



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

**“MODULACION DEL RECEPTOR PARA LA QUIMIOQUINA  
FRACTALQUINA (CX<sub>3</sub>CR1) EN MONOCITOS. PARTICIPACIÓN EN  
LA PATOGÉNESIS DEL SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO (SUH)”**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en  
el área de Ciencias Biológicas

**Lic. Maria Victoria Ramos**

Director de tesis: Dra Marina S. Palermo  
Consejero de Estudios: Dr Eduardo Artz

Lugar de trabajo: División Inmunología-Instituto de Investigaciones Hematológicas-  
Academia Nacional de Medicina

Buenos Aires, 2008

## MODULACION DEL RECEPTOR PARA LA QUIMIOQUINA FRACTALQUINA (CX<sub>3</sub>CR1) EN MONOCITOS. PARTICIPACIÓN EN LA PATOGÉNESIS DEL SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO (SUH)”

El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), enfermedad caracterizada por anemia hemolítica, trombocitopenia y falla renal aguda, está asociado a infecciones enterohemorrágicas con *Escherichia coli* productores de toxina Shiga (Stx). Además de la presencia de Stx, también es necesaria la respuesta inflamatoria para el desarrollo de la enfermedad. El endotelio inflamado expresa la quimioquina fractalquina (CX<sub>3</sub>CL1) anclada a membrana pudiendo así actuar como molécula de adhesión al interactuar con su receptor, CX<sub>3</sub>CR1, presente en monocitos (Mo). En un modelo de glomerulonefritis murino, el tratamiento con anticuerpos anti-CX<sub>3</sub>CR1 disminuye la infiltración de leucocitos al glomérulo y mejora la función renal. Por esto se propuso que la interacción entre CX<sub>3</sub>CL1-CX<sub>3</sub>CR1 podría contribuir al daño renal en el SUH. Desarrollamos estrategias incluyendo estudios *ex vivo* a partir de muestras de sangre y tejido renal de pacientes con SUH y estudios *in vitro* con Mo y cultivos primarios de endotelio y epitelio renal. Encontramos: 1) disminución de leucocitos circulantes CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> y presencia de éstas células en glomérulo de pacientes con SUH, 2) participación de la vía CX<sub>3</sub>CL1-CX<sub>3</sub>CR1 en el daño endotelial/epitelial mediado por Mo y Stx, 3) modulación de la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 en Mo por citoquinas pro/anti-inflamatorias y factores involucrados en el SUH, como Stx y lipopolisacaridos. Concluimos que la CX<sub>3</sub>CL1 está involucrada en el daño mediado por los Mo(Stx1) sobre el endotelio y epitelio. Junto con la presencia de células CX<sub>3</sub>CR1 en glomérulo de pacientes con SUH, y la correlación negativa entre la disminución de los leucocitos CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> circulantes y el daño renal en los pacientes, sugerimos que es una vía importante a través de la cual los Mo interactúan con el endotelio y contribuyen a la patogénesis del SUH.

Palabras Claves: monocitos, fractalquina (CX<sub>3</sub>CL1), receptor para fractalquina (CX<sub>3</sub>CR1), Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), modulación.

**“MODULATION OF FRACTALKINE RECEPTOR (CX<sub>3</sub>CR1) EXPRESSION ON MONOCYTES. INVOLVEMENT IN THE HEMOLYTIC UREMIC SYNDROME (HUS) PATHOGENESIS”**

Infection with Shiga toxin (Stx)-producing *Escherichia coli* leads to Hemolytic Uremic Syndrome (HUS) and finally causes acute renal failure in children. Cytotoxic effects on renal epithelial and endothelial cells caused by Stx and inflammatory factors are all involved in HUS development. In addition, inflammatory factors up regulate the expression of the chemokine fractalkine (CX<sub>3</sub>CL1) on endothelial cells. CX<sub>3</sub>CL1 receptor (CX<sub>3</sub>CR1) is present on Mo and is involved in cell traffic during inflammation. It has been postulated that CX<sub>3</sub>CL1 contributes to endothelial damage during experimental glomerulonephritis since it was shown that administration of anti- CX<sub>3</sub>CR1 antibodies diminishes glomeruli leukocytes infiltration and renal damage. Taking this into account we hypothesised that CX<sub>3</sub>CL1-CX<sub>3</sub>CR1 interaction could be involved in renal damage during HUS. We proposed several strategies in order to investigate this issue, including *ex vivo* studies on blood and renal samples from HUS patients, and *in vitro* studies with Mo and primary cultures of endothelial and epithelial renal cells. We observed 1) a significant reduction of peripheral CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> leukocytes and presence of these cells on glomeruli in HUS patients 2) Mo contribute to endothelial and epithelial damage not only through secretion of inflammatory cytokines, but also through the binding of Stx, activation and increased interaction with endothelium/epithelium, mediated at least in part by CX<sub>3</sub>CL1/CX<sub>3</sub>CR1, 3) CX<sub>3</sub>CR1 Mo-expression can be modulated by anti-inflammatory/inflammatory cytokines and other factors involved in HUS, such as LPS and Stx. Finally we conclude that CX<sub>3</sub>CL1 is involved in endothelium/epithelium damage mediated by Mo(Stx1). In addition CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> cells on glomeruli were observed and a negative correlation between reduction of CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> leukocytes and renal damage was found on HUS patients. We suggest that CX<sub>3</sub>CL1 pathway is involved in the Mo recruitment to endothelium contributing to HUS development.

Key Words: monocytes, fractalkine (CX<sub>3</sub>CL1), fractalkine receptor (CX<sub>3</sub>CR1), Hemolytic Uremic Syndrome (HUS), modulation.

A mis padres, que me apoyaron toda la vida. En particular desde el primer día que decidí estudiar biología, aconsejándome a hacer lo que realmente me gustaba. Me apoyaron para llevar adelante mi carrera y siempre me supieron escuchar...les agradezco de corazón que me acompañen en todo momento.

A Gabriel, mi compañero de ruta, mi solcito, quien me escuchó desde el primer día hablar de mis experimentos, las células, el citómetro, etc...pero sobretodo quien siempre me acompaña en la vida y con quien comparto momentos muy felices, entre ellos, estar con "Pina", nuestra sobrinita

A Marina, mi jefa, ...muchas cosas para agradecerle! Primero, me brindaste un lugar y la oportunidad de hacer mi doctorado, me escuchaste y valoraste cada idea que tuve, fuera interesante ó sin fundamentos. Quien soporta mis ataques de "tabanito"...sobre todo con pedidos de becas para Francia...(pero persevera y triunfaras)...Me enseñaste a diseñar experimentos y poder desarrollarlos. Pero más que nada a sentir que con paciencia las cosas van saliendo...en la vida también.

A Martin, quien ya me deberá ascender de la escala de Pichi!! Quien entre pucho y cafecito siempre, pero siempre, tiene tiempo para atender mis preguntas y consultas, y hacer chistes también, aunque sea lunes!!! Valoro mucho la pasión que pone en el trabajo.

A Gaby Fernandez!!!! Nose si lo sabrás, pero aprendí muchísimo de vos, fuiste como una brújula en el laboratorio. Me enseñaste a trabajar en la mesada..desde las muestras de células hasta el clitómetro. Compartimos muchas charlas y congresos, momentos de terapia también, cuando los datos no eran lo que esperaba ó de cosas de la vida. .

A Romi, con quien comparto charlas experimentales, pero sobretodo compartí muchos viajes y anécdotas inolvidables, entre recetas de cocina...que nunca hice, jejeje.

A Leti, otra loca como yo...con quien he compartido desde páginas de becas y cursos de laboratorio hasta salidas, congresos, alguna cervecita...y dietas para la gastritis.

A las chicas nuevas, Ana y Pilar, a quienes recién conozco, pero estoy segura que compartiré muchos momentos.

A Juli..mi amiga y compañera a la hora de relajarnos tomando cafecitos y comiendo torta!!! Con ella comparto momentos desde mi primer día en la Academia, siempre apoyándome. Ahora Andy también nos acompaña en nuestras charlas y salidas.....

A la Colo, Cami, Gabo, Dani, Tito, y otros que estuvieron antes, Gaby L, Dalia..y a Edith...Quien aparecio en el momento justo y me guío hasta Marina!!

A la gente del segundo, Pao, Sole, Mirta, Roberto, Elisa..quienes me introdujeron en el mundo de las celulas endoteliales.

A los chicos del Primero: Maricarmen, Silvia, Vero, Pablito, Luciana, Mercedes, Merceditas, Kao, Laura, Barbara, Evi, Paula, Juan...

A las chicas del citómetro, Martita, Nora y Norma.

---

Ac	Anticuerpo
ADCC	Citotoxicidad celular mediada por anticuerpos
BSA	Seroalbumina Bovina
Ca <sup>2+</sup> i	Calcio libre intracelular
CX3CL1	Quimioquina fractalquina
CX3CR1	Receptor para fractalquina
DMSO	Dimetil Sulfoxido
DTT	Ditritiotreitol
ERK1/2	Extracellullar-signal-regulated kinases o Quinasas reguladas por señales extracelulares
ES	Error estandar
Fc $\gamma$	Fragmento Fc de IgG
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
Fl1	Fluorescencia
FMLP	N- Formil metionil leucil fenilalanina
FSS	Forward Side Scatter
GM-CSF	Factor estimulador de colonias granulocíticas macrofágicas
GPI	Glicosil fosfatidil inositol
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrógeno
IgG	Inmunoglobulina G
IMF	Intensidad Media de Fluorescencia
IL-1 $\beta$	Interleuquina 1- $\beta$
IL-1	Interleuquina-1
IL-6	Interleuquina-6
IL-4	Interleuquina-4
IL-8	Interleuquina- 8
IL-10	Interleuquina-10
ICAM	Molécula de adhesión intercelular
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IP	Ioduro de Propidio
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LFA-1	Antígeno asociado a la función linfocitaria-1
LPS	Lipopolisacáridos
MAPK	Mitogen activated protein kinase o Proteína quinasa activada por mitógenos
MEK	Quinasa de ERK1/2
MEKK	Quinasa de MEK
Mo	Monocito
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear kappa B
NK	Células natural killer
O <sub>2</sub> -	Anión superóxido
PBS	Solución salina tamponada
PMN	Neutrófilos polimorfonucleares
RFc $\gamma$	Receptor para el fragmento Fc de IgG
RFc	Receptor para región Fc de Inmunoglobulinas
DE	Desvío standard
SSC	Side scatter light
Stx	Toxina Shiga
TNF- $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$

VCAM	Molécula de adhesión vascular
VLA	Very Late Antigen

# *Indice*



	<i>Página</i>
<b>- Resumen</b>	1
<b>- Resumen en Ingles</b>	2
<b>- Agradecimientos</b>	3
<b>- Abreviaturas</b>	4
<b>1- Breve introducción general y objetivos</b>	11
<b>2-Introducción</b>	
2.1.-Características del Síndrome Uremico Hemolitico (SUH)	14
2.1.1- Aspectos clínicos del D+SUH	14
2.1.2- Epidemiología.	17
2.1.3- Tratamiento	19
2.2.- Estructura de la Stx	21
2.2.1- Transporte retrógrado de la Stx	22
2.2.2- Receptores de la Stx	22
2.2.3- Daño endotelial y epitelial: curso de la infección	23
2.2.4.- Interacción de la stx con células endoteliales.	
2.2.5.- Interacción de la stx con los tipos celulares del riñón	24
- células endoteliales glomerulares	
- células mesangiales	
- células epiteliales glomerulares	
- células epiteliales del túbulo renal	
2.3.- Rol de la respuesta inflamatoria:	25
2.3.1.- Monocitos en el SUH	29
2.3.2.- Fisiología de los monocitos. Diferentes subpoblaciones de monocitos y sus funciones durante las infecciones	30
2.3.3.- Fisiología de las celulas natural killer (NK)	30
- Subpoblaciones de NK.	
2.3.4.- Quimioquinas	31
2.3.4.1.- La quimioquina fractalquina (CX <sub>3</sub> CL1)	32
- Estructura	
- Propiedades de adhesión.	
2.3.5.- Expresión y función de receptores para quimioquinas en monocitos.	34
- Características y funciones del receptor para fractalquina, CX <sub>3</sub> CR1	36
- En los Monocitos.	
- En NK.	
- En Linfocitos.	
- En plaquetas.	
2.3.6.- Analisis de CX <sub>3</sub> CR1 en diferentes patologias	37
- Enfermedades renales	
- Rechazo de trasplantes	
- Arteroesclerosis y enfermedades cardiovasculares	
- Infecciones por HIV	



