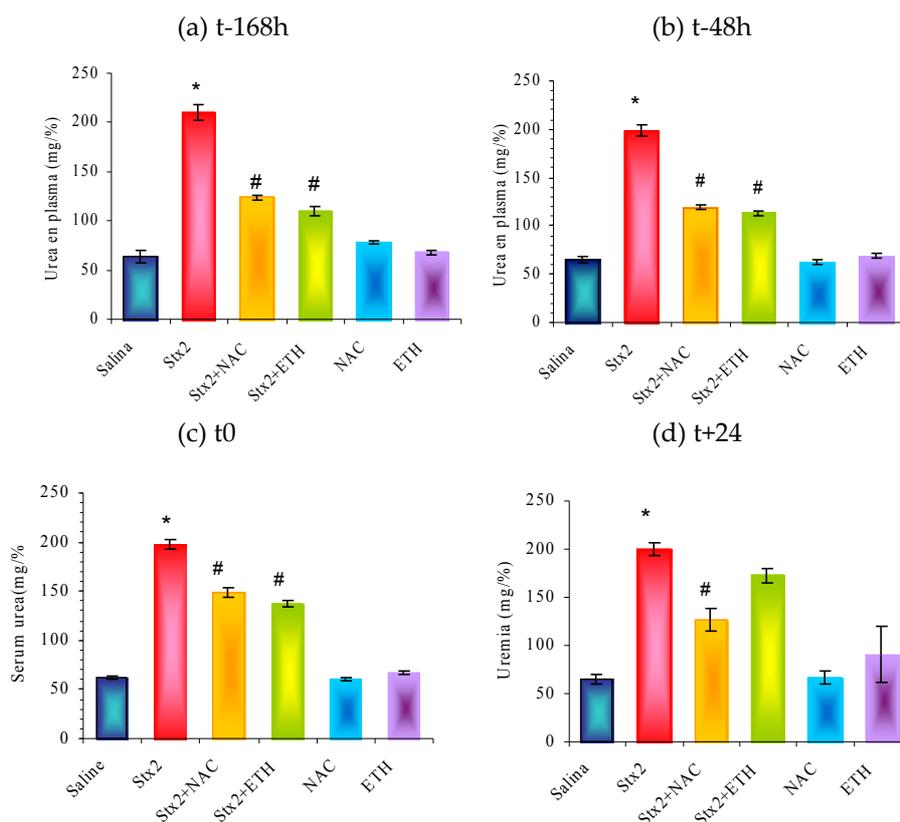


**Figura 22. Estudios de sobrevida.** Los animales fueron tratados con Stx2, Stx2+NAC, Stx2+ETH, NAC y ETH a los tiempos que se indica en cada figura y según se detalla en materiales y métodos. La sobrevida fue determinada por observaciones frecuentes de los grupos. Los gráficos muestran el promedio del % de sobrevivientes de por lo menos 3 experimentos de 6 ratones por grupo. (a) t-48h, \*\*p<0.001 vs Stx2+NAC y Stx2+ETH. (b) t0h, \*p<0.06 (marginamente significativo) vs Stx2+NAC y Stx2+ETH, (c) #p<0.06. Todas las comparaciones fueron realizadas por el método Chi Cuadrado.

#### 4.3.7.- Efecto de NAC y ETH sobre la función renal: determinación de uremia

En nuestro modelo, los niveles elevados de urea en plasma correlacionan con el daño renal como se explicó en la página 42 de la introducción [175]. Además provee una herramienta para el seguimiento del desarrollo del SUH en el modelo murino [8], dado que la urea se eleva 24 horas antes de la muerte (del basal ~ 60mg/% se eleva a 180-250 mg/%) que de acuerdo a la dosis letal de

toxina utilizada aquí, ocurre entre las 96 y 144 horas post inoculación. Por lo tanto los animales fueron sangrados con capilares heparinizados a las 72 horas post Stx2. Pudimos determinar, como se muestra en la **Figura 23** que tanto NAC como ETH causaron una disminución significativa pero parcial de los niveles de uremia. Por otra parte los tratamientos prolongados (t-168 y t-48h) ejercieron mayor protección renal, ya que los niveles de urea fueron significativamente más bajos respecto de los mismos grupos en t0 y t+24.

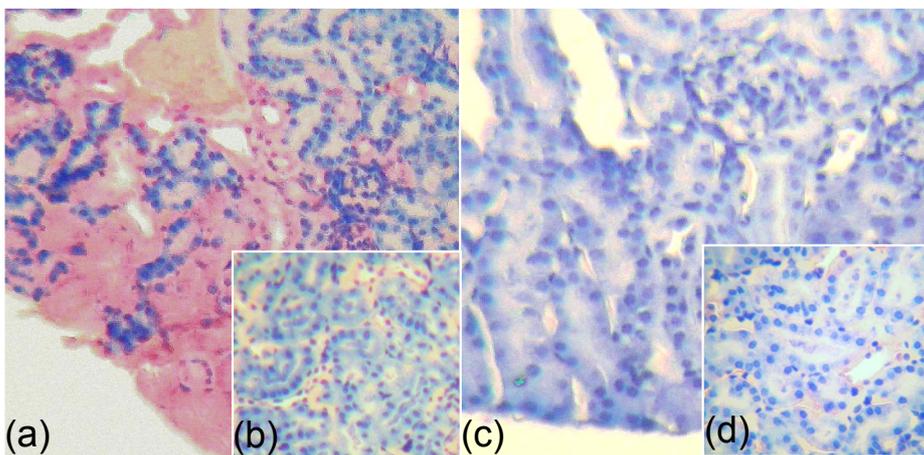


**Figura 23. Niveles plasmáticos de urea.** Se tomaron 100µl de sangre periférica con capilares heparinizados y el plasma obtenido fue guardado a -20°C hasta el momento de la determinación. Las barras muestran la media ± ES de 4 experimentos (n=12-22). (a) **t -168** (b) **t-48** (c) **t0** (d) **t+24**, donde \*p<0.001 vs todos los grupos, #p<0.05 respecto de su control correspondiente. Todas las comparaciones realizadas por el test de ANOVA de comparaciones múltiples seguido de Bonferroni. Además, se encontraron diferencias significativas entre los protocolos de tratamiento: t-168 y t -48h vs t0h y t+24 donde se compararon Stx2+NAC y Stx2+ETH cada uno con su grupo correspondiente, p<0.001. Según el test t-Student.

#### 4.3.8.- Efecto de NAC y ETH sobre la función renal: apariencia histológica

Para poder determinar si existía correlación entre lo observado en el % de sobrevida y los niveles de urea con el estado real del riñón, estudiamos la

aparición histológica de riñones de animales tratados con NAC y ETH. En la figura se muestran secciones representativas de cada tratamiento bajo el protocolo **t-48** de animales tratados con ETH. El aspecto de las secciones proveniente del tratamiento con NAC fueron similares (no se muestran). Como se explica en la leyenda de la **Figura 24**, el tejido renal de ratones tratados con Stx2 (**Fig. 24 a**) presenta focos de necrosis cortical (necrosis de coagulación, como producto de injuria por isquemia), con pérdida de la estructura general de túbulo y glomérulos. Por otra parte, las secciones provenientes de ratones tratados con Stx2+ETH (**Fig. 24 c**) presentaron leve congestión intersticial pero con la estructura general conservada, con ausencia total de focos de necrosis. El tratamiento bajo el protocolo **t0** fue menos eficiente dado que se encontraron menos diferencias significativas entre los grupos tratados con Stx2 (no se muestra).



**Figura 17. Apariencia histológica de secciones de riñones de t -48h.** Se muestra un experimento representativo de ratones tratados con (a) Stx2, (b) Salina, (c) Stx2+ETH y (d) ETH. Los ratones fueron sacrificados a las 72 h luego de la inyección con Stx2. Ambos riñones fueron perfundidos con PBS y extraídos, luego enjuagados y fijados en buffer formol. Luego se procedió como se indica en materiales y métodos. **(a) Stx2.** Necrosis focal en la región de la corteza con pérdida de la estructura glomerular y tubular. El área necrótica se encuentra rodeada por parénquima conservado. **(b)** Inseto control con *Salina*, se observa parénquima conservado con estructura de túbulo y glomérulos conservados. **(c) Stx2+ETH.** Presenta la estructura general conservada y leve congestión intersticial. **(d)** Inseto. *ETH*. Estructura general conservada como en (b)

## RESUMEN sección 4.3

### ***4.3.1.- Peroxidación Lipídica y Glutación total (GSH) intracelular.***

(i) La toxina shiga indujo un aumento significativo en los valores de MDA intra-renales indicando mayor daño tisular por peroxidación lipídica.

(ii) El tratamiento con Stx2 causó una disminución pronunciada en el contenido intra-renal del antioxidante endógeno GSH.

### ***4.3.2.- Efecto de NAC y ETH sobre la generación de IROs.***

(i) Ambos agentes fueron capaces de inhibir en forma parcial la producción de IROs de neutrófilos aislados de ratones tratados con Stx2.

(ii) El tratamiento prolongado con NAC tuvo un efecto levemente mejor sobre la supresión de IROs que ETH.

### ***4.3.3.- NAC y ETH reducen la peroxidación lipídica en riñón.-***

(i) Ambos agentes fueron capaces de reducir significativamente la producción de MDA en riñón inducida por Stx2 a ambos tiempos (en los dos protocolos ensayados t-48 y t0).

(ii) Dicho efecto fue más pronunciado en ratones tratados con ETH en forma prolongada (t-48h).

### ***4.3.4.- Glutación total***

(i) El tratamiento con ETH restauró parcialmente los niveles renales de GSH total depletados por el tratamiento con Stx2.

(ii) Tiempos prolongados de administración de los agentes antioxidantes indujeron un aumento mayor de GSH que la administración corta (t0).

### ***4.3.5.- Ensayos de sobrevida con NAC y ETH en animales tratados con Stx2.***

(i) Ambos antioxidantes aumentaron la sobrevida en forma parcial, al ser administrados por tiempos prolongados (t-168h, t-48h). La administración

simultánea con Stx2 (t0h) tuvo una tendencia positiva, pero marginalmente significativa.

(ii) La administración de ambos agentes 24 horas posteriores a la Stx2 no tuvo efectos en la protección.

#### **4.3.6.- Urea en plasma y Apariencia histológica.**

Tanto NAC como ETH lograron disminuir el daño renal inducido por Stx2, evaluado a través de la disminución en los niveles de urea en plasma y en la protección observada en los preparados histológicos de riñones.

En conjunto podemos concluir que la toxina shiga efectivamente induce un desbalance oxidativo protagonizado por el aumento de los parámetros de estrés oxidativo. Este efecto inducido por la toxina colabora con sus efectos específicos directos, profundizando el nivel de daño al tejido blanco. Este efecto puede ser suprimido al menos en parte por la administración de antioxidantes tales como NAC o ETH.

El modelo murino, por inyección intravenosa de Stx, resulta sumamente útil para el estudio de los efectos directos de la Stx, independizándose de los efectos intestinales y del LPS que acompañan indefectiblemente a las infecciones con STEC y que dan lugar al SUH. Más aun, 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 al modelo murino para el estudio de ciertos aspectos del SUH. Algunas de estas semejanzas son la presencia de neutrofilia, trombocitopenia y daño renal, caracterizado histológicamente por necrosis tubular, y diferente grado de daño glomerular (engrosamiento de la cápsula de Bowman, retracción glomerular, pérdida de la estructura, y cuando se trata simultáneamente con inhibidores de la NO sintasa endotelial se observa la típica microangiopatía trombótica, característica de riñones los humanos) [6, 45]. Un aspecto importante sobre el uso del modelo murino es que nos permite evaluar acontecimientos tempranos de la enfermedad, ya que los pacientes se presentan al hospital con la enfermedad declarada y el estudio de los distintos aspectos de la fase inicial se hace imposible. En este sentido, pudimos realizar diversos estudios cinéticos *in vivo* como por ejemplo el efecto temporal de la administración de Ru486 o dexametasona para encontrar en qué momento del desarrollo de la enfermedad los GC son más importantes; o la detección de citoquinas proinflamatorias en suero; o el fenómeno de activación del neutrófilo inducido por Stx2 durante las primeras horas. Este modelo también es muy importante porque nos permite estudiar aspectos de esta enfermedad, imposibles de realizarse en pacientes, como la detección de GSH en riñón, que nos llevan a entender los mecanismos de la fisiopatogenia del SUH. Conociendo estos mecanismos podemos tratar de desarrollar terapias que controlen o reviertan el grado de injuria inducido por Stx2.

El Mifepristone o Ru486 es una droga que posee alta afinidad por el receptor de glucocorticoide o de progesterona [108]. Esta droga no altera las concentraciones endógenas de glucocorticoides [108] pero su capacidad para bloquear la acción de los mismos sobre el tejido que expresa su receptor se encuentra ampliamente demostrada [176] [177, 178]. En nuestro caso, elegimos utilizarlo luego de determinar que sus efectos sobre la mortalidad y el daño renal en ratones previamente tratados con Stx2 eran los mismos que la adrenalectomía, pero sin el estrés quirúrgico provocado por esta operación [8].