- Otras enfermedades inflamatorias

<b>3- Materiales y Métodos</b>	<b>41</b>
3.1.-Reactivos generales.	
3.2.-Preparación de la toxina Shiga 1 (Stx1)	
3.3.-Anticuerpos	
3.4.-Soluciones.	42
3.4.1.-Solución de Ficoll-Hypaque.	
3.4.2.-Tampón fosfato salino (PBS).	
3.4.3-Solución de Türk para el recuento de células	
3.4.4.-Solución de azul tripan.	
3.4.5.-Medio de cultivo completo (MCC).	
3.4.6-Solución RIPA modificado.	
3.4.7.-Soluciones para aislar monocitos:	
Ficoll Hypaque	
Solución Buffer T10	
Solución Buffer T1	
Buffer de resuspensión	
Buffer P100, P50 y P40	
3.4.8.- Pegado de moléculas a bolitas de latex	
3.5.-Purificación de Monocitos humanos.	44
3.5.1.- Diferenciación de Mo a macrófagos ó células dendríticas	
3.6.- Cultivo de células.	45
- Líneas celulares	
- Obtención y cultivo de células endoteliales	
- Obtención y cultivo de células epiteliales.	
3.7.- Recuento y fórmula de leucocitos de sangre periférica	
3.8.-Citometría de Flujo.	46
3.8.1.-Evaluación de la expresión de diferentes moléculas en la superficie celular	47
3.8.2.-Evaluación de la movilización de calcio intracelular $Ca^{2+}_i$ .	
Marcación de células con Fluo-3AM.	
3.8.3.-Análisis de los datos obtenidos.	48
3.8.4.-Evaluación de la apoptosis por incorporación de Ioduro de Propidio y Anexina.	
3.9.-Western Blot de lisados celulares y ensayos de actividad quinasa.	
3.10.-Análisis estadístico de los datos obtenidos.	
<b>4- Resultados</b>	<b>51</b>
4.1.- Expresión de CX <sub>3</sub> CR1 en leucocitos circulantes de pacientes con SUH.	
4.1.1. Clasificación de los grupos clínicos estudiados	
4.1.2. Distintas poblaciones de leucocitos que expresan CX <sub>3</sub> CR1.	52
4.1.3. Expresión de CX <sub>3</sub> CR1 en las distintas subpoblaciones de monocitos periféricos.	53
4.1.4. Expresión de CX <sub>3</sub> CR1 y de la selectina CD62L en monocitos periféricos.	55
4.1.5. Expresión de CX <sub>3</sub> CR1 en células NK.	57
4.1.6. Detección de células CX <sub>3</sub> CR1 <sup>+</sup> en cortes de riñón de pacientes con SUH.	60

4.1.7. Parámetros evaluados en los pacientes con SUH. Correlaciones	61
4.2- Daño en endotelio y epitelio mediado por los monocitos y la Stx1. Rol de la CX <sub>3</sub> CL1	66
4.2.1- Efecto citotóxico de la toxina Shiga 1 (Stx1) y los Monocitos Preincubados con Stx1, sobre células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC)	
4.2.2. Papel de la fractalquina en el daño mediado por los MoStx1 sobre el endotelio activado.	67
4.2.3. Efecto de la Stx1 y los monocitos sobre células epiteliales de túbulo proximal de riñón (HRTEC)	71
4.3.- Modulación de la expresión de CX <sub>3</sub> CR1 en Monocitos.	73
4.3.1- Expresión de CX <sub>3</sub> CR1 en monocitos durante el cultivo. Efecto de inhibidores de la síntesis proteica.	
4.3.2.- Papel de mediadores inflamatorios ó antiinflamatorios sobre la expresión de CX <sub>3</sub> CR1.	75
4.3.4.- Efecto de la IL-10 sobre la expresión de CX <sub>3</sub> CR1.	76
4.3.5- Mecanismos celulares activados por la IL-10.	78
4.3.6.- Papel de la kinasa intracelular PI3K en la modulación de CX <sub>3</sub> CR1 ejercida por IL-10.	
4.3.7.- Efecto del IFN- $\gamma$ , factor activador de monocitos, sobre la expresión de CX <sub>3</sub> CR1.	80
4.3.8.- La línea celular THP-1, madurada en presencia de PMA, disminuye selectivamente la expresión de CX <sub>3</sub> CR1	81
4.3.9.- Efecto de IL-10 e IFN $\gamma$ . Papel de la PI3K/Akt.	82
4.3.10.- Efecto de la IL-10 y el IFN $\gamma$ de manera conjunta, sobre la modulación de CX <sub>3</sub> CR1.	83
4.3.11.- Efecto biológico de los cambios observados en la Expresión de CX <sub>3</sub> CR1	85
<b>5- Discusión y Conclusiones</b>	88
<b>6- Bibliografía</b>	100

# *Breve Introducción y Objetivos*



El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) típico ó post-diarrea (D+), es una enfermedad caracterizada por anemia hemolítica, trombocitopenia y falla renal aguda. Ha sido asociada a infecciones enterohemorrágicas causadas por *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (STEC).

La disfunción endotelial inducida por la toxina Shiga (Stx) es central en el desarrollo de la microangiopatía observada en los niños con SUH. Sin embargo, datos clínicos y experimentales sugieren que para el desarrollo de la enfermedad, es necesaria la respuesta inflamatoria ante otros factores de virulencia de las bacterias. Se ha reportado que el Lipopolisacárido (LPS) O157 activa plaquetas y también que junto con la Stx activa células mieloides. Más aún, nosotros hemos demostrado que la depleción de macrófagos hepáticos y esplénicos disminuye la citotoxicidad de la Stx en ratones. Por otro lado se observó que los niveles circulantes de citoquinas C-C para monocitos (Mo), están asociados con la severidad del SUH.

El “rolling” y “attachment” de los leucocitos sobre las células endoteliales, es promovido por la vasodilatación y expresión de selectinas, seguido de la adhesión celular mediada por integrinas. En este mecanismo, las células injuriadas participan en la elaboración de citoquinas y quimioquinas, ya que luego de una señal de daño, se produce una activación que modifica completamente la función del endotelio vascular y el perfil de quimioquinas.

La fractalquina (CX<sub>3</sub>CL1), es el único miembro de una nueva familia de quimioquinas (CX<sub>3</sub>C), tiene la particularidad de ser una proteína transmembrana tipo I. Posee su dominio de quimioquina en el extremo extracelular, luego un esqueleto de mucinas transmembrana y una cola citoplasmática. Puede actuar como molécula de adhesión (forma anclada a membrana) ó como quimioattractante soluble luego de su clivaje por acción de metaloproteasas, en condiciones constitutivas ó inflamatorias. Esta quimioquina ha sido detectada en endotelio y epitelio, mientras que el receptor para fractalquina (CX<sub>3</sub>CR1), se expresa en monocitos, células Natural Killer y un subset de linfocitos T CD8. La CX<sub>3</sub>CL1 permite bajo condiciones fisiológicas de flujo la adhesión de monocitos y células NK.

Distintas evidencias demuestran la relevancia de las quimioquinas y sus receptores en el desarrollo de la respuesta inflamatoria y en la evolución de diferentes patologías. Por ejemplo, en el modelo de aterosclerosis murino, la ausencia de expresión de CCR2, disminuye las lesiones en las placas. Más aún, el bloqueo simultáneo de los receptores CCR2, CCR5 y CX<sub>3</sub>CR1, logran disminuir casi por completo la monocitosis observada, correlacionando con un menor depósito de Mo en las arterias y menor daño.<sup>2</sup> En particular, se ha reportado que la expresión de la CX<sub>3</sub>CL1 está aumentada en el endotelio de los riñones de animales con glomerulonefritis extracapilar con semilunas (mediada por Ac anti-membrana basal del glomérulo) y que además se encuentran Mo

que expresan el receptor para la fractalquina (CX<sub>3</sub>CR1)<sup>3</sup>. Así mismo, la neutralización del CX<sub>3</sub>CR1 disminuye la severidad de la glomerulonefritis experimental. Por otro lado, se ha reportado en biopsias de pacientes con distintos tipos de nefropatías (tumores renales neoplásicos, glomerulonefritis creciente, nefropatía membranosa, glomerulonefritis membrano-proliferativa, glomeruloesclerosis focal y segmental, glomerulopatía colapsante, inflamación tubular e intersticial debido a rechazo de trasplante renal), la co-localización de CX<sub>3</sub>CL1 con leucocitos CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> caracterizados como macrófagos (CD68<sup>+</sup>) y linfocitos T CD3<sup>+</sup><sup>4</sup>.

En resumen, diversas evidencias sugieren la participación de la fractalquina durante la infiltración de los Mo en procesos inflamatorios en riñón<sup>4,5</sup>, y teniendo en cuenta que durante el desarrollo del SUH se daña principalmente el endotelio y epitelio renal y que además la respuesta inflamatoria es relevante para la patogénesis, como ha sido mencionado, decidimos estudiar la participación de la fractalquina y su receptor en el SUH.

Así se diseñaron experimentos para responder al objetivo general de profundizar el estudio de los mecanismos fisiopatogénicos en el desarrollo del SUH, y particularmente para analizar la participación de la CX<sub>3</sub>CL1 en esta enfermedad. Partiendo de la hipótesis de que los Mo contribuirían al daño endotelial inducido por la Stx no sólo a través de la secreción sistémica de citoquinas inflamatorias, sino también a través del aumento de la interacción con el endotelio y epitelio tubular renal a través del camino de la quimioquina CX<sub>3</sub>CL1, nos propusimos diferentes estrategias para estudiarla. Para ello:

- Se analizó si las poblaciones de leucocitos CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> circulantes tales como Mo y células NK y NKT, en pacientes con SUH al momento del diagnóstico previo a la administración de cualquier tratamiento, presentaban alteraciones en la expresión de dicho receptor.

- Se estudió si la interacción entre el CX<sub>3</sub>CR1 presente en los monocitos humanos y la fractalquina expresada en células endoteliales (HUVEC) ó epiteliales (HRTEC) estimuladas, tenían relevancia en el daño ejercido por estos leucocitos en presencia de la toxina Stx1.

- Se investigó si la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 en monocitos humanos era modulable por factores inflamatorios ó antiinflamatorios presentes en el SUH.

Finalmente, la relevancia de estos estudios serviría para ampliar los conocimientos sobre los mecanismos de daño implicados en la patogénesis del SUH. Esto permitiría el planteamiento de una terapia específica, con base racional, destinada a disminuir ó impedir el daño por la Stx durante la enfermedad.

# *Introducción*



## 2.1.- CARACTERÍSTICAS DEL SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO.

El síndrome urémico hemolítico (SUH) es una enfermedad caracterizada por anemia hemolítica (eritrocitos fragmentados), trombocitopenia y variables grados de insuficiencia renal<sup>6</sup>. Se reconocen una forma denominada típica, precedida de diarrea (D+) y otra atípica sin diarrea y que reconoce múltiples causas, principalmente genéticas. La forma típica ó epidémica del SUH afecta principalmente a los niños menores de cinco años y es usualmente precedida por un pródromo de diarrea sanguinolenta. En Argentina el SUH típico es endémico-epidémico, y constituye la primera causa de insuficiencia renal aguda, siendo responsable del 20% de los trasplantes renales en niños y adolescentes. En la etapa aguda de la enfermedad la mortalidad es de 2-4% de los niños afectados. La incidencia actual es de 15/100.000 niños menores de 5 años

La enfermedad causa principalmente daño en el riñón, aunque también se observan lesiones severas en la pared del colon, daño en el miocardio por isquemia y alteraciones metabólicas, oclusión vascular en el sistema nervioso central, manifestaciones en páncreas y tubo digestivo<sup>6</sup>. La lesión de microangiopatía trombótica (MAT) típica del SUH se debe a la formación de trombos de plaquetas y fibrina que ocluyen la microvasculatura en los órganos afectados. Por estos motivos, se observa una disminución en el número de plaquetas y un agotamiento de las mismas (“plaquetas exhaustas”). Así, la disfunción endotelial es el factor más importante del proceso microangiopático, que consiste en un engrosamiento de la pared vascular de capilares y arteriolas, con hinchazón y desprendimiento de las células endoteliales de la membrana basal y acumulación de material esponjoso en el subendotelio<sup>7</sup>. Actualmente no existe tratamiento específico para el SUH, sino que los pacientes son tratados con terapias de soporte destinadas a paliar los síntomas. La diálisis peritoneal, es el principal tratamiento para eliminar los metabolitos tóxicos y reducir el daño renal agudo. Si bien de esta forma se ha reducido significativamente la mortalidad de esta enfermedad, existe una gran proporción de niños (hasta un 20%) que presentan secuelas renales ó neurológicas severas<sup>8-11</sup>.

Si bien en un principio se especuló que el agente etiológico era de origen viral<sup>6</sup>, más tarde Karmali *et al.* demostraron que el agente etiológico del SUH es una exotoxina, denominada actualmente toxina Shiga (Stx), producida por la *Shigella* y ciertas cepas de *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC), siendo en nuestro país el serotipo mayormente asociado al SUH el O157:H7<sup>12,13</sup>. Luego de la infección con *E. coli* productoras de toxina Shiga (STEC) sólo el 5-10% de los niños infectados desarrollan el SUH, presentándose un amplio rango de posibilidades con respecto al curso de la infección: portadores sanos, manifestaciones solamente intestinales ó

alteraciones parciales ó formas incompletas de SUH <sup>14</sup>. Esto implica que tanto factores del huésped como de la bacteria podrían influir en el desarrollo de la enfermedad

### **2.1.1- ASPECTOS CLÍNICOS DEL D+SUH**

Como se ha mencionado anteriormente, esta enfermedad sindrómica puede presentar dos formas. La forma típica de etiología infecciosa y de características endemoepidémicas, precedida por un periodo prodrómico con diarrea, generalmente sanguinolenta, y que puede acompañarse de fiebre, vómitos y dolor abdominal.

La otra forma es la atípica que puede ser desencadenada por distintos cuadros como neoplasias, hipertensión arterial, rechazo de trasplantes renales, drogas, etc, pero en la actualidad las causas más relevantes son las genéticas, como deficiencia de factores, lo cual provoca una activación de la vía alterna del complemento. Se ha detectado deficiencia de factor H, del Cofactor proteico de membrana y del Factor I. Se agregan la deficiencia de ADAMTs 13, gen que codifica una proteína que cliva el factor de von Willebrand, y cuya ausencia permite la aparición de multímeros del factor de von Willebrand de alto peso molecular que provocan severo daño endotelial. Finalmente, más raro es el SUH provocado por una alteración en el metabolismo de la vitamina B12 que se asocia con acidemia metilmalónica e hipertensión arterial muy difícil de controlar.

En el caso de la enfermedad con etiología infecciosa, la bacteria ingresa al organismo mediante el consumo de alimentos contaminados, como carne molida, productos cárnicos crudos o insuficientemente cocidos, hamburguesas, yogur, quesos. Existen diversas etapas entre la ingestión del alimento contaminado y el desarrollo del SUH. Luego de la ingestión de la fuente de STEC, la bacteria se aloja en el intestino, principalmente en el colon en humanos <sup>15,16</sup>, donde interacciona y se adhiere al epitelio intestinal, provocando lesiones características denominadas "*attaching and effacing*" o lesiones A/E. El aspecto peculiar de este tipo de lesiones es la formación de un pedestal en las células a las cuales la bacteria se adhiere íntimamente y se reproduce. Durante el proceso de A/E las células epiteliales pierden sus microvellosidades y desarrollan protrusiones ricas en actina. Los genes necesarios para el desarrollo de estas lesiones se encuentran codificados en un islote de patogenicidad, que también codifica para la intimina (producto del gen *eae*), una proteína de membrana involucrada en la adhesión íntima, y para su propio receptor (Tir), el cual es translocado a la membrana de la célula blanco por un sistema de secreción de tipo III, también codificado por el LEE <sup>17 18</sup>.



Las lesiones en el epitelio intestinal pueden terminar en infartos colónicos, hemorragias y necrosis intestinales<sup>6</sup>. Otras manifestaciones digestivas son el prolapso rectal y se han descrito casos de invaginación ó pseudo-invaginación intestinal. Las lesiones severas de colitis isquémica son muy temidas y son causa de mortalidad en el periodo agudo. Luego de la infección con STEC, las cuales no son invasivas, el pasaje de la toxina a la circulación se realiza a través del epitelio intestinal<sup>19</sup>. Una vez en la sangre, la toxina interacciona con el endotelio vascular y con distintos tipos celulares presentes en la circulación, algunos de los cuales han sido postulados como posibles transportadores de la toxina al riñón: monocitos (Mo)<sup>20</sup>, plaquetas<sup>21,22</sup>, polimorfonucleares (PMN),<sup>23-25</sup> y finalmente los eritrocitos mediante su antígeno Pk, el cual posee una estructura de glicolípidos similar al Gb3<sup>26</sup>. En el caso de los Mo han sido propuestos como posibles “*carriers*”, ya que poseen el receptor específico para la Stx y a diferencia de lo que ocurre en el endotelio renal, la toxina luego de unirse a su receptor en el Mo, sigue el camino hacia los lisosomas<sup>27</sup>, induciendo la activación y sobreexpresión de ciertos factores de transcripción y finalmente la secreción de citoquinas inflamatorias como TNF $\alpha$ , IL6, IL1, IL8. La teoría, que avala la participación de los PMN en el transporte de la toxina ha sido objeto de severos cuestionamientos<sup>28 29</sup>. En el riñón la toxina causa destrucción de las células epiteliales tubulares y del endotelio glomerular (daño renal agudo)<sup>30</sup>. Durante todo este proceso existe activación de la cascada de coagulación, con la consecuente formación de trombos de plaquetas y fibrina, y liberación de mediadores inflamatorios. De esta forma se produce obstrucción de la microvasculatura con fragmentación mecánica de los glóbulos rojos (anemia hemolítica) y la característica trombocitopenia.

Después de la infección hasta el desarrollo de la diarrea, existe un periodo que puede ser desde 1 a 8 días, continuando la eliminación intestinal de la bacteria durante 3 o más semanas. La baja dosis infectiva ha sido asociada a la capacidad de estas cepas bacterianas de resistir las condiciones ácidas del estómago<sup>18</sup>. Una vez comenzada la diarrea, generalmente dura 3 a 5 días y cuando todo parece resolverse, se desencadena un dramático cuadro en el que dominan las manifestaciones hematológicas y la insuficiencia renal aguda.

La insuficiencia renal aguda se presenta, con diversos grados, en el 100% de los casos. Los pacientes pueden presentar cuadros de hipervolemia por retención hidrosalina debida a la disminución en el filtrado glomerular, que también provoca elevación de los niveles de urea y creatinina en sangre y proteinuria. La oligoanuria y anuria son otras características frecuentes, siendo la duración de ambos fenómenos variable<sup>31</sup>.

A nivel microscópico la patología renal del SUH en la etapa aguda, muestra que las lesiones observadas son debidas a la coagulación intravascular y daño tubular directo, mientras que las lesiones tardías están relacionadas con la isquemia producida por la trombosis vascular y

la lisis de los depósitos de fibrina <sup>6</sup>. En general, en biopsias de riñón de niños con D+SUH se observa retracción del glomérulo, desprendimiento del endotelio capilar glomerular de la membrana basal y ocasionalmente, necrosis e hiper celularidad y proliferación mesangial. Las arterias y arteriolas presentan disminución del lumen debido a la expansión del subendotelio, proliferación e hinchazón de la íntima como consecuencia de la acumulación de glóbulos rojos y fibrina, y necrosis y trombosis de la pared. Frecuentemente se observa daño con atrofia y necrosis en los túbulos proximales corticales, así como también una marcada fibrosis intersticial <sup>7</sup>.

La diálisis peritoneal ha reducido en gran medida las complicaciones de los cuadros clínicos que afectan el sistema muscular, digestivo, nervioso ó cardiovascular, como consecuencia de la hipervolemia y el desequilibrio hidro-electrolítico. Sin embargo, la hipertensión arterial y la acidosis metabólica debida a la insuficiencia renal, son factores importantes que pueden provocar fallo cardíaco y disminución de la contractibilidad cardíaca, respectivamente <sup>31</sup>. Se describen casos de hiperglucemia severa por alteraciones en la función pancreática. Pueden presentarse casos de coma hiperosmolar por la intensa hiperglucemia. A esto se agrega el contenido de glucosa de las soluciones de diálisis.

La anemia hemolítica se encuentra presente en todos los casos agudos de D+SUH y se caracteriza por la presencia de eritrocitos morfológicamente anormales (fragmentados, triangulares, con forma de casco o con bordes dentados), intensa anisocitosis, reticulocitosis y eritroblastos circulantes. La hemólisis intravascular se debe al daño mecánico que sufren los eritrocitos al atravesar la microvasculatura ocluida por redes de fibrina y plaquetas <sup>6,31</sup>

El aumento en los niveles de leucocitos, particularmente la población de PMNs y la disminución en el número de plaquetas son dos aspectos característicos del D+SUH. La trombocitopenia observada es consecuencia de la activación y consumo intravascular de las plaquetas.

### **2.1.2- EPIDEMIOLOGÍA.**

El SUH típico ha sido clasificado por la Organización Mundial de la Salud como enfermedad transmitida por alimentos. Las vías de infección para cuadros entéricos es la vía fecal-oral. La baja dosis infectiva, menor a 100 UFC.g<sup>-1</sup>, determina que trazas de la bacteria en los alimentos puedan desencadenar un cuadro clínico en un huésped susceptible <sup>32</sup>

En Argentina, se producen aproximadamente 400 casos nuevos de SUH por año, siendo esta enfermedad responsable del 20% de los trasplantes renales en niños y adolescentes <sup>33</sup>. En estudios realizados en la década del 90, se encontraron evidencias para asociar ampliamente al

serotipo *E. coli* O157:H7 con el desarrollo del D+SUH<sup>32</sup>. En el 2000, el Ministerio de Salud estableció la notificación obligatoria al Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, y además comenzaron a funcionar Unidades Centinela en las jurisdicciones de incidencia más elevadas. En el 2007, la tasa de notificación fue de 15 casos por cada 100.000 niños menores de 5 años, valor 10 veces superior al notificado por los países industrializados. El 52% de los casos correspondió al sexo femenino y el 62% a niños menores de 2 años, con una edad promedio de 29± 26.3 meses (rango 0-180 meses). El 77% ocurrió durante los meses calidos. La letalidad en la fase aguda fue del 3.4%. En 2005, el Servicio de Fisiopatogenia del Instituto Malbrán, como Laboratorio Nacional de Referencia, recibió 344 muestras de pacientes con diagnóstico de SUH, estableciéndose la infección por STEC en el 32,8% de los mismos, Se caracterizaron 87 cepas de STEC, de las cuales el 75% fueron serotipificadas como O157:H7 y el 24% como STEC no-O157 (otros serotipos de STEC menos frecuentes son O26:H11; O103:H2 ; O111:NM; O113:H21; O145:NM). Se ha reportado que las STEC O157 son portadoras de los genes de virulencia *Stx* y *eae* (intimina), y presentan mayor probabilidad de causar gastroenteritis y SUH. Esto explicaría porque dicho serogrupo, es el predominante en pacientes con SUH<sup>34</sup>. Por otro lado Karch *et al*<sup>35</sup>, encontró que la presencia de *Stx2* ó *Stx2c* estaba asociada al SUH mientras que, las cepas con *Stx2d* ó *Stx2e*, eran aisladas de pacientes con menor grado de severidad de la enfermedad.