El estudio temporal que se realizó inoculando Ru486 a distintos intervalos de tiempo luego de la inoculación con Stx2 reveló que el efecto protector de los GC endógenos ocurre durante los primeros estadios de la enfermedad, ya que animales tratados con Ru486 durante las primeras 48 horas fueron más susceptibles a los efectos tóxicos de la toxina shiga y sufrieron mayor mortalidad que los controles (Figura 1a). Es decir que los GC serían necesarios tan pronto como se dispara la respuesta inflamatoria por la entrada de la toxina. Más aun, el tratamiento con dexametasona revirtió la disminución de la sobrevivencia causada por Stx2+Ru486 (Figura 1b).

Los GC ejercen sus efectos antiinflamatorios e inmunosupresores inhibiendo la expresión, secreción y acción de los principales mediadores de la inflamación como las citoquinas (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) y las moléculas de adhesión [179]. Esta serie de eventos ocurre en forma temprana luego del estímulo inflamatorio [180] y se han descriptos en varios trabajos. Por ejemplo, Gow y equipo demostraron que la DEX (ip) es capaz de inhibir la expresión de ARNm de IL-1 $\beta$  en el hígado, solo cuando es administrada 6 horas luego del LPS (ip) [179]. En un modelo murino de sepsis por ligamiento cecal, Ashare y grupo encontraron que el balance de citoquinas pro y anti inflamatorias correlacionaba directamente con la severidad de la infección y la mortalidad. En este trabajo determinaron que en forma temprana (6 horas) predominaban las citoquinas proinflamatorias, y luego de 24 horas el patrón de citoquinas pasaba a ser de anti-inflamatorio. Así demostraron que la respuesta inflamatoria inicial a la sepsis es seguida inmediatamente por la antiinflamatoria, y que el desarrollo de la infección está determinado por el efecto temporal y la magnitud de ambos procesos [181]. En nuestro modelo, la capacidad de la toxina shiga de despertar una respuesta antiinflamatoria es efectiva, como pudo comprobarse con la determinación de GC en plasma (figura 2.6, p26). El modelo murino, nos permitió determinar específicamente en qué momento en la evolución de la enfermedad este proceso de control de la inflamación es necesario. Por lo tanto, es posible pensar que las primeras horas luego de la entrada de la toxina a la sangre son determinantes para la evolución del SUH, ya que ocurren todas las interacciones necesarias para definir el desarrollo de la enfermedad.

El incremento en la concentración de CK proinflamatorias en plasma por un estímulo inflamatorio activa al eje HPA, y como consecuencia de esta activación aumenta la concentración de GC [182]. Los GC ejercen

retroalimentación negativa sobre la respuesta inflamatoria disminuyendo la producción secreción y acción de los principales mediadores inflamatorios como la IL-1 $\beta$  [183]. Por otra parte, está demostrado el efecto sinérgico que ejerce la Stx2 junto al TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  para dañar a las células endoteliales. Mas aun, el TNF- $\alpha$  es un mediador de la inflamación y de la coagulación microvascular que se encuentra aumentado en el SUH [35]. Teniendo en cuenta estos antecedentes quisimos determinar si el efecto protector de los GC estaba asociado a la retroalimentación negativa ejercida sobre la liberación de citoquinas proinflamatorias potenciadoras de la injuria. Sin embargo, la ausencia de GC endógenos (Stx2+Ru486) no tuvo ningún efecto sobre la concentración de TNF- $\alpha$  en sangre periférica (figura 2a). Tampoco se detectaron diferencias en la concentración de IL-1 $\beta$  bajo ningún tratamiento. Para concluir sobre estos resultados es necesario tener en cuenta que el suero no necesariamente posee las mismas concentraciones de citoquinas que el ambiente local del riñón, principal órgano afectado en el SUH [54]. Entonces, es posible que el tratamiento con Ru486 altere las concentraciones locales de citoquinas dentro del riñón y que no se vean reflejadas en un aumento a nivel sistémico, más allá del inducido por Stx2. En este sentido, se ha demostrado que la toxina shiga induce la expresión del ARNm de TNF- $\alpha$  en el tejido renal de ratones [54]. Por lo tanto, aumentos locales en la producción de citoquinas en diversos tejidos pueden tener una contribución importante sobre la letalidad aunque no se vea proporcionalmente reflejada en la circulación. En pacientes se ha demostrado que no hay correlación entre la concentración de citoquinas en plasma y en la orina del mismo individuo, lo que sugiere que estas citoquinas están siendo producidas localmente en el riñón [35, 184]. Es por eso que para poder demostrar este punto, habrá que realizar las determinaciones de TNF- $\alpha$  en el órgano en cuestión y estudiar los efectos de los GC endógenos a nivel local específicamente.

Se ha demostrado que la adrenalectomía aumenta la sensibilidad al TNF- $\alpha$  administrado en forma exógena, y que hay varios mecanismos por los cuales los GC podrían modular la respuesta a esta citoquina [185, 186]. Por ejemplo, a través de la regulación la expresión del ARNm y de la proteína en membrana de los distintos isotipos del receptor para TNF- $\alpha$  en células sensibles a su acción [187]. Otro camino indirecto es a través de la inducción de la liberación de otros mediadores que a su vez controlen la acción del TNF- $\alpha$  como la lipocortina-1. Los GC inducen la secreción de lipocortina-1 por diversos tipos de células tanto

inmunes como endoteliales, y esta a su vez es capaz de suprimir la liberación de TNF- $\alpha$  de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Por otra parte, la lipocortina-1 a su vez inhibe la acción de IL-1- $\beta$  inducida por la secreción de TNF- $\alpha$  de PBMC [188].

Los estudios realizados para analizar los efectos de la depleción de GC endógenos sobre el flujo renal reflejan, *in vivo*, lo que previamente se había observado sobre la apariencia histológica y sobre la mortalidad [8]. Es decir que la ausencia de acción de los GC endógenos (Stx2+Ru486) intensificó la acción tóxica de la Stx2 sobre el riñón, alterando su función (figura 3c). Esto pudo verse gracias a las imágenes tomadas *in vivo* en el centellograma realizado con  $^{99m}\text{Tc}$ -glucoheptanato. En este sentido, se ha demostrado en fetos de ovejas que los GC aumentan la velocidad del filtrado glomerular, del flujo sanguíneo renal y de orina, así como la acidificación tubular y la expresión del intercambiador sodio/protón en el túbulo proximal. Estos cambios no están asociados al aumento en la capacidad de reabsorción de sodio por el riñón fetal [189, 190]. En humanos, los GC exógenos aceleran la maduración de la función renal en bebés inmaduros, tal vez tras inducir la actividad de la bomba sodio-potasio ATPasa, ya que observaron el aumento en el clareado de creatinina y la reabsorción de sodio al ser administrados en madres antes del parto [191]. Entonces, es posible pensar que, los GC probablemente estén actuando directamente sobre la función renal, aumentando la velocidad del filtrado glomerular y del flujo sanguíneo.

Un hallazgo interesante respecto del circuito GC-respuesta inflamatoria es que la toxina shiga indujo un aumento significativo en la expresión de R-GC en neutrófilos de sangre periférica (figura 4c). La acción de los corticosteroides depende principalmente de la disponibilidad de la hormona en la circulación y del número y función del receptor de la misma [94, 192]. El aumento en el número de R-GC y/o la afinidad podrían proveer un mecanismo por el cual las células favorecen la sensibilidad a los GC, y de esa manera promueven la inhibición por retroalimentación negativa [193]. Los resultados mostrados aquí indican que el número de R-GC en los neutrófilos comienza a aumentar a medida que la concentración de GC inducida por Stx2 comienza a disminuir. Este puede ser un mecanismo a través del cual los PMN estarían aumentando la sensibilidad a GC. Entonces, el incremento en la disponibilidad de R-GC sobre neutrófilos

inducida por la toxina shiga podría contribuir con la capacidad protectora de los GC en el control del potencial patogénico de esta población celular. Más aun, existen evidencias que han sugerido una relación directa entre el número de R-GC y la respuesta biológica [192-194]. Por ejemplo Danielsen y equipo demostraron en una línea celular derivada de cáncer de timo sensible al efecto de los GC, que esta sensibilidad estaba directamente asociada al número de R-GC presentes en las células. Vieron que células que fenotípicamente expresaban menos R-GC eran menos sensibles a los efectos de los GC [194]. En el mismo sentido, Vanderbilt y grupo contruyeron líneas celulares que expresaban distintos niveles de R-GC y demostraron que la respuesta transcripcional ejercida por el receptor era proporcional al número de moléculas presentes por célula. Aunque destacan que, si bien la presencia del R-CG posee una importancia primordial, se necesitan otros factores celulares para que la concentración adecuada del receptor se corresponda con el nivel transcripcional [192]. Se puede discutir que la inducción de GC y de sus receptores en los PMN sea un efecto directo de la toxina shiga, y/o secundaria a la secreción de mediadores inflamatorios como el TNF- $\alpha$  la IL-1 $\beta$  o la IL-6. Pero, en efecto, la estimulación de eje HPA se produce de manera secundaria a la respuesta inflamatoria inducida por el agente inflamógeno y por lo tanto se produce la inducción de R-GC en las distintas células [79].

En nuestro modelo la relevancia de los PMN en la injuria causada por la toxina queda demostrada en los experimentos de depleción, donde la ausencia de PMN reduce de forma significativa la mortalidad 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 relacionada directamente al daño renal producido. En este mismo sentido, el tratamiento con Ru486 en animales depletados de PMN y tratados con Stx2 no incrementan la mortalidad, a diferencia de cuando los neutrófilos están presentes (figura 5a). De esto se desprende que la acción de los glucocorticoides endógenos, ocurre principalmente a través de la supresión de la acción proinflamatoria de los neutrófilos inducida por la Stx2, ya que sin PMN circulantes, la ausencia de GC no altera el índice de sobrevida. A través de estos experimentos queda demostrada la importancia de los PMN como factor adicional y determinante para causar el daño inducido por Stx2. Por otra parte, la administración de GC exógenos en animales depletados de PMN aumentan la sobrevida,

demostrando que dosis farmacológicas de este compuesto ejercen protección independientemente de los neutrófilos (figura 5b). En este sentido, es posible que la dexametasona actúe directamente sobre otros tipos celulares como los macrófagos o las células endoteliales para suprimir, por ejemplo, la secreción de citoquinas proinflamatorias [195, 196]. También es posible que DEX disminuya la sensibilidad del endotelio a los efectos tóxicos de la Stx2 o de las citoquinas liberadas en respuesta a Stx2. Más aun, como se explicó anteriormente, los GC pueden actuar en forma directa sobre el tejido renal para mejorar su función, ya sea mejorando el flujo sanguíneo o la filtración glomerular [191]. Es importante destacar que los niveles de dexametasona utilizados en este trabajo son farmacológicos, es decir que poseen propiedades inhibitorias a diversos niveles del sistema inmune [61, 186], por lo tanto no equivalen al nivel producido endógenamente, el cual ha demostrado ejercer protección en forma parcial [8].

Los procesos inflamatorios son en general seguidos por el aumento en el número de neutrófilos circulantes con el propósito de enfrentar al agente inductor de la inflamación [90]. En este trabajo estudiamos el efecto de los GC endógenos sobre la neutrofilia inducida por Stx2. Los resultados que se muestran en la figura 6 revelan que la toxina Shiga y el Ru486 son capaces de aumentar el número de neutrófilos en la periferia pero de manera independiente (fig. 6a y 6c). Juntos (o en combinación) el número de PMN aumentó significativamente, pero no en forma aditiva, como se observa en las figuras 6a y 6c. En este sentido, Whelan CJ y grupo publicaron un trabajo en cobayos donde muestran que la dexametasona *in vivo* (50 mg/kg), es capaz de inhibir la neutrofilia inducida por LPS al ser administrada 1 o 3 horas antes, pero no 24 h antes de la endotoxina. Sin embargo, la administración de Ru486 (200 µg/ratón) no pudo revertir la neutrofilia inducida por el LPS, sugiriendo que las células sensibles a la acción de los GC responden diferencialmente ante dosis farmacológicas de DEX que ante la concentración de GC endógenos circulantes [197]. Coincidentemente con lo visto por este grupo, la inyección ip de Ru486 (600 µg/ratón ip) en nuestro modelo tampoco puede revertir la neutrofilia inducida por Stx2. Por otra parte, Harris JG y grupo, mostraron que el factor activador de plaquetas (PAF) tiene la propiedad de causar neutropenia en ratones a los 2 minutos luego de la inoculación endovenosa de PAF, y luego neutrofilia a las 2 horas. Este aumento en el número de neutrófilos se vio acompañado por el aumento importante de corticosterona en plasma a los 20

minutos luego de la inoculación con PAF. El papel de los GC endógenos en la neutrofilia inducida por PAF fue comprobada por el tratamiento con Ru486 y por adrenalectomía, ya que ambos tratamientos lograron suprimirla. Más aun, la administración de GC sintéticos también indujo neutrofilia intensa, demostrando que la acción de los GC endógenos en la inducción de la neutrofilia es a través de un mecanismo diferente del utilizado por los GC exógenos (tal vez a través del mediador de la acción de GC como la lipocortina-1) [198].