El ganado vacuno ha sido señalado como el principal reservorio de cepas STEC, incluyendo los serotipos relacionados con el O157:H7, ya que la eliminación por materia fecal durante periodos prolongados de tiempo implican la multiplicación de la bacteria en ese nicho ecológico. Es decir, estos animales naturalmente portan las STEC pero permanecen sin síntomas y liberan estos organismos al ambiente mediante las heces, siendo la magnitud de esta liberación dependiente de la edad, la dieta, el stress y la estación del año<sup>36</sup>. Además, las cepas STEC suelen formar parte de la microbiota de tres especies rumiantes: Ganado bovino, ovejas y caprinos. Otras especies animales han sido identificadas como hospederos más esporádicamente como gatos, cerdos, perros y pollos<sup>37</sup>

Potencialmente el modo más frecuente de transmisión es a través del consumo de comida ó agua contaminada con cepas STEC, principalmente carne mal cocida ó productos no pasteurizados<sup>38</sup>. Sin embargo, la transmisión persona-persona ha sido documentada esporádicamente durante los brotes<sup>39</sup>

### 2.1.3- TRATAMIENTO

Las infecciones por STEC pueden ser asintomáticas ó comenzar con una diarrea acuosa que progresa o no, a diarrea sanguinolenta (colitis hemorrágica) al cabo de 1 ó 2 días de infección. Posteriormente pueden aparecer las complicaciones sistémicas que se manifiestan clínicamente como SUH. Hasta el presente no hay un modo de predecir quien evolucionara hacia la enfermedad. Una vez establecida, no existe un tratamiento específico que pueda impedir la progresión del daño que causa la toxina en los diferentes órganos, siendo el más común el daño renal. El tratamiento comprende medidas terapéuticas destinadas a corregir las alteraciones hidroelectrolíticas, hematológicas, neurológicas ó la hipertensión arterial durante el período agudo. Entre los tratamientos paliativos se encuentran la transfusión de glóbulos rojos, y de plaquetas; además en fases tardías de la enfermedad, se suele utilizar la diálisis peritoneal<sup>31</sup>.

La anemia debe tratarse cuando el hematocrito disminuye a cifras del 20 % y deben utilizarse glóbulos rojos desplasmalizados a 10 ml/kg. La infusión de plaquetas se reserva a los casos de disminución muy marcada y previa a procedimientos quirúrgicos.

La infusión ó intercambio de plasma fresco puede resultar efectivo en casos no típicos de SUH<sup>40</sup> mientras que la administración de gama globulinas endovenosas o glucocorticoides no son eficaces<sup>41 42</sup>. Son indicaciones de diálisis peritoneal la anuria mayor de 72 hs, hipervolemia, hiperkalemia, hiponantremia, alteraciones neurológicas, hipertensión arterial sostenida ó la necesidad de suministrar proteínas para evitar la desnutrición. Por último, la vitamina E como terapia antioxidante podría resultar beneficiosa aunque no ha sido probada en estudios controlados<sup>40</sup>.

Los antibióticos, herramienta para combatir una infección bacteriana, no son recomendables ya que aumentan el riesgo de contraer el SUH por dos motivos. En primer lugar, se ha demostrado que algunos antibióticos aumentan la producción de la toxina por parte de la bacteria, y en segundo término, la lisis de la bacteria en el intestino provocaría una liberación masiva de Stx, y por lo tanto, aumentaría el pasaje de la misma a la circulación<sup>38,43</sup>. De la misma forma, los agentes que evitan la motilidad, impiden la eliminación de la bacteria por las heces aumentando el tiempo de exposición a la toxina, por lo que resultan perjudiciales para el paciente<sup>38</sup>. Teniendo en cuenta la alta afinidad de la toxina por su receptor, Gb3, se pensó en una estrategia que podría ser la administración oral de análogos del Gb3 con capacidad de unir Stx y evitar su translocación. Así se realizó un estudio donde se administraba un compuesto formado por una matriz de silicona no absorbible, que tenia ligado Gb3 (SYNSORB. Pk). Los pacientes que recibieron este compuesto, tuvieron igual evolución que aquellos que no lo recibieron<sup>44</sup>, lo que sugirió que una vez que comienza la diarrea sanguinolenta, la toxina ya ha llegado a la

vasculatura sanguínea y se ha diseminado por la circulación, de manera tal que impedir el pasaje de más Stx por la barrera intestinal no presentaría mayores beneficios. Otra posible explicación de porque no ha resultado este compuesto, es que los monómeros del receptor tengan baja afinidad por la toxina.

Otro grupo estudio la estructura cristalizada de la subunidad B<sub>5</sub> de la Stx1 producida por *E. coli* y su interacción con carbohidrato análogo de su receptor, con el fin de diseñar un ligando oligovalente soluble en agua, llamado STARFISH, con una actividad inhibitoria a concentraciones sub-nanomolar. La actividad inhibitoria del mismo, *in vitro*, es de 1 a 10 millones de veces mas alta que los ligandos univalentes. La cristalografía del complejo STARFISH-Stx1 muestra la capacidad de captar las 5 subunidades B de dos moléculas de toxina. Si bien aún no se han realizado ensayos en pacientes con este compuesto, podría ser utilizado para administrarlo vía endovenosa y pegarse a la toxina circulante<sup>45</sup>. Por otro lado Paton *et al*, han diseñado una bacteria recombinante que puede expresar en su superficie el receptor de la toxina (Gb3), para adsorber y neutralizar la misma. En ratones, la administración de esta bacteria viva ó fijada con formaldehído, tres veces por día, protege completamente a los animales ante el desafío con STEC<sup>45,46</sup>. La inmunización pasiva ó activa también se encuentra en investigación con resultados alentadores. Estudios en cerdos y conejos demostraron que la inmunización con el toxoide de la variante Stx2e protegió a los animales del desafío con una *E. coli* productora de Stx2e<sup>47,48</sup>. Similarmente, se demostró que la inmunización de conejos con toxoides de la Stx1, Stx2 ó la subunidad A ó B, protege de la muerte e inhibe la toma de la toxina marcada con <sup>125</sup>I por los órganos blanco, siendo la misma depurada por el hígado y bazo<sup>49,50</sup>. Por otra parte, un estudio en ratones muestra que un anticuerpo monoclonal anti-Stx, disminuye la mortalidad ante el desafío con STEC, inclusive cuando el mismo es administrado 24 hs luego de la inoculación de la bacteria<sup>51</sup>. Otra posibilidad seria desarrollar vacunas antiadhesinas. Conejos inmunizados con un cepa atenuada de *E. coli*, (posee la intimina truncada pero expresa aun antígenos somáticos), desafiados con bacterias virulentas expresando Stx1, no mostraron señales clínicas de la enfermedad. Esta estrategia de atenuación del mecanismo de “*attaching/effacing*”, podría ser útil para desarrollar vacunas eficientes y evitar las infecciones con bacterias *E. coli* Enterohemorrágicas (EHEC)<sup>52</sup>.

Finalmente es importante destacar que la eficacia de cualquiera de los tratamientos dependerá en gran medida de lo prematuro de su administración, que deberá ser incluso anterior al diagnóstico del SUH, ya que por la experiencia clínica y los resultados mostrados a lo largo de la bibliografía, los mecanismos patogénicos ya se han desencadenado. Por lo tanto, esta posibilidad futura debe desarrollarse conjuntamente con métodos de diagnóstico que permitan anticipar la evolución al SUH a partir de la infección con STEC

Recientemente, se ha reportado un incremento en la viabilidad de células epiteliales de túbulo proximal de riñón humano (HRTEC) en presencia de Stx2, cuando han sido preincubadas con un inhibidor específico de la enzima glucosilceramida sintasa la cual participa en la síntesis del Gb3. Este compuesto, llamado comercialmente C-9 ((1R, 2R)-nonanoic acid [2-(2',3'-dihydro-benzo[1-4]dioxin-6'-yl)-2-hydroxy-1-pyrrolidin-1-ylmethyl-ethyl]-amide- L-tartaric acid salt), disminuiría la expresión del receptor de la Stx, la cual es alta en condiciones basales en este tipo de epitelio. Esto podría servir como aproximación hacia una nueva estrategia para neutralizar la acción de Stx2.<sup>53</sup>

## 2.2.- ESTRUCTURA DE LA Stx.

Se han identificado dos tipos de toxinas Shiga, Stx1 y Stx2, codificadas en bacteriófagos integrados en el genoma bacteriano, que una vez internalizadas en la célula blanco (por endocitosis vía receptor) causan, en general, inhibición de la síntesis proteica y/o muerte celular por apoptosis<sup>54</sup>. La familia de Stx1 consiste en las variantes Stx1c y Stx1d, mientras que la de Stx2: Stx2c, Stx2c2, Stx2d, Stx2e. Se ha encontrado que las cepas productoras de Stx1 solamente ó Stx1 en combinación con Stx2, son menos virulentas que aquellas que producen sólo Stx2.<sup>55</sup> Si bien estas variantes (Stx1 y Stx2) son antigénicamente diferentes, comparten algunas características biológicas importantes: ambas son holotoxinas compuestas de una subunidad A activa de 32 kDa y cinco subunidades B asociadas no covalentemente de 7.7 kDa cada una, que intervienen en la unión al receptor específico; ambas toxinas poseen actividad de *N*-glicosidasa, y actúan depurinando un residuo específico de adenina del rRNA 28S de los ribosomas de las células eucariotas, inhibiendo la síntesis de proteínas. Si bien se han descrito distintos receptores capaces de unir la Stx, conformados por glicolipídicos que poseen el disacárido terminal Galactosa  $\alpha$ 1-4 Galactosa  $\beta$ 1-4, el globotriosilceramida ó Gb<sub>3</sub> es el que se encuentra en las células endoteliales y el que posee mayor afinidad por la toxina<sup>56</sup>.

En cuanto a la actividad *in vivo* de las distintas variantes de Stx, se ha demostrado en estudios en ratones que la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) de la Stx2 es 400 veces menor que para la Stx1<sup>57</sup>. La Stx2 es más estable que la Stx1, aunque la Stx1 posee 10 veces más afinidad por el Gb<sub>3</sub> que la Stx2. Sin embargo, la capacidad de inhibir la síntesis de proteínas de ambas toxinas es equivalente<sup>57</sup>.

### **Estructura de la Toxina Shiga (Stx)**

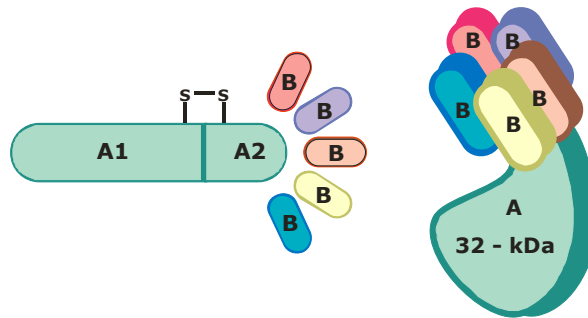
**Subunidad A:** actividad N-glicosidasa contra el rRNA 28S

**Subunidad B:** forma un pentámero capaz de unirse al receptor específico

**A1:** 27.5 kDa

**A2:** 4.5 kDa

**B:** 7.7 kDa



#### **2.2.1- TRANSPORTE RETRÓGRADO DE LA Stx**

Luego de unirse a su receptor, la Stx es internalizada vía vesículas cubiertas con clatrina, y sufre un transporte denominado retrógrado, que la conduce desde los endosomas al Golgi, de allí al retículo endoplasmático (RE), y finalmente al citoplasma<sup>58,59</sup>. Para mediar su actividad de glicosidasa, la subunidad A debe separarse de las subunidades B y sufrir un corte proteolítico que da lugar a dos péptidos unidos por un puente disulfuro (A1 de 27.5 kDa y A2 de 4.5 kDa). La reducción posterior del puente disulfuro que conecta ambas cadenas de la subunidad A, libera la cadena A1 catalíticamente activa, la cual se transloca al citoplasma para interactuar con el ribosoma e inhibir la síntesis de proteínas.

Poco se conoce de los mecanismos que median el transporte retrógrado de la Stx. El transporte desde los endosomas hacia el Golgi ocurre vía el compartimento de reciclaje endocítico, que transporta a la Stx al Golgi en estructuras cubiertas con clatrina que contienen AP1<sup>60,61</sup>. En el pasaje de la Stx al citoplasma de la célula no intervienen los transportadores TAP implicados en el procesamiento antigénico, y se especula con la participación del translocón Sec61p, el cual normalmente transloca las proteínas mal plegadas desde el Golgi al citoplasma para su degradación en los proteasomas. La disociación de las subunidades B y el corte realizado por la furina en la subunidad A podrían provocar cambios en el plegamiento que resultarían en la exportación al citoplasma vía el translocón Sec61p<sup>60,61</sup>.

#### **2.2.2- RECEPTORES DE LA Stx**

La subunidad B de la Stx se une específicamente a receptores de la familia de los glicosfingolípidos, componentes importantes de todas las membranas de las células eucariotas.

La estructura general de los glicoesfingolípidos consiste en una cabeza polar con una o más azúcares y una porción no polar de ceramida, compuesta por una cadena de ácido graso unida a una base de esfingosina por un puente amino. La Stx1 y Stx2 se unen a glicoesfingolípidos que constituyen el sistema antigénico del grupo sanguíneo P y poseen el disacárido terminal Gal  $\alpha$ 1-4 Gal $\beta$ 1-4, principalmente al globotriosilceramida (Gb<sub>3</sub>, CD77 ó P<sup>k</sup>), y en menor grado al galabiosilceramida y galactosilneolactotetraglicosilceramida (P1) <sup>62,63</sup>. Si bien la citotoxicidad de Stx esta ligada a la expresión de su receptor específico en la superficie celular, la sensibilidad de una célula a la toxina no solo se correlaciona con la cantidad de Gb<sub>3</sub> expresado en su superficie sino también con la estructura del receptor. Modificaciones de la longitud de la cadena de ácidos grasos del Gb<sub>3</sub> o disociación del Gb<sub>3</sub> de los arreglos lipídicos de la membrana pueden conducir a una terminación prematura del transporte retrogrado al complejo de Golgi <sup>58,59</sup> ó a un compartimento lisosomal <sup>27</sup>, resultando en una tolerancia a la inhibición de síntesis proteica

El Gb<sub>3</sub> está presente, bajo condiciones normales, en túbulos proximales del tejido renal, linfocitos B de centros germinales y células endoteliales humanas. <sup>64,65</sup>. Dentro del tejido renal, Lingwood *et al.* han detectado unión de la toxina tanto en la corteza como en la médula, principalmente en túbulos distales y colectores en adultos y niños y en los glomérulos de niños.

### **2.2.3- DAÑO ENDOTELIAL Y EPITELIAL: CURSO DE LA INFECCIÓN**

#### **2.2.4.- INTERACCIÓN DE LA Stx CON CÉLULAS ENDOTELIALES.**

El efecto de la Stx sobre las células endoteliales *in vitro* ha sido extensamente estudiado. En las células endoteliales de cordón umbilical humanas (HUVEC) la toxicidad de la Stx, medida como viabilidad o como inhibición de la síntesis de proteínas, sólo se hace evidente luego de la pre-estimulación con factores pro-inflamatorios como TNF $\alpha$ , IL-1, LPS, ó con el factor de diferenciación butirato de sodio <sup>66-69</sup>. En todos los casos, la sensibilización hacia la Stx es consecuencia de un aumento de la expresión del Gb<sub>3</sub>, aunque los mecanismos por los cuales este fenómeno se produce, parecen ser diferentes para los distintos factores<sup>70</sup>. En ciertos casos, activan factores de transcripción que finalmente inducen la expresión del receptor de Stx, y en otros casos, como el TNF $\alpha$ , induce el aumento de la actividad de una galactosil-transferasa involucrada en la síntesis del Gb<sub>3</sub> <sup>67</sup>. El efecto del butirato de sodio parece involucrar un cambio en la composición lipídica del receptor Gb<sub>3</sub><sup>71</sup>. La composición de los ácidos grasos del receptor afectan la unión de la toxina por lo que además de aumentar la cantidad de Gb<sub>3</sub> en las HUVEC, el butirato de sodio estaría incrementando la afinidad de la Stx por su receptor.



### **2.2.5.- INTERACCIÓN DE LA Stx CON LOS TIPOS CELULARES DEL RIÑÓN**

#### **- Células endoteliales glomerulares**

Si bien se suponía que los efectos de la Stx sobre células endoteliales provenientes de la microvasculatura renal podrían ser diferentes con respecto a células endoteliales de otro origen, Van Setten *et al.* demostraron que las células endoteliales de glomérulo renal humano responden de la misma forma que las HUVEC<sup>70</sup>. Es decir, este tipo celular de microvasculatura es básicamente insensible a la Stx, pero los efectos tóxicos se hacen evidentes luego de la pre-estimulación con los factores pro-inflamatorios anteriormente mencionados. Esta sensibilización también involucra el aumento del Gb<sub>3</sub>, y es dependiente del grado de confluencia de las células, siendo las células subconfluentes las más sensibles.

El daño endotelial también estimula la expresión de adhesinas vasculares, como ICAM y VCAM, las cuales tienen un rol importante en la adhesión del leucocitos al endotelio.

#### **- Células mesangiales**

Las células mesangiales constituyen un componente importante en la regulación de la homeostasis del glomérulo renal y son capaces de producir factores de crecimiento, citoquinas, prostaglandinas y radicales del oxígeno. El efecto de la Stx en cultivos puros de células mesangiales humanas demostró diversos efectos específicos en este tipo celular. Si bien la Stx no afecta la viabilidad ni induce la liberación de citoquinas ó quimioquinas de estas células, tanto la síntesis de proteínas como la proliferación se encuentran inhibidas en presencia de Stx. Asimismo, el efecto de inhibición de la mitosis estaría mediado por la subunidad B de la Stx siendo independiente de la inhibición de la síntesis de proteínas. Cuando se caracterizó el receptor glicolipídico por cromatografía de capa delgada, se encontraron tres bandas, dos de las cuales están presentes en las células endoteliales glomerulares y constituyen distintas formas del Gb<sub>3</sub> (distintas en contenido lipídico) y una tercer banda que coincide con la encontrada en los monocitos humanos. La preincubación con TNF $\alpha$  aumenta la cantidad de receptores para la Stx, así como también potencia los efectos de la Stx en la inhibición de la síntesis de proteínas y mitosis<sup>70</sup>.

#### **- Células epiteliales glomerulares.**

Las células epiteliales glomerulares humanas también responden a los efectos tóxicos de la Stx. Estudios de Hughes *et al*<sup>72 73</sup> demostraron la presencia del receptor Gb<sub>3</sub> en este tipo celular. La incubación con la Stx por si misma, produce una marcada inhibición de la síntesis de proteínas en cultivos puros de células epiteliales glomerulares humanas, si bien el efecto en la

viabilidad es menor. Por otra parte, y de la misma forma que lo observado en células endoteliales, la toxicidad de la Stx se ve incrementada al preincubar las células epiteliales glomerulares con factores como TNF $\alpha$ , IL-1 LPS o butirato de sodio, efecto mediado por el aumento del contenido de Gb<sub>3</sub>. Los efectos específicos de la Stx sobre la producción de citoquinas en estas células no son tan claros, ya que la Stx induce la producción de TNF $\alpha$ , IL-1 e IL-6, aunque esta producción es imitada (incluso en mayor grado) por el inhibidor de la síntesis de proteínas cicloheximida <sup>74</sup>

#### **- Células epiteliales del túbulo renal**

El daño inducido por la Stx en el D+SUH se produce principalmente en el riñón, y si bien se supone que la injuria al endotelio glomerular es el principal fenómeno involucrado en la fisiopatología de la enfermedad, biopsias renales humanas revelan un extensivo daño en los túbulos proximales asociado a la apoptosis <sup>30,75</sup>. Similarmente, estudios realizados en ratones, como modelo *in vivo*, permitieron observar la presencia de células apoptóticas en el epitelio tubular en respuesta a la infección con STEC <sup>76</sup>. Asimismo, pacientes con D+SUH presentan, tempranamente en el curso de la enfermedad, marcadores de daño tubular en la orina como urea, creatinina y la unión de la Stx en secciones renales de individuos normales se produce principalmente en los túbulos <sup>77,78</sup>.

Esto apunta a las células epiteliales tubulares como un blanco importante de la acción de la Stx. Estudios *in vitro* revelan que la Stx es citotóxica para las células epiteliales tubulares humanas, efecto mediado por el receptor Gb<sub>3</sub> y acompañado por la inhibición de la síntesis de proteínas y la apoptosis <sup>76,79</sup>. Además se demostró recientemente que la interacción de la Stx2 con el Gb3 sobre células epiteliales de riñón, podría deslocalizar los transportadores y canales de membrana responsables de la reabsorción proximal de fluido y explicar la poliuria que se describe en algunos pacientes con SUH al comienzo de la insuficiencia renal. <sup>80</sup>

Por otra parte, la incubación con Stx aumenta la liberación y niveles de mRNA del TNF $\alpha$  y de la IL-1, aunque en el caso de la IL-1 estos efectos serían inespecíficos, ya que también se observan con la cicloheximida <sup>79</sup>. Estos resultados indican que las células epiteliales tubulares podrían ser un temprano blanco de la Stx en el riñón y que la consecuente producción de TNF $\alpha$  podría sensibilizar a las células endoteliales a los efectos tóxicos de la toxina.

### **2.3.-- ROL DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA:**

Si bien la forma epidémica del SUH ha sido asociada con la presencia de Stx, existen numerosas observaciones *in vivo e in vitro* que demuestran que la respuesta inflamatoria es necesaria para el desarrollo de la patogénesis.

Los lipopolisacáridos (LPS) son componentes naturales de la pared de las bacterias gram negativas que acompañan a la Stx en las infecciones por STEC y son potentes mediadores inflamatorios. Distintos tipos celulares responden a los LPS con la producción de citoquinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 como en el caso de monocitos o células endoteliales<sup>81</sup>, ó con la activación de mecanismos citotóxicos y secreción de proteasas e intermediarios reactivos del oxígeno (IROs) en el caso de los PMNs <sup>82</sup>. El rol de los LPS en el curso del SUH ha sido estudiado en ratones normales e hiporespondedores al LPS. En estos últimos, la inoculación de STEC de forma intragástrica no produjo los síntomas tempranos observados en los animales normales, lo que sugiere cierta protección a los efectos de la infección, si bien se observaron manifestaciones tardías, relacionadas con la imposibilidad de deshacerse de la bacteria. Por otra parte, la interacción recíproca de los efectos de los LPS y la Stx varían según el esquema utilizado. En ratones, una dosis no letal de LPS es capaz de aumentar la muerte mediada por la Stx al ser inyectada una hora antes de la toxina, mientras que un efecto protector se observa cuando los LPS son administrados más tempranamente (18 hs antes de la inoculación de la Stx) <sup>83</sup>. Los efectos potenciadores de la toxicidad de la Stx pueden ser interpretados como la coincidencia entre la máxima actividad inflamatoria del LPS y la injuria mediada por la Stx. En cambio, los efectos protectores podrían ser consecuencia de los efectos antagónicos entre una respuesta antiinflamatoria tardía inducida por los LPS y la toxicidad de la Stx <sup>83</sup>.

Por otra parte, los efectos de los LPS en la inducción del receptor de la toxina y potenciación del daño mediado por la Stx *in vitro* en distintos tipos celulares involucrados en la fisiopatogenia del SUH, ya han sido comentados. Estos efectos pueden ser directos o indirectos, como consecuencia de la producción de citoquinas inflamatorias en respuesta a los LPS. En línea con esto, se ha descrito que las células endoteliales aumentan notablemente su susceptibilidad a la Stx luego de la incubación con LPS, TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  <sup>66</sup> ; <sup>67,84-87</sup>. Además en el modelo murino, la mortalidad y el daño renal inducidos por la Stx son exacerbados por el pre-tratamiento con LPS <sup>88</sup>. En resumen la toxina, los LPS y el daño endotelial inducido por ambos, activan al sistema inmune innato desencadenando una fuerte respuesta inflamatoria.