Se sabe que los GC inhiben la acumulación de neutrófilos en el tejido inflamado, pero que también causan un importante aumento en el número de estas células en la circulación, principalmente debido a la transferencia o el pasaje de neutrófilos de reservorios marginales hacia la circulación con una menor contribución por liberación de médula ósea [90]. La neutrofilia transitoria causada por dosis farmacológicas de GC, también se debe a una disminución en la migración desde el espacio intravascular a los compartimentos del tejido [91]. Si bien no es posible explicar acabadamente la complejidad de la cinética de cambio de los PMN en la periferia, estos resultados permiten descartar que la potenciación de la toxicidad observada por ausencia de GC endógenos no se deba a un aumento desproporcionado (aun mayor) en los PMN circulantes.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, nos preguntamos si parte de la protección ejercida por los GC no estaría mediada por la supresión o inhibición de la actividad funcional del PMN. Para responder a esta pregunta analizamos los efectos de la toxina shiga y los GC endógenos sobre la capacidad de respuesta del PMN. Los resultados presentados en esta tesis confirman y extienden datos previos que muestran que los PMN aislados de ratones tratados con Stx2 están activados temprana y profundamente [6]. En efecto, estos datos muestran que la inoculación con Stx2 induce neutrofilia y activa a los neutrófilos aumentando la adhesión ligando dependiente, la migración, la expresión de CD11b, el estrés oxidativo, y la capacidad apoptótica (figuras 6, 7, 8, 9, 10, 12). Por otra parte, pudimos determinar que la ausencia de GC endógenos agudizan los parámetros inflamatorios estudiados, como se vio en la intensificación de la neutrofilia, la adhesión ligando-dependiente, la capacidad migratoria y la producción de IROs (figuras 6, 7, 8 y 10). Los datos obtenidos

sugieren que los GC endógenos regulan negativamente el potencial patogénico de los PMN activados por la Stx2.

Por otra parte, quisimos estudiar el efecto directo que ejercen los GC *in vitro* sobre algunas de las funciones del neutrófilo, para detectar si estas células son directamente sensibles a la acción de los GC y si el aumento en la expresión de R-GC visto en los PMN de animales tratados con Stx2 tenía un correlato funcional. De esta manera pudimos observar que el estado de activación de los PMN se correlaciona con el aumento en la sensibilidad de los PMN a los GC *in vitro*, tal vez como consecuencia del aumento de R-GC en el PMN (figura 4). De hecho, los PMN de ratones tratados con Stx2 son más sensibles a los efectos inhibitorios de la DEX en la producción de IROS, en la expresión de CD11b, y en la apoptosis. De manera similar, los leucocitos mononucleares de pacientes con sepsis o con shock séptico, son más sensibles a la acción antiproliferativa de los GC que las células de controles normales [199].

El daño endotelial y la activación de leucocitos son los componentes principales en el desarrollo de las lesiones microangiopáticas que se ven en los pacientes con SUH [35]. La adhesión al endotelio y la transmigración a través de la membrana basal dependen fuertemente de señales que se disparan por mediadores solubles como las quimioquinas, el perfil de moléculas de adhesión que se expresan en el endotelio [200] y la interacción con las proteínas de matriz extracelular (MEC) [201]. Un ejemplo de esto último son las integrinas de la clase  $\beta_2$  conocidas por mediar la unión general a varias proteínas de la MEC así como a FGN, BSA o a plástico [202]. En este trabajo analizamos la capacidad de los neutrófilos aislados de ratones tratados con Stx2 de adherirse *in vitro* a placas recubiertas con FGN, BSA y CTI. Pudimos observar un aumento significativo en la adhesión a FGN, con y sin estímulo, en PMN aislados a las 72h post tratamiento (figura 7a). El FGN es una proteína importante involucrada en la cascada de coagulación, un proceso que en el SUH se ve aumentado gracias al efecto directo o indirecto de las propiedades procoagulantes de la Stx2 [44]. La injuria endotelial inducida por la toxina shiga y la subsecuente exposición del subendotelio, induce la liberación de factor von Willebrand y fibrinógeno, llevando a la formación de microtrombos en la microvasculatura como se describió anteriormente [44]. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la activación de los PMN y en particular el aumento en

la capacidad adherente a FGN podrían contribuir con la injuria endotelial típica del SUH.

El tratamiento simultáneo de Stx2 y Ru486 no causó modificaciones en la adhesión a FGN basal comparado con Stx2, pero hubo una marcada inhibición luego del estímulo con PMA. Esta observación es coincidente con lo que se vio en la expresión de CD11b, donde el tratamiento Stx2+Ru486 suprimió la expresión de dicha molécula (figura 9). Para poder entender estos resultados necesitamos un estudio más exhaustivo de los mecanismos implicados, por ejemplo: Para poder entender estos resultados necesitamos un estudio más exhaustivo de los mecanismos implicados, por ejemplo: habría que ensayar la adhesión *in vivo* de neutrófilos a pulmón luego del tratamiento con Stx2+Ru486, para ver si este efecto también ocurre en PMN trasvasados. El aumento en la unión a BSA también fue significativo a las 24 h con y sin estímulo y a las 72h post Stx2, solo con PMA (figura 7b). Estos resultados también se correlacionan con el aumento en la expresión en membrana de CD11b (integrina de clase  $\beta_2$ ) observada sobre los neutrófilos (figura 9) y [6].

Contrariamente a lo observado para el FGN, la adhesión a BSA y CTI fue intensificada en el tratamiento simultáneo con Stx2+Ru486 (figura 7 b y c), lo que sugiere que los GC endógenos tendrían la capacidad de inhibir la adhesión a ambos ligandos.

El colágeno tipo I es uno de los componentes principales de la MEC, que promueve la adhesión a una variedad de células modulando muchos procesos biológicos como la proliferación, la diferenciación, la migración y la activación [169]. Los resultados presentados aquí, muestran que los neutrófilos de ratones tratados con Stx2 no difieren en la capacidad de adherencia al CTI del control. Un número de trabajos han encontrado que las integrinas de clase  $\beta_1$  se encuentran involucradas en la unión de neutrófilos activados por PMA a CTI [170], aunque las integrinas de clase  $\beta_2$ , específicamente  $\alpha_L\beta_2$  (CD11a/CD18, LFA-1), también son necesarias para la unión de neutrófilos a CTI y para la transducción de señal [201]. Entonces es posible que la naturaleza promiscua de las integrinas de clase  $\beta_2$  pueden no ser suficientes para regular la adhesión a proteínas de la MEC necesarias para que el PMN migre a través de la membrana basal [202] y probablemente necesite un nivel de activación mayor, como se ve ante la ausencia de GC endógenos (figura 7c, 72h). Los GC ejercen efectos inhibitorios sobre la maquinaria migratoria y la activación endotelial ya sea directamente sobre la expresión de moléculas de adhesión expresadas sobre

el neutrófilo (CD11b, L selectina) o (molécula de adhesión intracelular-1, ICAM-1 y la molécula de adhesión de células endoteliales y plaquetas, PECAM-1) [203], o indirectamente a través de la inhibición de la expresión tanto de la proteína como del ARNm de TNF u otras citoquinas pro inflamatorias [204, 205]. En ausencia de los GC endógenos la activación del neutrófilo o del endotelio inducido por Stx2 no pueden ser regulados y por lo tanto el nivel de activación observado en estas células es mayor.

Los quimioattractantes son conocidos por inducir una respuesta cinética en el leucocito (quimioquinesis) que en presencia de un gradiente de concentración se manifiesta en forma de movimiento direccionado (quimiotaxis). En nuestras condiciones experimentales, la toxina Stx2, *in vivo*, indujo un aumento en la quimioquinesis (frente al medio), y en la quimiotaxis en respuesta al fMLP como estímulo, en PMN aislados a las 72 h post tratamiento. Aunque el Ru486 no mostró ningún efecto *per se* en las propiedades locomotrices de los neutrófilos, la administración simultánea de esta droga con Stx2 aumentó la quimiotaxis y la adelantó en el tiempo, ya que este aumento fue muy significativo en PMN aislados a las 24 h post tratamiento. Estas observaciones sugieren que la ausencia de GC en animales tratados con Stx2, exagera la capacidad locomotriz de los PMN y en consecuencia los GC endógenos podrían estar inhibiendo el movimiento quimiotáctico de PMN activados por la Stx2 como mecanismo adicional para limitar el daño tisular. Actualmente se encuentra bien establecido que la inhibición de la migración por los GC está mediada por la supresión de las moléculas expresadas tanto sobre el neutrófilo como sobre el endotelio activado para dirigir el tráfico. En este sentido se ha publicado que los GC inhiben la expresión de molécula de adhesión intracelular (ICAM-1) y de molécula de adhesión para endotelio y leucocitos (ELAM) sobre el tejido endotelial estimulada por LPS. Esta inhibición puede ser suprimida por Ru486, es decir que la acción de los GC está mediada por los R-GC [206]. Otra forma conocida de suprimir la migración de neutrófilos expuestos a diversos estímulos inflamatorios, es ejerciendo la inhibición sobre la regulación de la expresión de los receptores para quimioquinas y a través de la inhibición de la secreción de IL-8 [207]. Por ejemplo, Leech M y grupo, demostraron que los GC endógenos son capaces de bloquear la migración de neutrófilos sin alterar su función en un modelo de artritis por carragenina en ratas, a través del bloqueo de los R-GC con Ru486 (20 mg/kg o 200 µg/ratón). En este modelo detectaron que la molécula de adhesión

P-selectina es aumentada por el inflamógeno en el líquido sinovial, pero el tratamiento con Ru486 exacerba significativamente dicha expresión (ausente en controles sanos). [86]. Estos hallazgos demostraron que los GC endógenos pueden modular la migración de PMN inducida por un agente inflamógeno, y que esta migración puede estar mediada por la expresión de P-selectina. La proteína inflamatoria de macrófagos-2 (MIP-2), se expresa en células endoteliales, pertenece a subfamilia de quimioquinas del tipo CXC y posee un rol importante en la respuesta inflamatoria mediada por citoquinas. El tratamiento con dexametasona inhibe la expresión endotelial de MIP-2 en respuesta a la estimulación con TNF- $\alpha$  y reduce marcadamente el número de neutrófilos adherentes. Esto demuestra que el TNF- $\alpha$  induce la expresión de MIP-2 en el endotelio y que la acción antiinflamatoria de la DEX podría inhibir la inducción de MIP-2 en células endoteliales activadas por citoquinas [195] Por otra parte, estudios realizados en pacientes con SUH han descripto la existencia de niveles elevados de quimioquinas involucradas en la migración y activación de los neutrófilos, como MIP-2 o el factor estimulador de colonias para granulocitos (G-CSF). El trabajo realizado por Proulx y equipo, informaron que pacientes con SUH en el momento de la admisión (período agudo), poseen concentraciones diez veces mayores de G-CSF y 3 veces mayores de MIP-2 [208]. Con estos antecedentes y los resultados mostrados en esta tesis, es lógico pensar que la inducción de la quimiotaxis por Stx2 puede ser modulada por los GC endógenos.

Uno de los mecanismos más importantes que posee el neutrófilo para producir IROs es a través de la enzima NADPH oxidasa. Esta enzima está compuesta de varias subunidades que en el PMN inactivo se encuentran distribuidas entre el citoplasma y la membrana plasmática. Estímulos inflamatorios diversos (C5a, ácidos grasos, PMA, quimioattractantes, etc) inducen el ensamble de la enzima para producir IROs, pero muchas veces la producción de IROs puede ocurrir sin que se haya completado la activación de la enzima. Este estado se conoce como "primado" (del inglés, priming) donde se produce una condición de hiper-respuesta y donde la estimulación subsiguiente produce la completa activación y acción de la enzima, aumentando entre el 20-50% la producción de IROs [209]. Algunas sustancias inflamatorias como el factor activador de plaquetas (PAF), LPS, TNF- $\alpha$  son efectivos agentes "primantes". De hecho, el primado de los PMN posee gran relevancia en la clínica ya que se ha visto que parte del daño tisular observado

en patologías tales como la falla renal aguda por isquemia y reperfusión, daño pulmonar agudo, sepsis, trauma y pancreatitis aguda entre otros, se debe a la excesiva producción de IROs por los neutrófilos primados que contribuyen al daño a través de un efecto colateral "inocente", en inglés, innocent bystander [111]. En esta tesis estudiamos la producción basal de IROs en PMN aislados de ratones tratados con Stx2 24 y 72 h post inoculación. Los resultados mostrados aquí revelan que no hay producción de IROs *in vitro* en ausencia de estímulo, a pesar de la tendencia ascendente que se puede apreciar a las 24 h (figura 10a). Por otra parte, la incubación con PMA dispara el estallido respiratorio llevándolo a niveles muy superiores. Estos datos nos demuestran que, por lo menos en las condiciones experimentales probadas, estos neutrófilos han visto mediadores *in vivo* que lo primaron. Para entender este punto, será necesario determinar si los agentes primantes mencionados, con probada participación en el desarrollo del SUH, tienen efecto como tales en nuestro modelo. En este sentido, nosotros hemos realizado experimentos donde neutrófilos de adultos normales fueron incubados con el plasma de pacientes con SUH o con plasma de controles sanos, con el objetivo de determinar si factores presentes en el plasma serían responsables por la alteración funcional del neutrófilo. La pre incubación con plasma de controles sanos o de niños con SUH no pudo alterar la expresión de diversos marcadores de activación o de la degranulación del neutrófilo, como la expresión de CD66b (marcador de membrana y de gránulos internos del neutrófilo), como tampoco pudo alterar la producción de IROs inducida por PMA, aunque dichos parámetros se encuentran alterados en los PMN aislados de los pacientes [210]. Teniendo en cuenta estos antecedentes, es posible que la alteración funcional del neutrófilo (hiper-respuesta a PMA) mostrada en este trabajo (figura 10), esté ocurriendo por algún mecanismo aun no descrito (por ejemplo indirectamente alterando la concentración de receptores solubles para factores primantes como el TNF- $\alpha$  o el PAF).