Dentro del marco de la clínica médica, también existen evidencias que señalan que la enfermedad causa una fuerte activación de la respuesta inflamatoria.

### ***Mediadores solubles de inflamación***

1) Niveles elevados en suero y orina de: IL6, IL8 <sup>89</sup>, IL10, TNF $\alpha$  <sup>90</sup>, TGF <sup>91</sup>, sistema Fas-FasLigando, factores de coagulación<sup>92</sup>

### ***Componentes celulares de la respuesta innata o inflamatoria***

**1)** Los **polimorfonucleares neutrófilos (PMNs)**, primera población en responder a una señal de daño, son células terminales con una vida media de 6-8 hs, y poseen una gran capacidad microbicida y citotóxica, fundamentalmente a través del contenido de sus gránulos intracitoplasmáticos (reservorios de enzimas y proteínas de membrana). Las vesículas secretorias son las primeras en ser degranuladas ante un estímulo liberando fundamentalmente receptores y moléculas de adhesión, lo cual le permite responder rápidamente a las alteraciones que presenta un endotelio activado dañado. Otros de los gránulos del PMN, contienen enzimas degradadores de la matriz extracelular (colagena, gelatinasa); y gránulos conteniendo enzimas bacteriostáticas y bactericidas (mieloperoxidasa, elasta, catepsina). La liberación de los gránulos es secuencial, lo cual es de gran utilidad en la clínica médica ya que permite evaluar según las moléculas en la superficie del PMN, el estado de activación del mismo.

En los pacientes con SUH, el número de PMN se encuentra incrementado (neutrofilia). Diferentes autores han postulado la participación de los PMN en la patogénesis del SUH a partir de evidencias clínicas y experimentales. Mas aún el incremento de estos leucocitos, ha sido señalado como indicador de mal pronóstico de la enfermedad<sup>93</sup>. En distintas autopsias de niños con SUH se han encontrado infiltrados de PMN en tejido renal, y los PMN de los pacientes en el momento agudo muestran mayor adhesividad a los endotelios. Paralelamente en el suero de los mismos se encuentran niveles aumentados de elastasa (proveniente de la degranulación de PMN) e IL8, principal quimioquina activadora de los PMN<sup>94,95</sup>. Fernández *et al* demostraron que en el modelo murino de SUH, la Stx induce neutrofilia, y que los PMN de sangre periférica presentan marcadores de activación, y poseen mayor capacidad citotóxica y adhesión a la vasculatura endotelial<sup>96</sup>. Los PMN circulantes de los pacientes durante el periodo agudo, muestran pérdida de CD16 (receptor de Fc para inmunoglobulinas tipo III) y CD11b, menor capacidad de degranularse y liberar marcadores en respuesta a citoquinas (TNF $\alpha$ , GM-CSF, IL-8) y también menor generación de IROS. Esto demuestra que esta subpoblación de leucocitos está parcialmente desactivada, acompañado de menor funcionalidad cuando los pacientes son hospitalizados<sup>97,98</sup>

**2)** Las **plaquetas** participan activamente del proceso de coagulación en respuesta al daño endotelial. Los pacientes con D+SUH presentan trombocitopenia y defectos en la función plaquetaria, así como también niveles reducidos de moléculas presentes en sus gránulos, como ADP, serotonina y  $\beta$ -tromboglobulina<sup>99</sup>. Lo que aún no ha sido claramente establecido es si este fenómeno, denominado de plaquetas exhaustas, es consecuencia directa de la Stx y central en la patogénesis del SUH o simplemente un efecto secundario al daño endotelial. Si bien diversos

estudios no han encontrado una alteración de la agregación plaquetaria o de la secreción de gránulos  $\alpha$  en respuesta directa a la Stx<sup>22,100</sup>. Karpman *et al.* demostraron que tanto la Stx como el pentámero de subunidades B, son capaces de inducir activación plaquetaria, evidenciada como formación de agregados y cambios ultramorfológicos, así como también por ensayos funcionales de unión a fibrinógeno y retención plaquetaria<sup>22</sup>. Debido al consumo de plaquetas se produce trombocitopenia, con aparición de hemorragias espontáneas. La interacción endotelial-plaquetaria y el reclutamiento de leucocitos polimorfonucleares agrava aun mas el daño endotelial, por lo cual, los pacientes tienen la función plaquetaria defectuosa, no solo en menor número, sino también con niveles reducidos de moléculas presentes en sus gránulos<sup>99,101</sup>

**3)** Fisiológicamente, el **óxido nítrico (ON)** es el encargado del mantenimiento de las propiedades antitrombogénicas del endotelio mediante la inhibición de la agregación plaquetaria e inhibición de la adhesión de PMNs y plaquetas<sup>102,103</sup>. Sin embargo, la hiperproducción de ON en respuesta a un proceso inflamatorio puede causar daño de las propias células. La concentración en plasma del sustrato de la enzima que produce el ON en los pacientes con D+SUH se encuentra disminuida, mientras que el derivado del ON, el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), está aumentado. Estos valores retornan a la normalidad luego de la recuperación clínica de los pacientes, sugiriendo la activación de la síntesis del ON en el período agudo del D+SUH<sup>104</sup>. Además se ha reportado, que en el modelo murino de SUH, inhibiendo óxido nítrico sintetasa mediante la administración de L-NAME (NG-nitro-L-arginina metil ester), se incrementa el daño renal y la letalidad, a través de un mecanismo que involucra la activación de las plaquetas<sup>105</sup>.

**4)** Los **Monocitos** son leucocitos que representan del 4 a 8% en la sangre. Poseen un núcleo arriñonado (forma de riñón), y abundante citoplasma, pudiendo estar acompañado de vacuolas blanquecinas. Los monocitos se generan en la médula ósea y después viajan por la sangre, para luego emigrar a diferentes tejidos como hígado, bazo, pulmones, ganglios linfáticos, hueso, cavidades serosas, etc. Después de alrededor de 24 hs de permanecer en el torrente sanguíneo, los monocitos lo abandonan y atraviesan el endotelio de los capilares ó las vénulas poscapilares hacia el tejido conectivo, donde se diferencian rápidamente a macrófagos. Su principal función es la de fagocitosis de microorganismos ó restos celulares, aunque también participan como conexión con la repuesta inmune adaptativa, ya que son células presentadoras de antígenos capaces de inducir la activación de linfocitos T específicos.

### 2.3.1.- MONOCITOS EN EL SUH

Los monocitos humanos incubados con Stx en condiciones *in vitro*, a diferencia de lo que ocurre en el endotelio, no presentan disminución de su viabilidad ni de la síntesis proteica. Por el contrario, se activan y secretan TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-8<sup>20</sup> e incluso la coincubación con LPS, incrementa aún más los niveles de dichos factores inflamatorios. Por otra parte, es importante mencionar que el receptor para la Stx en los monocitos humanos, posee un glicolípido diferente del Gb<sub>3</sub> presente en el endotelio. Aunque la cantidad presente de Gb<sub>3</sub> es baja en condiciones basales, la incubación de los monocitos con LPS induce un aumento en la expresión de este receptor<sup>20</sup>.

También existen evidencias *in vivo*, en modelos murinos, de la relevancia de los monocitos en el desarrollo de la enfermedad. La depleción de macrófagos hepáticos u esplénicos en el modelo murino de SUH protege a los animales de la muerte mediada por la inyección de Stx2<sup>83</sup>. Estos resultados sugieren que las citoquinas producidas por macrófagos en respuesta a la Stx, estarían involucradas en los efectos letales de la toxina.

En pacientes con SUH durante el período agudo, se ha observado que los monocitos periféricos presentan alteraciones en el fenotipo y en su funcionalidad. Esta población leucocitaria, está incrementada en número y porcentaje, mostrando una disminución en la expresión de CD14 (mediador de la respuesta al LPS), CD64 (receptor tipo I para Fc de Igs, involucrado en la fagocitosis), CD11b (receptor para molécula de adhesión) y además una reducida capacidad de producción de TNF $\alpha$  como respuesta a la incubación con LPS, y menor citotoxicidad dependiente de Fc gamma<sup>106</sup>. Otros reportes han demostrado un incrementado nivel de los factores responsables del reclutamiento de monocitos hacia el *sitio target*, tales como G-CSF (factor estimulador de colonias de macrófagos) MIP-1 $\beta$  (macrophage inflammatory protein-1beta), y MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1)<sup>107</sup>. Estos resultados, sumados a la presencia de monocitos en el glomérulo de biopsias de pacientes con SUH<sup>94</sup>, indicarían que esta población leucocitaria está implicada en la patogénesis de la enfermedad. Mas aún, la producción de citoquinas en el riñón, mediada por los monocitos, podría participar en la inducción de receptores para Stx en las células endoteliales, sensibilizándolas a los efectos tóxicos de la toxina y desencadenando el fenómeno trombótico característico. En resumen, el Mo podría participar del daño endotelial mediante la producción de citoquinas inflamatorias, el transporte de la Stx y la acción citotóxica directa sobre el endotelio.

En conclusión, la población de monocitos de niños con SUH, tiene alteraciones fenotípicas y funcionales, lo cual sugiere han recibido un estímulo activador previo al diagnóstico de la enfermedad.

### **2.3.2.- FISIOLOGÍA DE LOS MONOCITOS**

#### ***Diferentes subpoblaciones de monocitos y sus funciones durante las infecciones***

Desde hace más de 20 años, se ha propuesto la existencia de distintas subpoblaciones de monocitos humanos. En un individuo sano, el 90-95% de los Mo circulantes, corresponden a la subpoblación llamada “clásica”, caracterizada por ser CD14<sup>high</sup>CD16<sup>low</sup> mientras que la subpoblación minoritaria (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) es conocida bajo el término “no clásica” ó “inflamatoria”, la cual se caracteriza por su menor producción de IL-10 en respuesta al agonista del TLR4, y mayor secreción de TNF- $\alpha$ <sup>108 109</sup>. Además se ha reportado, que la subpoblación de Mo inflamatorios, puede diferenciarse a células dendríticas (DC), en un modelo de tráfico transendotelial, sugiriendo que podrían ser los precursores en sangre, de las DC migratorias<sup>110</sup>. Otros estudios han demostrado que ambas subpoblaciones difieren también, en la expresión de receptores para quimioquinas, por ejemplo, los Mo inflamatorios poseen alta expresión de CCR5 (receptor de la quimioquina RANTES, MIP-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$ ..), CD16 y CX<sub>3</sub>CR1 (receptor de la quimioquina fractalquina), mientras que los clásicos tienen baja expresión de CCR2 (receptor de la quimioquina MCP-1) y CX<sub>3</sub>CR1<sup>111-113</sup>. Se ha descrito en distintas enfermedades, como HIV, SUH y sepsis, un incremento significativo de los Mo CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> circulantes en sangre periférica (con gran cantidad de TNF $\alpha$  intracelular). En condiciones *in vitro* se ha demostrado que tanto la citoquina TGF- $\beta$  como la IL-10 incrementan la expresión de CD16. En general se simplifica la función de estos Mo, diciendo que tienen funciones pro-inflamatorias durante las infecciones *in vivo*.