La respuesta opuesta observada en la generación de IROs y en la fagocitosis ha sido informada previamente, donde se han planteado diversas hipótesis. Entre ellas, se plantea que el potencial oxidativo de los neutrófilos se encuentra aumentado luego de la exposición a LPS tanto *in vitro* como durante la endotoxemia experimental y que la fagocitosis se encuentra suprimida probablemente como consecuencia de los efectos tóxicos de los radicales del oxígeno sobre la maquinaria fagocítica [211]. Otros proponen que el disparo de

la respuesta oxidativa promueve la apoptosis de neutrófilos [212], y los neutrófilos que sufren apoptosis pierden su capacidad fagocítica y exhiben menor expresión de CD16 sobre la membrana plasmática [213].

La apoptosis es un mecanismo que contribuye a la resolución de la inflamación aguda, ya que una vez que los PMN son reclutados al sitio de la inflamación, activan su maquinaria microbicida y ponen en marcha la expresión del programa apoptótico. Este programa apoptótico puede ser modificado por diversos agentes liberados por el huésped o el patógeno [68]. En este sentido, muchos de los mediadores producidos durante la inflamación retrasan la apoptosis permitiendo la remoción más efectiva de los microorganismos, pero también favoreciendo al daño tisular por los intermediarios reactivos del oxígeno liberados por los PMN activados al tejido circundante [214]. En nuestro modelo, la Stx2 *in vivo* aumentó el porcentaje de células apoptóticas tardíamente en el proceso de la enfermedad (Figura 12b, 72h). La evaluación más temprana de la apoptosis no presentó diferencias con respecto al control (Figura 12a, 24h). Este resultado sugiere que la activación de la maquinaria apoptótica es un proceso más tardío durante el fenómeno inflamatorio o secundario a la activación de otras señales intra o extracelulares. Esta secuencia tiene un sentido fisiológico ya que la apoptosis es un mecanismo necesario para la resolución del foco inflamatorio pero debe, necesariamente, ocurrir posteriormente al desarrollo de las funciones efectoras del PMN.

Por otra parte, el tratamiento con Ru486 no alteró la sobrevivencia de los PMN tanto en los controles (Ru486) respecto del basal, como en los tratados con Stx2+Ru486 respecto del control con Stx2. Es decir que en este caso, los GC endógenos no estarían participando de la regulación de la apoptosis. Sin embargo, a pesar de esto, está demostrado que la dexametasona *in vitro* inhibe la apoptosis de neutrófilos y que el Ru486 revierte este efecto, estos estudios han sido hechos con neutrófilos aislados de donantes normales, ó con PMN aislados a partir de modelos de inflamación peritoneal [91, 215, 216]. En nuestro modelo, los neutrófilos son aislados de sangre periférica, es decir que no han extravasado al tejido inflamado, y el tratamiento con el antagonista para GC fue realizado *in vivo*. Esta aparente divergencia entre ambos resultados podría nuevamente ser consecuencia de la diferencia entre los efectos fisiológicos de los GC endógenos y los efectos de las dosis farmacológicas de DEX. En este sentido, la incubación de neutrófilos aislados de animales tratados con Stx2 con DEX, inhibió significativamente la apoptosis, mientras

que esta inhibición no se observó en los PMN de animales controles. Por lo tanto, es posible por un lado que la toxina shiga induzca cambios en el neutrófilo que los haga más sensibles a la acción de los GC exógenos, y por el otro que estos efectos antiapoptóticos no puedan ser modulados por concentraciones fisiológicas de GC pero sí con dosis farmacológicas. Diversos autores postulan que los GC regulan la apoptosis actuando directamente sobre el neutrófilo o indirectamente a través de la liberación o expresión de factores antiapoptóticos producidos por las células endoteliales o epiteliales. Efectivamente, existe un gran número de sustancias que retrazan la apoptosis, algunas producidas por el organismo, otras por el patógeno, como G-CSF, IL-1 $\beta$ , PAF, IL-2, IL-6, productos microbianos como el LPS, etc. [217]. Uno de los mecanismos estudiados que tratan de explicar el efecto directo de la DEX sobre la apoptosis del PMN postula que los GC, a través de la activación del R-GC, inhiben la expresión de Fas (uno de los principales receptores de muerte presentes en los leucocitos que estimulan la apoptosis) [216].

Paralelamente a este trabajo, en nuestro laboratorio hemos llevado a cabo estudios en neutrófilos de sangre periférica de pacientes sobre el estado de activación que poseen al momento de presentación en el centro asistencial. Estos niños llegan al hospital cursando la etapa aguda del SUH, caracterizada por anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y falla renal aguda. Todos los pacientes evaluados sufrieron gastroenteritis con diarrea sanguinolenta. Es decir que estos niños llegan al hospital con el SUH ya declarado, sin previas transfusiones ni diálisis peritoneal. A partir de estos estudios encontramos que estos pacientes poseen menor expresión en los marcadores de activación de membrana como CD16, CD11b, CD66b, y menor actividad mieloperoxidasa, producción de IROs y porcentaje de PMN apoptóticos, así como una marcada neutrofilia respecto del control sano [210, 218]. Este estado supuesto de desactivación es, aparentemente, consecuencia de un proceso de activación previo que los dejó exhaustos. En este sentido, es lógico pensar que el estado de activación de los neutrófilos inducidos por Stx encontrado en este trabajo corresponde a la ventana de tiempo que existe entre la ingestión de la bacteria y la declaración de la enfermedad.

Varios autores han mostrado que la toxina shiga *in vitro* puede aumentar el perfil de activación de los PMN, respecto a la adhesión, la trasmigración y la

función [219] [214]. En esta tesis nosotros mostramos de qué manera los neutrófilos son afectados *in vivo* por la toxina shiga. Existen diferencias claras entre los efectos de la toxina shiga *in vitro* e *in vivo* sobre la funcionalidad de los neutrófilos. Los experimentos con Stx2 aplicada *in vitro* analizan los efectos directos de la toxina sobre la función o activación del PMN, los cuales dependen de la presencia de receptores específicos, de su composición lipídica, y de las señales intracelulares que se disparan inmediatamente después de la interacción. Por el contrario, los experimentos realizados con la inyección de la toxina shiga al ratón reflejan el resultado de efectos pleiotrópicos de la Stx2 sobre los distintos tipos celulares y tejidos. Estas diferencias deben tenerse en cuenta para entender las discrepancias que se observan entre los efectos *in vitro* de la toxina shiga sobre la funcionalidad del neutrófilo y los mostrados en el presente trabajo *in vivo*. Por ejemplo, Liu J. y grupo [220] informó que la incubación *in vitro* de neutrófilos normales con Stx inhibe la apoptosis, pero King AJ no encontró diferencias en la apoptosis y necrosis bajo las mismas condiciones experimentales [211]. De manera interesante, y coincidentemente con lo encontrado por nosotros *in vivo* en este trabajo, otros vieron que la Stx induce un aumento en el estallido respiratorio de neutrófilos de donadores normales, pero inhibe en forma dosis dependiente la fagocitosis de bacterias y la respuesta a PMA [211].

Más allá de estas discrepancias o coincidencias, nosotros creemos que la intensificación de la activación de los PMN en la patogénesis no depende necesariamente de los efectos directos de la toxina sobre los neutrófilos, ya que el daño endotelial causado por Stx2 y las citoquinas pro inflamatorias (*TNF- $\alpha$* , *IL-1 $\beta$* ) podrían ser suficientes para activar a los neutrófilos. De manera recíproca, el potencial oxidativo de los neutrófilos podría inducir una retroalimentación positiva en el daño primario del endotelio causado por Stx2. En este sentido, los resultados mostrados en esta tesis muestran que Stx2 *in vivo* induce la generación de IROs desde las 24 horas. En consecuencia planteamos la hipótesis que la Stx2 directa o indirectamente, rompe el equilibrio entre el estado de oxidación y antioxidación. Para esto, analizamos el papel de Stx2 *in vivo* sobre la concentración del mayor antioxidante endógeno, el glutatión (GSH), y el grado de daño tisular por oxidación (peroxidación lipídica). A través de los experimentos detallados en la última sección de esta tesis, demostramos la profunda inhibición que causó Stx2 sobre el contenido de GSH

total en riñón. Por otra parte, la Stx2 aumentó significativamente el grado de peroxidación lipídica renal y en consecuencia el daño tisular por oxidación. Los parámetros detectados junto con el aumento en la generación de IROs por PMN, demuestran que el estrés oxidativo causado por Stx2 ha sobrepasado la capacidad antioxidante endógena.

El glutatión intracelular y extracelular, además de sus características antioxidantes ya descritas en la sección correspondiente de la introducción (pág. ), posee propiedades inhibitorias sobre la apoptosis de células epiteliales de pulmón. La disminución en la concentración de GSH se ha visto por ejemplo, en el fluido que recubre al epitelio en la fibrosis pulmonar idiopática, en el síndrome de distrés respiratorio agudo, fibrosis quística, en pacientes HIV positivos, etc. Esta reducción del GSH puede contribuir con el aumento que se observa en la apoptosis epitelial durante estas enfermedades [221]. Aparentemente, la prevención de la apoptosis epitelial por GSH no estaría mediada por sus propiedades antioxidantes, sino por su función como regulador alostérico de ciertas enzimas que median el proceso apoptótico [221]. Teniendo en cuenta que en el SUH existe un gran nivel de daño epitelial causado por la muerte celular por apoptosis y que la toxina shiga reduce significativamente los niveles intra-renales de GSH total, sería importante estudiar el rol de GSH en la prevención de la apoptosis epitelial renal en el contexto del SUH.

Hasta el momento no existían trabajos que documenten la relevancia del estrés oxidativo ejercido por los PMN activados, directamente sobre el tejido renal o indirectamente a través de la activación del endotelio. A partir de estas observaciones, consideramos necesario evaluar el efecto de antioxidantes exógenos con el fin de encontrar posibles aproximaciones terapéuticas para esta enfermedad. Así, estudiamos el efecto de dos antioxidantes derivados del ajo: N-Acetil-L-cisteína (NAC) y S-Etil-L-Cisteína (ETH). A través de estos ensayos pudimos determinar que los antioxidantes probados protegen parcialmente ante la acción letal de Stx2, ya que mejoran en forma parcial los parámetros oxidativos, la función renal y la sobrevida. Por otra parte, el tratamiento prolongado (t-48h) con ambos agentes logró mejores resultados respecto del protocolo t0. Más aun, el tratamiento con ETH dio mejores resultados que

NAC, evidentes en el índice de sobrevida, en la recuperación de los valores de GSH a ambos tiempos y en la peroxidación lipídica para t-48.

El uso de NAC como antioxidante se encuentra extendido para el tratamiento de patologías tales como la sobredosis por paracetamol [222, 223] en la enfermedad obstructiva crónica pulmonar [224], en hemodiálisis [225] etc. En cuanto a su mecanismo de acción, se sabe que el NAC actúa restaurando los niveles intracelulares de GSH necesarios para la detoxificación de los metabolitos tóxicos [117], y/o secuestrando especies reactivas del oxígeno en forma directa [226]. También son bien conocidos los efectos de protección directa sobre el riñón dado que se ha visto que NAC aumenta la concentración intra-renal de GSH y mejora la injuria causada por isquemia y reperfusión, por la oclusión de la vena cava, por ciclosporina u otros insultos nefrotóxicos [226, 227]. Sus efectos sobre la microvasculatura renal también han sido documentados, por ejemplo Herman SN y grupo han descrito que NAC (i) revierte la vasoconstricción inducida por radiocontraste y angiotensina II o también causada por la inhibición de la prostaglandina renal y la producción de óxido nítrico [226], (ii) mejora la vasodilatación cortical y la filtración glomerular [226]. Otros trabajos dan cuenta del papel protector de NAC sobre la respuesta inflamatoria, donde se vio que: (iii) inhibe la activación de NF- $\kappa$ B y la expresión del mRNA de TNF- $\alpha$  en modelos de artritis [228]; (iv) reduce la activación de PMN inducida por LPS, en parte también por la inhibición de la transcripción dependiente de NF- $\kappa$ B [228]; (v) protege a ratas de una dosis letal de LPS, a través de la disminución de IROs, la secreción de TNF- $\alpha$ , de la proporción entre GSSG y GSH (GSSG/GSH), y los niveles de MDA en leucocitos [229]. Uno o la combinación de algunos de estos efectos podrían estar actuando para frenar parcialmente los efectos deletéreos de la toxina shiga *in vivo*. De todas formas, si pensamos en este compuesto para ser usado en la clínica, debe tenerse en cuenta que de acuerdo a la extrapolación que podríamos hacer a partir del modelo murino, deberíamos suministrarlo antes de que el paciente entre en falla renal aguda, o sea que en forma temprana en la ventana que existe entre la ingesta del alimento contaminado con *E. coli* y la declaración del SUH. Hay que considerar además que en ratón no revirtió la mortalidad al 100% y que por otra parte, en un modelo experimental de falla renal aguda, NAC no dio buenos resultados ya que se vio daño medular por hipoxia, aunque logró disminuir la creatinina en plasma así como los niveles de urea [226].