La expresión de ciertos receptores para quimioquinas y moléculas de adhesión, tienen consecuencias importantes tanto en la función como en el patrón de migración de los monocitos, e incluso les confieren diferente susceptibilidad a distintas infecciones<sup>114</sup>. Independientemente de cual sea el Mo precursor, que se diferencia a macrófago, es muy importante tener presente, que el fenotipo dependerá de las condiciones que encuentren en el tejido blanco. Tanto citoquinas, quimioquinas, metabolitos del tejido y mediadores inflamatorios pueden influir durante la diferenciación del macrófago e incluso sobre el fenotipo de monocitos circulantes también.<sup>115</sup>

### **2.3.3.- FISIOLOGÍA DE LAS CELULAS NATURAL KILLER (NK)**

Las células Natural Killer (NK) son linfocitos que carecen de receptor T ó B, por lo que pertenecen a la inmunidad innata. Estas células reconocen y son activadas por sus blancos. Poseen receptores inhibitorios que reconocen moléculas del complejo mayor de

histocompatibilidad de tipo I (MHC-I) <sup>116</sup>. Ante ciertas infecciones ó transformaciones malignas, las células afectadas disminuyen la expresión de MHC-I en superficie lo cual las haría virtualmente invisibles a los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, pero a su vez, las transforma en blanco de las células NK, que activarían sus mecanismos citotóxicos en ausencia de inhibición. Esta teoría fue reeditada años más tarde luego de descubrir nuevos receptores ó ligandos que modulan positivamente o negativamente la respuesta NK por mecanismo MHC- I independientes. Además de los ligandos celulares, las células NK están sujetas a la regulación por diferentes mediadores solubles. Las citoquinas IL-7 e IL-15 dirigen su desarrollo y diferenciación mientras que el IFN $\alpha/\beta$ , IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 incrementan su actividad citotóxica y/ó la producción de IFN $\gamma$  <sup>117,118</sup>. Inversamente el TGF $\beta$  y citoquinas de tipo Th2 pueden inhibir ó modular la función NK.

Las células NK, no poseen simplemente la función de eliminar ó “asesinar” a otras células, sino que también influyen en la respuesta adaptativa mediante la secreción de citoquinas.

### ***Subpoblaciones de NK.***

Las células NK humanas pueden ser distinguidas de otras poblaciones linfocitarias por la presencia de una isoforma de la molécula de adhesión neuronal (CD56) y la ausencia de moléculas asociadas al receptor T. A su vez la densidad del marcador CD56 y CD16 (receptor de Fc $\gamma$ RIII), ha permitido definir dos subpoblaciones dentro de las NK: las CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> y las CD56<sup>brigh</sup>CD16<sup>-</sup> <sup>119</sup>. En individuos normales el primer subset, representa el 90-95% de las NK circulantes y las NK CD56<sup>brigh</sup> constituyen el resto. Diversos reportes indican que estas diferencias fenotípicas llevan asociadas diferencias funcionales. Las NK CD56<sup>brigh</sup> son eficientes secretoras de citoquinas y otros mediadores solubles, especialmente IFN $\gamma$ , mientras que la otra subpoblación es altamente citotóxica (dado su alto contenido de perforinas y granzimas) contra células que expresan marcadores de daño. Además expresan diferentes moléculas de adhesión y receptores de quimioquinas, esto podría explicar porque se encuentran diferencias en la localización anatómica entre ambas subpoblaciones.

### **2.3.4.- QUIMIOQUINAS**

La migración de los leucocitos al espacio extravascular implica una cascada de eventos moleculares, incluyendo la elaboración de factores quiomiotáticos y quimioquinas, la respuesta a estos factores, la interacción del endotelio con estos leucocitos, y la trans migración de dichas células a través de las paredes de las venulas <sup>120-123</sup>.



Las quimioquinas, fueron descritas en principio como citoquinas quimioattractantes sintetizadas en el sitio de inflamación, esenciales en el reclutamiento y tráfico de leucocitos. Pueden dividirse en dos categorías:

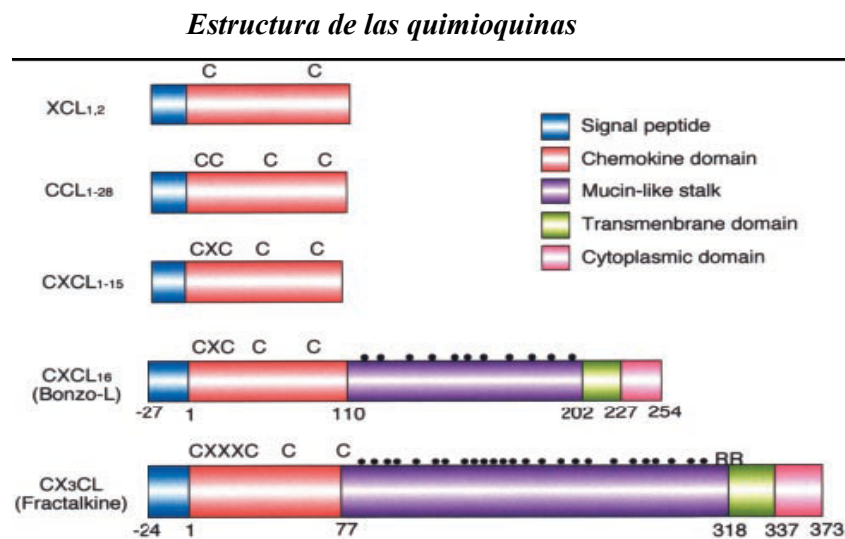
- 1) inflamatorias: son secretadas cuando estímulos tales como infecciones ó desordenes inmunológicos, alteran la homeostasis celular. Son responsables del reclutamiento de leucocitos al sitio de daño tisular o de injuria.
- 2) homeostáticas: responsables del tráfico normal de leucocitos y la formación de la arquitectura de órganos linfoides secundarios.

Se han identificado más de 40 quimioquinas, y se han dividido en 4 subfamilias, de acuerdo al número de aminoácidos que separan las dos primeras cisteínas de su motivo estructural conservado: C-, CC-, CXC- y CX<sub>3</sub>C. <sup>124</sup>. Cada clase de quimioquina, posee diferentes rangos de especificidad para los leucocitos.

### 2.3.4.1.- LA QUIMIOQUINA FRACTALQUINA (CX<sub>3</sub>CL1)

#### Estructura

La fractalquina, es hasta ahora, la única quimioquina descrita en la familia de CX<sub>3</sub>C, pero junto con la CXCL16, contiene múltiple dominios transmembrana que las hacen diferentes de otras quimioquinas, tal como se observa en la siguiente *Figura*:



Los primeros 76 aminoácidos del dominio extracelular de la CX<sub>3</sub>CL1 constituyen el dominio quimiotáctico formado por dos cisteínas (C) separadas por tres aminoácidos. Luego, continúa con un esqueleto de mucinas, un dominio transmembrana y otro intracelular de 37 aminoácidos.

La expresión de CX<sub>3</sub>CL1 en membrana, puede ser inducida en células endoteliales y neuronas por LPS ó citoquinas inflamatorias como TNF $\alpha$ , IL-1, IFN $\gamma$ <sup>126</sup> y recientemente se ha descrito también por Stx2<sup>127</sup>. La fractalquina a diferencia de otras quimioquinas, puede expresarse anclada a membrana, actuando como molécula de adhesión y provocando una fuerte adhesión, independiente de la activación de integrinas. Mediante microscopía confocal, se ha observado que los leucocitos se adhieren mas rápido a la CX<sub>3</sub>CL1 inmovilizada que a la VCAM (vascular cell adhesion molecule-1). La forma soluble puede ser liberada luego del clivaje en la región próxima a la membrana, por acción de las enzimas con dominio desintegrina y metaloproteasa: ADAM17 (TNF $\alpha$  converting enzyme ó TACE) y ADAM10<sup>128,129</sup>. Este péptido liberado, posee gran actividad quimiotáctica hacia los monocitos, células natural killer (NK) y linfocitos T<sup>126</sup> que expresan el receptor CX<sub>3</sub>CR1. Debido a que el endotelio es la primera barrera para la trans migración de los leucocitos, la presencia de CX<sub>3</sub>CL1 sobre él, participa en el control de la extravasación de los leucocitos al sitio de inflamación<sup>130,131</sup>

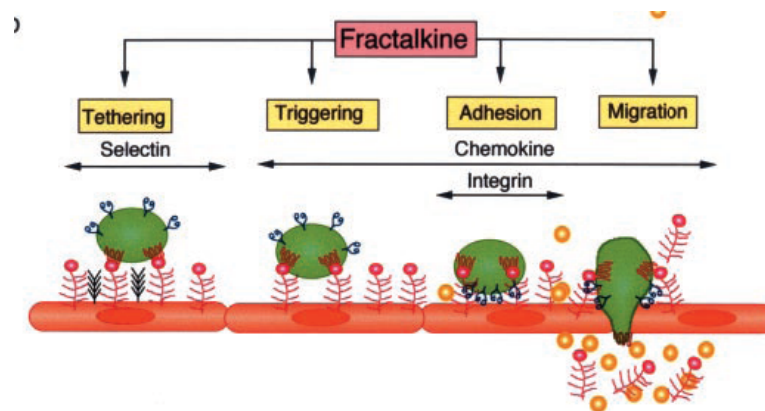
### ***Propiedades de adhesión:***

Las diferentes subpoblaciones de leucocitos son reclutadas a distintos compartimentos en condiciones normales ó injuriados, según el patrón de expresión de quimioquinas y moléculas de adhesión.

La infiltración de los leucocitos al sitio donde se produjo el daño, es una característica de casi todos los procesos inflamatorios. La extravasación de las células inflamatorias desde el torrente sanguíneo al tejido, es un evento coordinado que implica la adhesión de estas células al endotelio vascular, seguido de un movimiento direccionado hacia el tejido. Este proceso complejo, está regulado por varias familias de moléculas como selectinas, integrinas, quimioquinas y receptores de quimioquinas. Las selectinas median el contacto inicial entre el leucocito y la vena sanguínea, provocando que el leucocito frene su “rolling” sobre el endotelio vascular. Luego para evitar que sean arrastrados por el torrente sanguíneo, se necesita una firme adhesión. Allí es cuando aparecen las quimioquinas. En los sitios de injuria generalmente se induce la expresión de quimioquinas secretadas como factores solubles, que se unen a proteoglicanos y componentes de la matriz tisular (glicosaminos) para mantener el gradiente local y luego difundir hacia la zona circundante.<sup>132</sup>. Cuando las quimioquinas se

encuentran con los leucocitos que están en “rolling”, se a través de la unión a sus receptores específicos activan la proteína G que tienen acoplada<sup>120,133</sup>, y generan una señal que transforma las integrinas de baja a alta afinidad sobre los leucocitos. De esta manera se produce un firme arresto mediante la interacción integrina-moléculas de adhesión que fueron upreguladas en el endotelio activado. El paso siguiente es la extravasación de los leucocitos siguiendo el gradiente de quimioquinas, que difunde desde el sitio de la injuria hacia la periferia.<sup>134</sup>

En el caso particular de la fractalquina, la misma molécula actúa como molécula de adhesión, por eso facilitaría la extravasación de los leucocitos mediando desde la adhesión inicial hasta el paso de trans migración<sup>130</sup>, tal como se observa en la siguiente *Figura*:



*Trends in Immunology, Vol 22 (11); November 2001*<sup>125</sup>

La CX<sub>3</sub>CL1, además de su función intrínseca de adhesión puede inducir sobre el CX<sub>3</sub>CR1 la activación de la proteína G, acoplada a ese receptor causando un aumento de la avidéz de las integrinas en el leucocito<sup>135</sup>. De esta manera, el entrecruzamiento del CX<sub>3</sub>CR1 y las integrinas, a través de la co-expresión de CX<sub>3</sub>CL1 y los ligandos para integrinas, como la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1) y la molécula de adhesión vascular (VCAM-1), resultan en un incremento de la adhesión celular comparado con cada sistema por separado<sup>130,136</sup>. Este sistema de cooperación ha sido demostrado incluso bajo condiciones fisiológicas de flujo<sup>137</sup>

### **2.3.5.- EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE RECEPTORES PARA QUIMIOQUINAS EN MONOCITOS.**

Las quimioquinas y sus receptores acoplados a proteínas G, son esenciales en el reclutamiento de diferentes leucocitos a los sitios de inflamación. Luego de la activación, los receptores de quimioquinas sufren un desensibilización parcial o total hacia la estimulación