S-Ethil-L-Cisteina también es un compuesto que contiene cisteína, es hidrofílico y posee propiedades antioxidantes similares a las del NAC. Así como NAC, ETH es efectivo como antioxidante aumentando la protección a través de sus actividades enzimáticas y no enzimáticas, y secuestrando radicales del oxígeno directa o indirectamente [120].

Existen algunas divergencias en la bibliografía sobre las dosis utilizadas y los tiempos de administración, ya que en cada trabajo se adaptan a la patología particular en estudio. En nuestro caso, trabajamos con 100 mg/kg/día (1 mg/ratón/día) por agua de bebida y 175 mg/kg/día (3.5 mg/ratón/día) intraperitonealmente. En el trabajo realizado por Özer Sehirli y grupo, estudian el rol protector de NAC contra el estrés oxidativo durante el daño por isquemia y reperfusión renal, donde utilizan NAC 150 mg/kg en forma subcutánea en ratas, administrado en dos aplicaciones, 15 min antes de la isquemia y luego de la reperfusión renal [175]. Por otro lado, Arfsten DP demostró que dosis de 600 mg/kg/día por 30 días consecutivos en ratas normales no tiene efectos colaterales negativos. De hecho, no detectaron lesiones histológicas o alteraciones en el peso, y vieron un aumento significativo de la concentración de GSH así como en la actividad del mismo (medido por la proporción GSSG/GSH) [117]. Por lo tanto, sería útil ensayar dosis de NAC o ETH superiores a las utilizadas en este trabajo con el fin de lograr mayores índices de sobrevida en el modelo de SUH.

La protección parcial ejercida por los antioxidantes también dan cuenta de la complejidad de los eventos inflamatorios disparados por la toxina shiga *in vivo*. Hay que tener en cuenta que la toxina shiga actúa a través de varios mecanismos, en efecto, Stx2 no solo daña a las células endoteliales de la microvasculatura sino que también al epitelio renal en forma directa a través de la interacción con el Gb<sub>3</sub>, causando la muerte celular por apoptosis. Paralelamente, la entrada de la Stx2 altera al equilibrio del sistema inmune llevándolo hacia la activación de todos los componentes inflamatorios más importantes (activación de PMN, del endotelio a través de la expresión de moléculas de adhesión, secreción de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , etc), y como consecuencia el grado de injuria resultante es profunda, multifactorial y difícil de frenar por una única vía. Por este motivo los antioxidantes utilizados aquí fueron efectivos para suprimir, al menos en parte, algunas de las vías de daño puestas en marcha por la toxina, y como

consecuencia observamos protección parcial. Sin embargo, este grado de protección observado haría pensar que el daño por oxidación tiene suficiente relevancia patofisiológica en la evolución de la enfermedad.

Hasta acá, estos resultados demostraron que el huésped es capaz de montar un mecanismo de defensa contra el potencial tóxico de Stx2, y que este mecanismo está protagonizado por la acción de los GC endógenos sobre la activación de los neutrófilos activados por Stx2. En primer lugar, ratones adrenalectomizados o tratados con Ru486 mostraron un incremento en la sensibilidad a la toxina shiga, la cual es parcialmente restaurada por el tratamiento de GC exógenos [8]. En segundo lugar, este aumento en la sensibilidad a la toxina shiga, en animales que no poseen los efectos de los GC endógenos, no se correlaciona con los cambios observados en la producción sistémica de citoquinas, pero si con la exacerbación en las funciones de los PMN [8]. De estos resultados se desprende que:

- \* los GC endógenos estarían ejerciendo protección parcial contra los efectos nocivos de la toxina,
- \* estos efectos pueden estar contrarrestando la acción patogénica directa de los PMN activados sobre el endotelio.

En conclusión, la toxina shiga rompe la homeostasis del huésped llevando al sistema a un nivel proinflamatorio que contribuye con el daño ejercido Stx2 *per se*. Este estado a su vez despierta a la respuesta antiinflamatoria capaz de frenar al menos en forma parcial el grado de injuria generado por el potencial inflamatorio. Este efecto es logrado principalmente por la capacidad de los GC endógenos para inhibir la activación y la función de los neutrófilos (ya sea en forma directa sobre la célula o indirectamente a través de la modulación de la actividad endotelial). Por otra parte, la toxina o la respuesta inflamatoria disparada por la misma también generan un desequilibrio oxidativo, donde el estrés por oxidación supera a la capacidad endógena antioxidante y por lo tanto contribuye en parte con el daño tisular.

Con el fin de hallar alguna solución terapéutica a esta enfermedad, analizamos el papel de sustancias exógenas que puedan revertir o atenuar los efectos tóxicos inducidos por la toxina shiga. En este sentido, los agentes antiinflamatorios exógenos, como la dexametasona, podría llegar a controlar el

potencial inflamatorio inducido por Stx2 teniendo en cuenta de que la administración debería realizarse tempranamente. Aunque esta droga ya ha sido probada en pacientes sin buenos resultados, hay que tener en cuenta que fue suministrada a pacientes con el SUH ya declarado, y de acuerdo a la extrapolación que podríamos hacer a partir del modelo murino, inferimos que este tratamiento fue probado en una etapa tardía en el desarrollo de la enfermedad, donde vimos nuevamente en el modelo murino, que era contraproducente [230]. Por otro lado, el estrés oxidativo puede ser frenado en parte, por agentes antioxidantes (ETH y NAC). Para ambos tipos de sustancias, es importante resaltar que el efecto protector fue hallado a tiempos tempranos, pudiendo ser aplicadas dentro de la ventana de tiempo que existe entre la ingesta de la bacteria y la declaración de la enfermedad. Este período acotado de tiempo representa la mejor oportunidad para intervenir y frenar la evolución de la infección. Por lo tanto sería importante profundizar el estudio de las mismas para analizar el rol terapéutico teniendo en cuenta que son seguras en dosis altas y aceptadas en la clínica médica.

Autor: Lic. Sonia Alejandra Gómez

Director: Dra. Marina Sandra Palermo

## Bibliografía

1. Kaneko, K., et al., *Apoptosis of renal tubular cells in Shiga-toxin-mediated hemolytic uremic syndrome*. Nephron, 2001. **87**(2): p. 182-5.
2. Remuzzi, G. and P. Ruggenenti, *The hemolytic uremic syndrome*. Kidney Int Suppl, 1998. **66**: p. S54-7.
3. Louise, C.B. and T.G. Obrig, *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**(4): p. 1536-43.
4. van de Kar, N.C., et al., *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**(11): p. 2755-64.
5. van Setten, P.A., et al., *Effects of TNF alpha on verocytotoxin cytotoxicity in purified human glomerular microvascular endothelial cells*. Kidney Int, 1997. **51**(4): p. 1245-56.
6. Fernandez, G.C., et al., *Shiga toxin-2 induces neutrophilia and neutrophil activation in a murine model of hemolytic uremic syndrome*. Clin Immunol, 2000. **95**(3): p. 227-34.
7. Palermo, M., et al., *Pretreatment of mice with lipopolysaccharide (LPS) or IL-1beta exerts dose-dependent opposite effects on Shiga toxin-2 lethality*. Clin Exp Immunol, 2000. **119**(1): p. 77-83.
8. Gomez, S.A., et al., *Endogenous glucocorticoids attenuate Shiga toxin-2-induced toxicity in a mouse model of haemolytic uraemic syndrome*. Clin Exp Immunol, 2003. **131**(2): p. 217-24.
9. Remuzzi, G. and P. Ruggenenti, *The hemolytic uremic syndrome*. Kidney Int, 1995. **48**(1): p. 2-19.
10. Karmali, M.A., et al., *Sensitive method for detecting low numbers of verotoxin-producing Escherichia coli in mixed cultures by use of colony sweeps and polymyxin extraction of verotoxin*. J Clin Microbiol, 1985. **22**(4): p. 614-9.
11. Gordjani, N., et al., *Hemolytic uremic syndromes in childhood*. Semin Thromb Hemost, 1997. **23**(3): p. 281-93.
12. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) ANLIS, M.y.e.M.d.S.d.I.N.A., *El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) y la Escherichia coli enterohemorrágica (ECEH)*. 2001.
13. Wray C., L.P.R., I.M. McLaren and MJ Woodward., *Verocytotoxin Escherichia coli from animals, their incidence and detection.*, in *Recent advances in verocytotoxin-producing Escherichia coli infections.*, K.M.a.G. AG, Editor. 1994, Elsevier Science BV: Amsterdam. p. 69-72.
14. Tarr, P.I., C.A. Gordon, and W.L. Chandler, *Shiga-toxin-producing Escherichia coli and haemolytic uraemic syndrome*. Lancet, 2005. **365**(9464): p. 1073-86.
15. Robins-Browne, R.M., *Enterohaemorrhagic Escherichia coli: an emerging food-borne pathogen with serious consequences*. Med J Aust, 1995. **162**(10): p. 511-2.
16. Exeni, R., et al., *Síndrome Urémico Hemolítico*. Arch Arg Pediatr, 1994. **27**: p. 222.
17. Tesh, V.L. and A.D. O'Brien, *The pathogenic mechanisms of Shiga toxin and the Shiga-like toxins*. Mol Microbiol, 1991. **5**(8): p. 1817-22.

18. Paton, J.C. and A.W. Paton, *Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing Escherichia coli infections*. Clin Microbiol Rev, 1998. **11**(3): p. 450-79.
19. Fraser, M.E., et al., *Structure of shiga toxin type 2 (Stx2) from Escherichia coli O157:H7*. J Biol Chem, 2004. **279**(26): p. 27511-7.
20. Kleanthous, H., et al., *Haemolytic uraemic syndromes in the British Isles, 1985-8: association with verocytotoxin producing Escherichia coli. Part 2: Microbiological aspects*. Arch Dis Child, 1990. **65**(7): p. 722-7.
21. Ostroff, S.M., et al., *Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic sequelae in Escherichia coli O157:H7 infections*. J Infect Dis, 1989. **160**(6): p. 994-8.
22. Louise, C.B. and T.G. Obrig, *Specific interaction of Escherichia coli O157:H7-derived Shiga-like toxin II with human renal endothelial cells*. J Infect Dis, 1995. **172**(5): p. 1397-401.
23. Karch, H., *The role of virulence factors in enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC)--associated hemolytic-uremic syndrome*. Semin Thromb Hemost, 2001. **27**(3): p. 207-13.
24. Lingwood, C.A., *Role of verotoxin receptors in pathogenesis*. Trends Microbiol, 1996. **4**(4): p. 147-53.
25. Watanabe, M., et al., *Oral therapeutic agents with highly clustered globotriose for treatment of Shiga toxigenic Escherichia coli infections*. J Infect Dis, 2004. **189**(3): p. 360-8.
26. Arbus, G.S., *Association of verotoxin-producing E. coli and verotoxin with hemolytic uremic syndrome*. Kidney Int Suppl, 1997. **58**: p. S91-6.
27. Siegler, R.L., et al., *Response to Shiga toxin 1 and 2 in a baboon model of hemolytic uremic syndrome*. Pediatr Nephrol, 2003. **18**(2): p. 92-6.
28. Sandvig, K. and B. van Deurs, *Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin*. Physiol Rev, 1996. **76**(4): p. 949-66.
29. Sandvig, K., et al., *Retrograde transport of endocytosed Shiga toxin to the endoplasmic reticulum*. Nature, 1992. **358**(6386): p. 510-2.
30. Sandvig, K., et al., *Endocytosis from coated pits of Shiga toxin: a glycolipid-binding protein from Shigella dysenteriae 1*. J Cell Biol, 1989. **108**(4): p. 1331-43.
31. Garred, O., B. van Deurs, and K. Sandvig, *Furin-induced cleavage and activation of Shiga toxin*. J Biol Chem, 1995. **270**(18): p. 10817-21.
32. Endo, Y., et al., *Site of action of a Vero toxin (VT2) from Escherichia coli O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of the toxins*. Eur J Biochem, 1988. **171**(1-2): p. 45-50.
33. Skinner, L.M. and M.P. Jackson, *Investigation of ribosome binding by the Shiga toxin A1 subunit, using competition and site-directed mutagenesis*. J Bacteriol, 1997. **179**(4): p. 1368-74.
34. Phillips, A.D., et al., *Enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7 target Peyer's patches in humans and cause attaching/effacing lesions in both human and bovine intestine*. Gut, 2000. **47**(3): p. 377-81.
35. Proulx, F., E.G. Seidman, and D. Karpman, *Pathogenesis of shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome*. Pediatr Res, 2001. **50**(2): p. 163-71.
36. Paton, A.W., P.A. Manning, and J.C. Paton, *Increased oral virulence of Escherichia coli expressing a variant Shiga-like toxin type II operon is associated with both A subunit residues Met4 and Gly102*. Microb Pathog, 1995. **19**(3): p. 185-91.

37. Stevens, M.P., et al., *Efa1 influences colonization of the bovine intestine by shiga toxin-producing Escherichia coli serotypes O5 and O111*. Infect Immun, 2002. **70**(9): p. 5158-66.
38. Acheson, D.W., et al., *Translocation of Shiga toxin across polarized intestinal cells in tissue culture*. Infect Immun, 1996. **64**(8): p. 3294-300.
39. Hurley, B.P., et al., *Shiga toxins 1 and 2 translocate differently across polarized intestinal epithelial cells*. Infect Immun, 1999. **67**(12): p. 6670-7.
40. Thorpe, C.M., et al., *Shiga toxins stimulate secretion of interleukin-8 from intestinal epithelial cells*. Infect Immun, 1999. **67**(11): p. 5985-93.
41. Thorpe, C.M., et al., *Shiga toxins induce, superinduce, and stabilize a variety of C-X-C chemokine mRNAs in intestinal epithelial cells, resulting in increased chemokine expression*. Infect Immun, 2001. **69**(10): p. 6140-7.
42. Ramegowda, B., J.E. Samuel, and V.L. Tesh, *Interaction of Shiga toxins with human brain microvascular endothelial cells: cytokines as sensitizing agents*. J Infect Dis, 1999. **180**(4): p. 1205-13.
43. Eisenhauer, P.B., et al., *Tumor necrosis factor alpha increases human cerebral endothelial cell Gb3 and sensitivity to Shiga toxin*. Infect Immun, 2001. **69**(3): p. 1889-94.
44. Karpman, D., et al., *Platelet activation by Shiga toxin and circulatory factors as a pathogenetic mechanism in the hemolytic uremic syndrome*. Blood, 2001. **97**(10): p. 3100-8.
45. Dran, G.I., et al., *Protective role of nitric oxide in mice with Shiga toxin-induced hemolytic uremic syndrome*. Kidney Int, 2002. **62**(4): p. 1338-48.
46. Proesmans, W., *The role of coagulation and fibrinolysis in the pathogenesis of diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome*. Semin Thromb Hemost, 2001. **27**(3): p. 201-5.
47. Richardson, S.E., et al., *The histopathology of the hemolytic uremic syndrome associated with verocytotoxin-producing Escherichia coli infections*. Hum Pathol, 1988. **19**(9): p. 1102-8.
48. Kaplan, B.S., T.G. Cleary, and T.G. Obrig, *Recent advances in understanding the pathogenesis of the hemolytic uremic syndromes*. Pediatr Nephrol, 1990. **4**(3): p. 276-83.
49. Litalien, C., et al., *Circulating inflammatory cytokine levels in hemolytic uremic syndrome*. Pediatr Nephrol, 1999. **13**(9): p. 840-5.
50. Khoan, D., et al. *Possible cytokine-mediated autocrine and paracrine regulation of SLT-1 cytotoxicity in human glomerular and tubular cells*. in *3rd International Symposium and workshop on Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing Escherichia coli infections*. 1997. Melville, New York.
51. Fitzpatrick, M.M., et al., *Interleukin-8 and polymorphonuclear leukocyte activation in hemolytic uremic syndrome of childhood*. Kidney Int, 1992. **42**(4): p. 951-6.
52. Bitzan, M., et al., *High incidence of serum antibodies to Escherichia coli O157 lipopolysaccharide in children with hemolytic-uremic syndrome*. J Pediatr, 1991. **119**(3): p. 380-5.
53. Barrett, T.J., M.E. Potter, and I.K. Wachsmuth, *Bacterial endotoxin both enhances and inhibits the toxicity of Shiga-like toxin II in rabbits and mice*. Infect Immun, 1989. **57**(11): p. 3434-7.
54. Harel, Y., et al., *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**(5): p. 2110-6.

55. Taylor, F.B., Jr., et al., *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**(4): p. 1285-99.
56. Hughes, A.K., P.K. Stricklett, and D.E. Kohan, *Shiga toxin-1 regulation of cytokine production by human proximal tubule cells*. Kidney Int, 1998. **54**(4): p. 1093-106.
57. Karpman, D., et al., *Apoptosis of renal cortical cells in the hemolytic-uremic syndrome: in vivo and in vitro studies*. Infect Immun, 1998. **66**(2): p. 636-44.
58. Louise, C.B. and T.G. Obrig, *Shiga toxin-associated hemolytic-uremic syndrome: combined cytotoxic effects of Shiga toxin, interleukin-1 beta, and tumor necrosis factor alpha on human vascular endothelial cells in vitro*. Infect Immun, 1991. **59**(11): p. 4173-9.
59. Morigi, M., et al., *Verotoxin-1 promotes leukocyte adhesion to cultured endothelial cells under physiologic flow conditions*. Blood, 1995. **86**(12): p. 4553-8.
60. Janeway Charles A., T.P., Walport Mark, Capra Donald J., *Immunobiology. The immune system in health and disease*. Fourth ed, ed. P.a.L.E. Austin. 1999, London: Current Biology Publications, Elsevier Science London. 635.
61. Yazawa, H., et al., *Glucocorticoid hormone suppression of human neutrophil-mediated tumor cell cytostasis*. Int J Cancer, 1999. **81**(1): p. 74-80.
62. Betsuyaku, T., et al., *A functional granulocyte colony-stimulating factor receptor is required for normal chemoattractant-induced neutrophil activation*. J Clin Invest, 1999. **103**(6): p. 825-32.
63. Torsteinsdottir, I., et al., *Enhanced expression of integrins and CD66b on peripheral blood neutrophils and eosinophils in patients with rheumatoid arthritis, and the effect of glucocorticoids*. Scand J Immunol, 1999. **50**(4): p. 433-9.
64. Morzycki, W. and A.C. Issekutz, *Tumour necrosis factor-alpha but not interleukin-1 induces polymorphonuclear leucocyte migration through fibroblast layers by a fibroblast-dependent mechanism*. Immunology, 1991. **74**(1): p. 107-13.
65. Werr, J., et al., *Integrin alpha(2)beta(1) (VLA-2) is a principal receptor used by neutrophils for locomotion in extravascular tissue*. Blood, 2000. **95**(5): p. 1804-9.
66. Zhao, T., et al., *The molecular basis for adhesion-mediated suppression of reactive oxygen species generation by human neutrophils*. J Clin Invest, 2003. **112**(11): p. 1732-40.
67. Whyte, M.K., et al., *Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis*. J Immunol, 1993. **150**(11): p. 5124-34.
68. Salamone, G., et al., *Promotion of neutrophil apoptosis by TNF-alpha*. J Immunol, 2001. **166**(5): p. 3476-83.
69. Watson, R.W., et al., *Neutrophil apoptosis is modulated by endothelial transmigration and adhesion molecule engagement*. J Immunol, 1997. **158**(2): p. 945-53.
70. Squier, M.K., et al., *Calpain and calpastatin regulate neutrophil apoptosis*. J Cell Physiol, 1999. **178**(3): p. 311-9.
71. Walters, M.D., et al., *The polymorphonuclear leucocyte count in childhood haemolytic uraemic syndrome*. Pediatr Nephrol, 1989. **3**(2): p. 130-4.

72. Milford, D.V., et al., *Haemolytic uraemic syndromes in the British Isles 1985-8: association with verocytotoxin producing Escherichia coli. Part 1: Clinical and epidemiological aspects.* Arch Dis Child, 1990. **65**(7): p. 716-21.
73. Coad, N.A., et al., *Changes in the postenteropathic form of the hemolytic uremic syndrome in children.* Clin Nephrol, 1991. **35**(1): p. 10-6.
74. Forsyth, K.D., et al., *Neutrophil-mediated endothelial injury in haemolytic uraemic syndrome.* Lancet, 1989. **2**(8660): p. 411-4.
75. Chrousos, G.P., *The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation.* N Engl J Med, 1995. **332**(20): p. 1351-62.
76. Whitnall, M.H., *Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system.* Prog Neurobiol, 1993. **40**(5): p. 573-629.
77. Jacobson, L. and R. Sapolsky, *The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis.* Endocr Rev, 1991. **12**(2): p. 118-34.
78. Tilders, F.J., et al., *Activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis by bacterial endotoxins: routes and intermediate signals.* Psychoneuroendocrinology, 1994. **19**(2): p. 209-32.
79. Besedovsky, H.O. and A. del Rey, *Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses.* Endocr Rev, 1996. **17**(1): p. 64-102.
80. Heinrich, P.C., J.V. Castell, and T. Andus, *Interleukin-6 and the acute phase response.* Biochem J, 1990. **265**(3): p. 621-36.
81. Schobitz, B., et al., *Corticosterone modulates interleukin-evoked fever in the rat.* Neuroendocrinology, 1994. **59**(4): p. 387-95.
82. Ramachandra, R.N., A.H. Schon, and I. Berczi, *Neuro-hormonal host defence in endotoxin shock.* Brain Behav Immun, 1992. **6**(2): p. 157-69.
83. Morrow, L.E., et al., *Glucocorticoids alter fever and IL-6 responses to psychological stress and to lipopolysaccharide.* Am J Physiol, 1993. **264**(5 Pt 2): p. R1010-6.
84. Munck, A., P.M. Guyre, and N.J. Holbrook, *Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions.* Endocr Rev, 1984. **5**(1): p. 25-44.
85. Cox, G., *Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes.* J Immunol, 1995. **154**(9): p. 4719-25.
86. Leech, M., et al., *Endogenous glucocorticoids modulate neutrophil migration and synovial P-selectin but not neutrophil phagocytic or oxidative function in experimental arthritis.* Clin Exp Immunol, 1998. **112**(3): p. 383-8.
87. Beutler, B., et al., *Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: mechanisms of endotoxin resistance.* Science, 1986. **232**(4753): p. 977-80.
88. Daynes, R.A. and B.A. Araneo, *Contrasting effects of glucocorticoids on the capacity of T cells to produce the growth factors interleukin 2 and interleukin 4.* Eur J Immunol, 1989. **19**(12): p. 2319-25.
89. Strausbaugh, H.J. and S.D. Rosen, *A potential role for annexin 1 as a physiologic mediator of glucocorticoid-induced L-selectin shedding from myeloid cells.* J Immunol, 2001. **166**(10): p. 6294-300.
90. Nakagawa, M., et al., *Glucocorticoid-induced granulocytosis: contribution of marrow release and demargination of intravascular granulocytes.* Circulation, 1998. **98**(21): p. 2307-13.
91. Liles, W.C., D.C. Dale, and S.J. Klebanoff, *Glucocorticoids inhibit apoptosis of human neutrophils.* Blood, 1995. **86**(8): p. 3181-8.

92. Schleimer, R.P., et al., *An assessment of the effects of glucocorticoids on degranulation, chemotaxis, binding to vascular endothelium and formation of leukotriene B4 by purified human neutrophils*. J Pharmacol Exp Ther, 1989. **250**(2): p. 598-605.
93. Schleimer, R.P., H.N. Claman, and A. Oronsky, *Anti-inflammatory Steroid Action, Basic and Clinical Aspects*. 1989, San Diego: Academic Press.
94. McEwen, B.S., et al., *The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions*. Brain Res Brain Res Rev, 1997. **23**(1-2): p. 79-133.
95. Miller A.H., S.R.L., Stein M., McEwen BS, *Adrenal steroid receptor binding in spleen and thymus after stress or dexamethasone*. Am J Physiol, 1990. **259**: p. E405-E412.
96. Smith, D.F. and D.O. Toft, *Steroid receptors and their associated proteins*. Mol Endocrinol, 1993. **7**(1): p. 4-11.
97. Pratt, W.B., *The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor*. J Biol Chem, 1993. **268**(29): p. 21455-8.
98. Bodwell, J.E., et al., *Identification of phosphorylated sites in the mouse glucocorticoid receptor*. J Biol Chem, 1991. **266**(12): p. 7549-55.
99. Picard, D. and K.R. Yamamoto, *Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor*. Embo J, 1987. **6**(11): p. 3333-40.
100. Kam, J.C., et al., *Combination IL-2 and IL-4 reduces glucocorticoid receptor-binding affinity and T cell response to glucocorticoids*. J Immunol, 1993. **151**(7): p. 3460-6.
101. Spahn, J.D., et al., *A novel action of IL-13: induction of diminished monocyte glucocorticoid receptor-binding affinity*. J Immunol, 1996. **157**(6): p. 2654-9.
102. Mastrangelo, D. and C. Lore, *"Back stage" view on "hereditary" cancer in ophthalmology: the retinoblastoma paradigm*. Med Sci Monit, 2005. **11**(6): p. LE3-4.
103. Liu, L.Y., et al., *Changes of pulmonary glucocorticoid receptor and phospholipase A2 in sheep with acute lung injury after high dose endotoxin infusion*. Am Rev Respir Dis, 1993. **148**(4 Pt 1): p. 878-81.
104. Verheggen, M.M., et al., *Modulation of glucocorticoid receptor expression in human bronchial epithelial cell lines by IL-1 beta, TNF-alpha and LPS*. Eur Respir J, 1996. **9**(10): p. 2036-43.
105. Stith, R.D. and R.E. McCallum, *Down regulation of hepatic glucocorticoid receptors after endotoxin treatment*. Infect Immun, 1983. **40**(2): p. 613-21.
106. Baulieu, E.E., *RU486 (an anti-steroid hormone) receptor structure and heat shock protein mol. wt 90,000 (hsp 90)*. Hum Reprod, 1988. **3**(4): p. 541-7.
107. Mao, J., W. Regelson, and M. Kalimi, *Molecular mechanism of RU 486 action: a review*. Mol Cell Biochem, 1992. **109**(1): p. 1-8.
108. Mahajan, D.K. and S.N. London, *Mifepristone (RU486): a review*. Fertil Steril, 1997. **68**(6): p. 967-76.
109. Dong, Y., et al., *The mechanism of cAMP-induced glucocorticoid receptor expression. Correlation to cellular glucocorticoid response*. J Biol Chem, 1989. **264**(23): p. 13679-83.
110. Hoidal, J.R., *Reactive oxygen species and cell signaling*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001. **25**(6): p. 661-3.

111. Brown, G.E., et al., *Distinct ligand-dependent roles for p38 MAPK in priming and activation of the neutrophil NADPH oxidase*. J Biol Chem, 2004. **279**(26): p. 27059-68.
112. Victor, V.M., M. Rocha, and M. De la Fuente, *Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis*. Int Immunopharmacol, 2004. **4**(3): p. 327-47.
113. Fridovich, *The Biology of Oxygen Radicals: General concepts*. Upjohn symposium, 1987: p. 1-5.
114. Li, H., Z.M. Marshall, and A.R. Whorton, *Stimulation of cystine uptake by nitric oxide: regulation of endothelial cell glutathione levels*. Am J Physiol, 1999. **276**(4 Pt 1): p. C803-11.
115. Deneke, S.M. and B.L. Fanburg, *Regulation of cellular glutathione*. Am J Physiol, 1989. **257**(4 Pt 1): p. L163-73.
116. Ho, E., G. Chen, and T.M. Bray, *Supplementation of N-acetylcysteine inhibits NFkappaB activation and protects against alloxan-induced diabetes in CD-1 mice*. Faseb J, 1999. **13**(13): p. 1845-54.
117. Arfsten, D., et al., *Impact of 30-day oral dosing with N-acetyl-L-cysteine on Sprague-Dawley rat physiology*. Int J Toxicol, 2004. **23**(4): p. 239-47.
118. Benrahmoune, M., P. Therond, and Z. Abedinzadeh, *The reaction of superoxide radical with N-acetylcysteine*. Free Radic Biol Med, 2000. **29**(8): p. 775-82.
119. Caglikulekci, M., et al., *The effect of N-acetylcysteine (NAC) on liver and renal tissue inducible nitric oxide synthase (iNOS) and tissue lipid peroxidation in obstructive jaundice stimulated by lipopolysaccharide (LPS)*. Pharmacol Res, 2004. **49**(3): p. 227-38.
120. Hsu, C.C., et al., *Five cysteine-containing compounds have antioxidative activity in Balb/cA mice*. J Nutr, 2004. **134**(1): p. 149-52.
121. Agarwal, R. and S.D. Chase, *Rapid, fluorimetric-liquid chromatographic determination of malondialdehyde in biological samples*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2002. **775**(1): p. 121-6.
122. Facorro, G., et al., *Oxidative stress and membrane fluidity in erythrocytes from patients with hemolytic uremic syndrome*. Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam, 1997. **47**(3): p. 137-46.
123. Balashova, T.S., et al., *[Hemolytic uremic syndrome as a clinical manifestation of oxidative stress]*. Vestn Ross Akad Med Nauk, 1996(9): p. 20-3.
124. Turi, S., et al., *Oxidative damage of red blood cells in haemolytic uraemic syndrome*. Pediatr Nephrol, 1994. **8**(1): p. 26-9.
125. Li Volti, S., et al., *Impaired antioxidant defense mechanisms in two children with hemolytic-uremic syndrome*. Ren Fail, 1993. **15**(4): p. 523-8.
126. Fernández, G., et al., *Nuevos avances en el estudio de los mecanismos fisiopatogénicos de la forma típica del síndrome urémico hemolítico (D+SUH). La respuesta inflamatoria*. Arch Latin Nefr Ped, 2004. **4**(3): p. 130-142.
127. Grif, K., et al., *Strain-specific differences in the amount of Shiga toxin released from enterohemorrhagic Escherichia coli O157 following exposure to subinhibitory concentrations of antimicrobial agents*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1998. **17**(11): p. 761-6.
128. Kimmitt, P.T., C.R. Harwood, and M.R. Barer, *Toxin gene expression by shiga toxin-producing Escherichia coli: the role of antibiotics and the bacterial SOS response*. Emerg Infect Dis, 2000. **6**(5): p. 458-65.
129. Bell, B.P., et al., *Predictors of hemolytic uremic syndrome in children during a large outbreak of Escherichia coli O157:H7 infections*. Pediatrics, 1997. **100**(1): p. E12.

130. Cimolai, N., B.J. Morrison, and J.E. Carter, *Risk factors for the central nervous system manifestations of gastroenteritis-associated hemolytic-uremic syndrome*. Pediatrics, 1992. **90**(4): p. 616-21.
131. Murray, M.D. and D.C. Brater, *Renal toxicity of the nonsteroidal anti-inflammatory drugs*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1993. **33**: p. 435-65.
132. Armstrong, G.D., 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**(4): p. 1042-5.
133. Takeda, T., et al., *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**(4): p. 331-7.
134. MacConnachie AA, T.W., *Potential therapeutic agents for the prevention and treatment of haemolytic uraemic syndrome in shiga toxin producing Escherichia coli infection*. Curr Opin Infect Dis, 2004. **17**(5): p. 479-482.
135. Trachtman, H., Cnaan A, Christen E, Gibbs K, Zhao S, Acheson DW, Weiss R, Kaskel FJ, Spitzer A, Hirschman GH; Investigators of the HUS-SYNSORB Pk Multicenter Clinical Trial, *Effect of an oral Shiga toxin-binding agent on diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome in children: a randomized controlled trial*. JAMA, 2003. **290**(10): p. 1379-1381.
136. Takeda T, Y.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**(4): p. 331-337.
137. Paton, A.W., R. Morona, and J.C. Paton, *A new biological agent for treatment of Shiga toxigenic Escherichia coli infections and dysentery in humans*. Nat Med, 2000. **6**(3): p. 265-70.
138. Nishikawa, K., et al., *A therapeutic agent with oriented carbohydrates for treatment of infections by Shiga toxin-producing Escherichia coli O157:H7*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(11): p. 7669-74.
139. Karmali, M.A., *Prospects for preventing serious systemic toxemic complications of Shiga toxin-producing Escherichia coli infections using Shiga toxin receptor analogues*. J Infect Dis, 2004. **189**(3): p. 355-9.
140. Donohue-Rolfe, A., et al., *Antibody-based protection of gnotobiotic piglets infected with Escherichia coli O157:H7 against systemic complications associated with Shiga toxin 2*. Infect Immun, 1999. **67**(7): p. 3645-8.
141. Matisse, I., et al., *Intervention with Shiga toxin (Stx) antibody after infection by Stx-producing Escherichia coli*. J Infect Dis, 2001. **183**(2): p. 347-350.
142. Fukuda, T., et al., *Induction of protection against oral infection with cytotoxin-producing Escherichia coli O157:H7 in mice by shiga-like toxin-liposome conjugate*. Int Arch Allergy Immunol, 1998. **116**(4): p. 313-7.
143. Naito, S., et al., *Protection against verocytotoxin in mice induced by liposome-coupled verocytotoxin*. Int Arch Allergy Immunol, 1997. **114**(3): p. 293-7.
144. Capozzo, A.V., et al., *Development of DNA vaccines against hemolytic-uremic syndrome in a murine model*. Infect Immun, 2003. **71**(7): p. 3971-8.
145. Mobassaleh, M., et al., *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**(5): p. 1023-31.

146. Mobassaleh, M., et al., *Developmentally regulated Gb3 galactosyltransferase and alpha-galactosidase determine Shiga toxin receptors in intestine*. Am J Physiol, 1994. **267**(4 Pt 1): p. G618-24.
147. Richardson, S.E., et al., *Experimental verocytotoxemia in rabbits*. Infect Immun, 1992. **60**(10): p. 4154-67.
148. Zoja, C., et al., *Verotoxin glycolipid receptors determine the localization of microangiopathic process in rabbits given verotoxin-1*. J Lab Clin Med, 1992. **120**(2): p. 229-38.
149. Fujii, J., et al., *Direct evidence of neuron impairment by oral infection with verotoxin-producing Escherichia coli O157:H- in mitomycin-treated mice*. Infect Immun, 1994. **62**(8): p. 3447-53.
150. Fujii, J., et al., *Magnetic resonance imaging and histopathological study of brain lesions in rabbits given intravenous verotoxin 2*. Infect Immun, 1996. **64**(12): p. 5053-60.
151. Dean-Nystrom, E.A., et al., *Pathogenicity of Escherichia coli O157:H7 in the intestines of neonatal calves*. Infect Immun, 1997. **65**(5): p. 1842-8.
152. MacLeod, D.L., C.L. Gyles, and B.P. Wilcock, *Reproduction of edema disease of swine with purified Shiga-like toxin- II variant*. Vet Pathol, 1991. **28**(1): p. 66-73.
153. Bertschinger, H.U. and J. Pohlenz, *Bacterial colonization and morphology of the intestine in porcine Escherichia coli enterotoxemia (edema disease)*. Vet Pathol, 1983. **20**(1): p. 99-110.
154. Smith, H.W. and S. Halls, *The production of oedema disease and diarrhoea in weaned pigs by the oral administration of Escherichia coli: factors that influence the course of the experimental disease*. J Med Microbiol, 1968. **1**(1): p. 45-59.
155. Kausche, F.M., et al., *An experimental model for subclinical edema disease (Escherichia coli enterotoxemia) manifest as vascular necrosis in pigs*. Am J Vet Res, 1992. **53**(3): p. 281-7.
156. Kurtz, H.J., M.E. Bergeland, and D.M. Barnes, *Pathologic changes in edema disease of swine*. Am J Vet Res, 1969. **30**(5): p. 791-806.
157. Hertzke, D.M., et al., *Glomerular ultrastructural lesions of idiopathic cutaneous and renal glomerular vasculopathy of greyhounds*. Vet Pathol, 1995. **32**(5): p. 451-9.
158. Karpman, D., et al., *The role of lipopolysaccharide and Shiga-like toxin in a mouse model of Escherichia coli O157:H7 infection*. J Infect Dis, 1997. **175**(3): p. 611-20.
159. Karmali, M.A., et al., *The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing Escherichia coli*. J Infect Dis, 1985. **151**(5): p. 775-82.
160. Sheridan, P.L., R.M. Evans, and K.B. Horwitz, *Phosphotryptic peptide analysis of human progesterone receptor. New phosphorylated sites formed in nuclei after hormone treatment*. J Biol Chem, 1989. **264**(11): p. 6520-8.
161. Shiau, M.Y., et al., *Establishment of a consistent L929 bioassay system for TNF-alpha quantitation to evaluate the effect of lipopolysaccharide, phytomitogens and cytodifferentiation agents on cytotoxicity of TNF-alpha secreted by adherent human mononuclear cells*. Mediators Inflamm, 2001. **10**(4): p. 199-208.
162. Coligan J, K.A., Margulies D, Shevach E, Warren S, *In vitro assays for mouse lymphocyte function*, in *Current protocols in immunology.*, K.A. Coligan J,

- Margulies D, Shevach E, Warren S, Editor. 1994, John Wiley & Sons Inc. p. 3.20.3-3.20.4.
163. Garnotel, R., et al., *The binding of type I collagen to lymphocyte function-associated antigen (LFA) 1 integrin triggers the respiratory burst of human polymorphonuclear neutrophils. Role of calcium signaling and tyrosine phosphorylation of LFA 1.* J Biol Chem, 1995. **270**(46): p. 27495-503.
  164. Nicoletti, I., et al., *A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry.* J Immunol Methods, 1991. **139**(2): p. 271-9.
  165. Turpin, S., et al., *A physiologic approach to renal scintigraphy. Application to evaluation of hypertension.* Clin Nucl Med, 1995. **20**(3): p. 206-10.
  166. Knapp, W., H. Strobl, and O. Majdic, *Flow cytometric analysis of cell-surface and intracellular antigens in leukemia diagnosis.* Cytometry, 1994. **18**(4): p. 187-98.
  167. Middelveld RJ, W.M., Bergman D, Weitzberg E, Alving K., *Effect of cortisol-synthesis inhibition on endotoxin-induced porcine acute lung injury, shock and nitric oxide production.* Shock, 1999. **12**: p. 382-390.
  168. Lundgren-Akerlund E, O.A., Berger E, Arfors KE., *CD11b/CD18-dependent polymorphonuclear leucocyte interaction with matrix proteins in adhesion and migration.* Scand J Immunol., 1993. **37**(5): p. 569-74.
  169. Vaday, G.G. and O. Lider, *Extracellular matrix moieties, cytokines, and enzymes: dynamic effects on immune cell behavior and inflammation.* J Leukoc Biol, 2000. **67**(2): p. 149-59.
  170. Kreis, C., et al., *Thrombospondin and fibronectin are synthesized by neutrophils in human inflammatory joint disease and in a rabbit model of in vivo neutrophil activation.* J Immunol, 1989. **143**(6): p. 1961-8.
  171. Rosales, C. and R.L. Juliano, *Signal transduction by cell adhesion receptors in leukocytes.* J Leukoc Biol, 1995. **57**(2): p. 189-98.
  172. Lagasse, E. and I.L. Weissman, *bcl-2 inhibits apoptosis of neutrophils but not their engulfment by macrophages.* J Exp Med, 1994. **179**(3): p. 1047-52.
  173. MacPhee, I.A., F.A. Antoni, and D.W. Mason, *Spontaneous recovery of rats from experimental allergic encephalomyelitis is dependent on regulation of the immune system by endogenous adrenal corticosteroids.* J Exp Med, 1989. **169**(2): p. 431-45.
  174. Victor, V.M., et al., *Modulation of murine macrophage function by N-acetylcysteine in a model of endotoxic shock.* Biofactors, 1999. **10**(4): p. 347-57.
  175. Sehirli, A.O., et al., *Protective effect of N-acetylcysteine on renal ischemia/reperfusion injury in the rat.* J Nephrol, 2003. **16**(1): p. 75-80.
  176. Beck, C.A., et al., *The steroid antagonist RU486 exerts different effects on the glucocorticoid and progesterone receptors.* Endocrinology, 1993. **133**(2): p. 728-40.
  177. Jung-Testas, I. and E.E. Baulieu, *Inhibition of glucocorticosteroid action in cultured L-929 mouse fibroblasts by RU 486, a new anti-glucocorticosteroid of high affinity for the glucocorticosteroid receptor.* Exp Cell Res, 1983. **147**(1): p. 177-82.
  178. Groyer, A., et al., *Antiglucocorticosteroid effects suggest why steroid hormone is required for receptors to bind DNA in vivo but not in vitro.* Nature, 1987. **328**(6131): p. 624-6.

179. Gow, R.M., et al., *Differential effects of dexamethasone treatment on lipopolysaccharide-induced testicular inflammation and reproductive hormone inhibition in adult rats*. J Endocrinol, 2001. **168**(1): p. 193-201.
180. Stenzel-Poore, M., W.W. Vale, and C. Rivier, *Relationship between antigen-induced immune stimulation and activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat*. Endocrinology, 1993. **132**(3): p. 1313-8.
181. Ashare, A., et al., *Anti-inflammatory response is associated with mortality and severity of infection in sepsis*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005. **288**(4): p. L633-40.
182. Naito, Y., et al., *Biphasic changes in hypothalamo-pituitary-adrenal function during the early recovery period after major abdominal surgery*. J Clin Endocrinol Metab, 1991. **73**(1): p. 111-7.
183. Kapcala, L.P., T. Chautard, and R.L. Eskay, *The protective role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis against lethality produced by immune, infectious, and inflammatory stress*. Ann N Y Acad Sci, 1995. **771**: p. 419-37.
184. Ulinski, T., et al., *Neonatal hemolytic uremic syndrome after mother-to-child transmission of Escherichia coli O157*. Pediatr Nephrol, 2005. **20**(9): p. 1334-5.
185. Bertini, R., M. Bianchi, and P. Ghezzi, *Adrenalectomy sensitizes mice to the lethal effects of interleukin 1 and tumor necrosis factor*. J Exp Med, 1988. **167**(5): p. 1708-12.
186. Butler, L.D., et al., *Neuroendocrine regulation of in vivo cytokine production and effects: I. In vivo regulatory networks involving the neuroendocrine system, interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha*. J Neuroimmunol, 1989. **24**(1-2): p. 143-53.
187. Goppelt-Struebe, M., et al., *Modulation of tumor necrosis factor (TNF) receptor expression during monocytic differentiation by glucocorticoids*. Inflamm Res, 1996. **45**(10): p. 503-7.
188. Rajan, T.V., et al., *Role of nitric oxide in host defense against an extracellular, metazoan parasite, Brugia malayi*. Infect Immun, 1996. **64**(8): p. 3351-3.
189. Hill, K.J., E.R. Lumbers, and I. Elbourne, *The actions of cortisol on fetal renal function*. J Dev Physiol, 1988. **10**(1): p. 85-96.
190. Guillery, E.N., et al., *Role of glucocorticoids in the maturation of renal cortical Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger activity during fetal life in sheep*. Am J Physiol, 1995. **268**(4 Pt 2): p. F710-7.
191. Srivastava, R.N., *Pediatric renal problems in India*. Pediatr Nephrol, 1987. **1**(2): p. 238-44.
192. Vanderbilt, J.N., et al., *Intracellular receptor concentration limits glucocorticoid-dependent enhancer activity*. Mol Endocrinol, 1987. **1**(1): p. 68-74.
193. Salkowski, C.A. and S.N. Vogel, *Lipopolysaccharide increases glucocorticoid receptor expression in murine macrophages. A possible mechanism for glucocorticoid-mediated suppression of endotoxicity*. J Immunol, 1992. **149**(12): p. 4041-7.
194. Danielsen, M. and M.R. Stallcup, *Down-regulation of glucocorticoid receptors in mouse lymphoma cell variants*. Mol Cell Biol, 1984. **4**(3): p. 449-53.
195. Liu Q, W.Y., Thorlacius H., *Dexamethasone inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced expression of macrophage inflammatory protein-2 and adhesion of neutrophils to endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **271**(2): p. 364-367.

196. Wheller SK, P.M., *Dexamethasone inhibits cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 up-regulation on endothelial cell lines*. Eur J Pharmacol., 1997. **331**(1): p. 65-71.
197. Youssef, P., et al., *Pulse methylprednisolone in rheumatoid arthritis: effects on peripheral blood and synovial fluid neutrophil surface phenotype*. J Rheumatol, 1995. **22**(11): p. 2065-71.
198. Harris, J.G., R.J. Flower, and M. Perretti, *Endogenous corticosteroids mediate the neutrophilia caused by platelet-activating factor in the mouse*. Eur J Pharmacol, 1995. **283**(1-3): p. 9-18.
199. Molijn, G.J., et al., *Differential adaptation of glucocorticoid sensitivity of peripheral blood mononuclear leukocytes in patients with sepsis or septic shock*. J Clin Endocrinol Metab, 1995. **80**(6): p. 1799-803.
200. Hart, S.P., et al., *Molecular characterization of the surface of apoptotic neutrophils: implications for functional downregulation and recognition by phagocytes*. Cell Death Differ, 2000. **7**(5): p. 493-503.
201. Frieser, M., et al., *Mouse polymorphonuclear granulocyte binding to extracellular matrix molecules involves beta 1 integrins*. Eur J Immunol, 1996. **26**(12): p. 3127-36.
202. Sixt, M., et al., *Cell adhesion and migration properties of beta 2-integrin negative polymorphonuclear granulocytes on defined extracellular matrix molecules. Relevance for leukocyte extravasation*. J Biol Chem, 2001. **276**(22): p. 18878-87.
203. Caramori G, A.I., *Anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids targeting granulocytes*. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2005. **4**(4): p. 455-463.
204. Davenpeck, K.L., et al., *Lipopolysaccharide-induced leukocyte rolling and adhesion in the rat mesenteric microcirculation: regulation by glucocorticoids and role of cytokines*. J Immunol, 1998. **161**(12): p. 6861-70.
205. Vainer, B. and O.H. Nielsen, *Chemotactic properties of ICAM-1 and PECAM-1 on neutrophil granulocytes in ulcerative colitis: effects of prednisolone and mesalazine*. Aliment Pharmacol Ther, 2000. **14**(8): p. 1023-31.
206. Cronstein, B.N., et al., *A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(21): p. 9991-5.
207. Zentay, Z., et al., *Mechanism for dexamethasone inhibition of neutrophil migration upon exposure to lipopolysaccharide in vitro: role of neutrophil interleukin-8 release*. Pediatr Res, 1999. **46**(4): p. 406-10.
208. Proulx, F., et al., *Circulating granulocyte colony-stimulating factor, C-X-C, and C-C chemokines in children with Escherichia coli O157:H7 associated hemolytic uremic syndrome*. Pediatr Res, 2002. **52**(6): p. 928-34.
209. Bastian, N.R. and J.B. Hibbs, Jr., *Assembly and regulation of NADPH oxidase and nitric oxide synthase*. Curr Opin Immunol, 1994. **6**(1): p. 131-9.
210. Fernandez, G.C., et al., *Impaired neutrophils in children with the typical form of hemolytic uremic syndrome*. Pediatr Nephrol, 2005. **20**(9): p. 1306-14.
211. King, A.J., et al., *Shiga toxin induces superoxide production in polymorphonuclear cells with subsequent impairment of phagocytosis and responsiveness to phorbol esters*. J Infect Dis, 1999. **179**(2): p. 503-7.
212. Wagner, J.G. and R.A. Roth, *Neutrophil migration during endotoxemia*. J Leukoc Biol, 1999. **66**(1): p. 10-24.

213. Oishi, K. and K. Machida, *Inhibition of neutrophil apoptosis by antioxidants in culture medium*. Scand J Immunol, 1997. **45**(1): p. 21-7.
214. Liu, J., et al., *Prolongation of functional life-span of neutrophils by recombinant verotoxin 2*. Chin Med J (Engl), 2002. **115**(6): p. 900-3.
215. Nittoh, T., et al., *Effects of glucocorticoids on apoptosis of infiltrated eosinophils and neutrophils in rats*. Eur J Pharmacol, 1998. **354**(1): p. 73-81.
216. Chang, L.C., et al., *Effects of glucocorticoids on Fas gene expression in bovine blood neutrophils*. J Endocrinol, 2004. **183**(3): p. 569-83.
217. Daffern, P.J., M.A. Jagels, and T.E. Hugli, *Multiple epithelial cell-derived factors enhance neutrophil survival. Regulation by glucocorticoids and tumor necrosis factor-alpha*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999. **21**(2): p. 259-67.
218. Fernandez, G.C., et al., *Phenotype markers and function of neutrophils in children with hemolytic uremic syndrome*. Pediatr Nephrol, 2002. **17**(5): p. 337-44.
219. Liu, J., et al., *Inhibition of neutrophil apoptosis by verotoxin 2 derived from Escherichia coli O157:H7*. Infect Immun, 1999. **67**(11): p. 6203-5.
220. Liu, J., et al., *Inhibition of neutrophil apoptosis by verotoxin 2 derived from Escherichia coli O157:H7*. Infect Immun, 1999. **67**(11): p. 6203-5.
221. Lavrentiadou, S.N., et al., *Ceramide-mediated apoptosis in lung epithelial cells is regulated by glutathione*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001. **25**(6): p. 676-84.
222. Aruoma, O.I., et al., *The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid*. Free Radic Biol Med, 1989. **6**(6): p. 593-7.
223. Vale, J.A. and A.T. Proudfoot, *Paracetamol (acetaminophen) poisoning*. Lancet, 1995. **346**(8974): p. 547-52.
224. De Benedetto, F., et al., *Long-term oral n-acetylcysteine reduces exhaled hydrogen peroxide in stable COPD*. Pulm Pharmacol Ther, 2005. **18**(1): p. 41-7.
225. Soldini, D., et al., *Pharmacokinetics of N-acetylcysteine following repeated intravenous infusion in haemodialysed patients*. Eur J Clin Pharmacol, 2005. **60**(12): p. 859-64.
226. Heyman, S.N., et al., *N-acetylcysteine ameliorates renal microcirculation: studies in rats*. Kidney Int, 2003. **63**(2): p. 634-41.
227. Conesa EL, V.F., Nadal JC, Fenoy FJ, Lopez B, Arregui B, Salom MG, *N-acetyl-L-cysteine improves renal medullary hypoperfusion in acute renal failure*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol., 2001. **281**(3): p. R730-R737.
228. Tsuji, F., et al., *Effects of bucillamine and N-acetyl-L-cysteine on cytokine production and collagen-induced arthritis (CIA)*. Clin Exp Immunol, 1999. **115**(1): p. 26-31.
229. Victor, V.M., M. Rocha, and M. De la Fuente, *N-acetylcysteine protects mice from lethal endotoxemia by regulating the redox state of immune cells*. Free Radic Res, 2003. **37**(9): p. 919-29.
230. Perez, N., et al., *Steroids in the hemolytic uremic syndrome*. Pediatr Nephrol, 1998. **12**(2): p. 101-4.