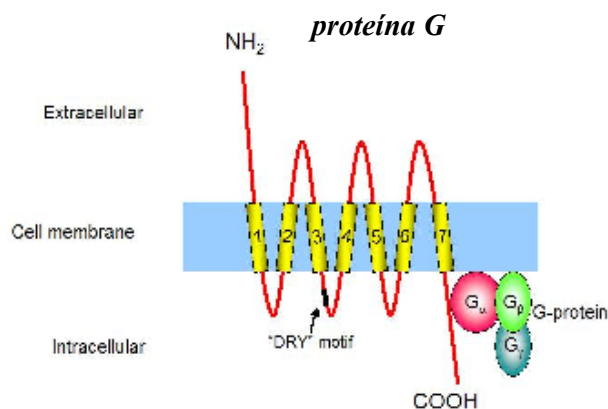
repetida con el mismo u otros agonistas. En dicho proceso, estarían implicadas kinasas acopladas a la proteína G, que podrían fosforilar residuos serina y treonina en la cola C-terminal del receptor. La desensibilización es crítica para el mantenimiento de la capacidad de la célula de sensar gradientes de quimioattractantes <sup>138</sup>

Se ha demostrado el rol de distintas quimioquinas ó de sus receptores en distintas patologías, mediante el uso de ratones Knock Out, en particular, el rol de MCP1 (quimioquina CC monocyte chemoattractant proteína 1) y su receptor CCR2, en la extravasación de monocitos, participando en la formación de lesiones arteroescleróticas <sup>139</sup>. Por otro lado, la quimioquina MIP1 $\alpha$ , mediante su receptor CCR5, participa en la atracción de macrófagos al fluido sinovial ó al tejido en la artritis reumatoidea. En las distintas subpoblaciones de monocitos, se expresan diferentes receptores CCR, por ejemplo, los Mo CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, conocidos como inflamatorios, no poseen CCR2, pero responden migrando ante la presencia de MIP1 $\alpha$ . Por otro lado, la alta expresión de CCR5, podría indicar que este subset tiene predilección para extravasar a sitios inflamatorios que expresan RANTES, MIP1 $\alpha$ , MIP1 $\beta$ .

La expresión polarizada de los receptores CCR en los monocitos, se refleja en sus diferentes respuestas a los estímulos, observándose que los Mo inflamatorios, con alta expresión de CCR5, representan una subpoblación con mucha participación en condiciones inflamatorias de tipo Th1, como por ejemplo, artritis reumatoidea. Además este subset, se expande significativamente ante infecciones con HIV, siendo el CCR5 un importante co-receptor para permitir la entrada del virus a las células blanco. En este contexto, también se ha descrito que durante enfermedades infecciosas, se expande la subpoblación de Mo CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, lo cual podría ser consecuencia del efecto de citoquinas inflamatorias que inducen mayor expresión de algunos receptores.

Las quimioquinas además de participar en la migración de leucocitos, pueden incrementar en los monocitos, la expresión de la integrina Mac1- $\beta$ 2 (CD11b/CD18), que actúa como receptor de la molécula ICAM, involucrada en la adhesión <sup>111</sup>

***Esquema de un receptor de quimioquinas, con sus siete pasos transmembrana acoplado a***

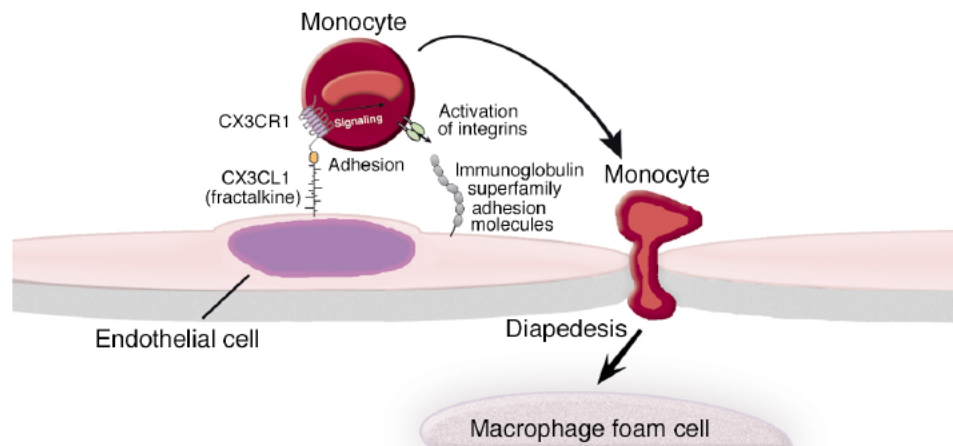


### **Características y funciones del receptor para fractalquina, CX<sub>3</sub>CR1**

El CX<sub>3</sub>CR1, al igual que los otros receptores de quimioquinas, consta de siete pasos transmembrana y está acoplado a proteína G, lo cual le permite en este caso, transducir señales para aumentar la avidéz de las integrinas hacia sus ligandos <sup>135</sup>. Como hemos mencionado previamente, se expresa en monocitos, células NK (subpoblación CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>) y algunos linfocitos T (mayoritariamente en reposo y T CD8<sup>+</sup>) <sup>140</sup>

#### **- En los Monocitos:**

Los monocitos tienen como función, entre otras, el patrullaje del endotelio y tejidos, sensando señales de daño o injuria. En esta función en particular, parece que los Mo con alta expresión de CX<sub>3</sub>CR1, poseen gran capacidad de trasvasación, siendo los primeros en llegar al tejido luego de la exposición a agentes injuriantes ó heridas <sup>141</sup>. *Combadiere et al* <sup>142</sup>, caracterizaron el CX<sub>3</sub>CR1 transfectando establemente una línea celular con el cDNA, y demostraron que mediaba la quimiotaxis hacia la fractalquina soluble de manera dosis dependiente, con una concentración optima de CX<sub>3</sub>CL1 de 100 a 20 nM. Este reporte fue uno de los primeros artículos donde se identificó a la CX<sub>3</sub>CL1, como ligando específico del CX<sub>3</sub>CR1.



*J. Clin. Invest.* 111:1118–1120; (2003). <sup>143</sup>

#### **- En NK:**

Dentro de la población de células NK, las CD56<sup>dim</sup> son las que tienen alta expresión de CX<sub>3</sub>CR1, y en particular son las que participan en la inmunidad contra virus y transformaciones neoplásicas <sup>144</sup>, pero también inducen la lisis de células “dañadas”. En este proceso la interacción mediada por CX<sub>3</sub>CL1-CX<sub>3</sub>CR1 podría colaborar en la citotoxicidad, ya que se ha reportado que la incubación de células NK con fractalquina soluble, provoca la activación de la proteína G

acoplada a CX<sub>3</sub>CR1, causando finalmente la exocitosis de mediadores líticos (perforinas y proteasas) contenidos en sus granulos. Estos datos en conjunto sugieren que la expresión de fractalquina en el sitio de inflamación, atrae y activa células NK, mediante el CX<sub>3</sub>CR1 entre otras moléculas de adhesión. .

Se ha encontrado que la IL15, esencial para el desarrollo celular y mantenimiento de las NK, disminuye la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 en PBMC de ratón <sup>145</sup>, a diferencia de la IL2 que lo *upregula* <sup>146</sup>. Ha sido reportado que el entrecruzamiento del CD16 en células NK, y la estimulación con fitohemaglutinina en linfocitos T CD3<sup>+</sup>, logra disminuir la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 <sup>140 147</sup>.

#### **- En Linfocitos:**

Dentro de la población de linfocitos T helper, el CX<sub>3</sub>CR1 se expresa preferencialmente en las células Th1, con perfil de respuesta celular, las cuales responden a la fractalquina. En el caso de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> que expresan este receptor, poseen perforinas y granzimas citoplasmáticas. O sea que dentro de los linfocitos, aquellos que responden a la CX<sub>3</sub>CL1, tienen asociadas funciones celulares. Además, se ha reportado que esta quimioquina se expresa en células endoteliales en casos de psoriasis, desorden dominante de tipo Th1, pero no en casos de dermatitis atópica tipo Th2 <sup>147</sup>. Estas observaciones podrían sugerir que la CX<sub>3</sub>CL1 y su receptor forman parte del circuito de amplificación mediado por quimioquinas, que polarizan la respuesta hacia un perfil de tipo Th1. De ser así, sería importante para tratar de bloquear respuestas Th1, como la que se desencadena en rechazos a trasplantes.

#### **- En plaquetas**

También se ha demostrado en plaquetas la expresión funcional de CX<sub>3</sub>CR1, ya que luego de la incubación con fractalquina incrementan el nivel de P-Selectina, conocido marcador de activación de plaquetas. Por otro lado, en condiciones de flujo experimentales, la incubación con fractalquina soluble, incrementa la adhesión a colágeno y fibrinógeno <sup>148</sup>. Nuevamente se concluye que esta quimioquina, participa de manera soluble y anclada a membrana.

### **2.3.7.- ANÁLISIS DE CX<sub>3</sub>CR1 EN DIFERENTES PATOLOGÍAS**

#### **Enfermedades renales**

Existen numerosos reportes sugiriendo el rol de la fractalquina en enfermedades renales en humanos (glomerulonefritis, tumores renales y trasplantes renales) y en modelos animales. Por ejemplo, en modelos de glomerulonefritis en rata, se reduce significativamente el infiltrado de leucocitos y se atenúa los niveles de proteinuria, luego del tratamiento con un péptido viral

(vMIP2) con función antagonista sobre receptores de quimioquinas<sup>149</sup>. La expresión de fractalquina y la presencia de células que expresan CX<sub>3</sub>CR1, como células NK CD16<sup>+</sup>, ha sido demostrada en pacientes con distintos tipos de nefropatías<sup>4,5,150-152</sup>. El tratamiento con anticuerpos anti-CX<sub>3</sub>CR1, reduce significativamente el infiltrado de leucocitos en el glomérulo, mejorando la función renal, sugiriendo que la fractalquina y las células CX<sub>3</sub>CR1 estarían involucradas en la patogénesis de la glomerulonefritis humana<sup>3</sup>

### ***Rechazo de trasplantes***

Los rechazos de trasplantes están caracterizados por una fuerte respuesta inmune celular, desarrollada por un importante flujo de leucocitos desde la circulación hacia el órgano específico<sup>153</sup>. Se ha reportado un significativo incremento de fractalquina en tejido vascular y endotelio, de muestras de trasplantes cardiacos rechazados, mas aun, el tratamiento con anticuerpos anti-CX<sub>3</sub>CR1 en pacientes a ser trasplantados, disminuye el rechazo del órgano.<sup>154</sup> En ratones knock out para CX<sub>3</sub>CR1, tratados con dosis subterapéuticas de ciclosporina A, se ha aumentado el tiempo de supervivencia del trasplante. Estos hallazgos se asocian con una reducción del infiltrado de macrófagos, células NK y otros leucocitos. En conjunto, estos resultados indican un posible rol del sistema fractalquina/CX<sub>3</sub>CR1 en el rechazo de órganos trasplantados

### ***Ateroesclerosis y enfermedades cardiovasculares***

Las lesiones ateroscleróticas, contienen un gran número de células de sistema inmune, como macrófagos y células T, que pueden orquestar la respuesta inflamatoria. Existen evidencias que sugieren que la fractalquina, podría estar implicada en la patofisiología de estas enfermedades, ya que en algunas lesiones graves de aterosclerosis, se ha detectado un alto nivel de RNAm de fractalquina. Los monocitos participan en el inicio de este tipo de lesiones, y las quimioquinas son importantes ya que los dirigen desde el torrente sanguíneo hacia el sitio de las lesiones. Por otro lado, se ha reportado que existen polimorfismos en el gen de CX<sub>3</sub>CR1 tales como CX<sub>3</sub>CR1-I249 (Valina a Isoleucina en la posición 249) ó CX<sub>3</sub>CR1-M280 (T a metionina en la posición 280). La presencia de la variante CX<sub>3</sub>CR1-I249 está asociada a un menor riesgo de padecer eventos de enfermedad coronaria aguda. Esto podría ser explicado por la menor capacidad de los monocitos para adherirse al endotelio vascular, ya que el análisis funcional de células mononucleares que expresan esta variante ha demostrado que poseen un menor número de sitios de unión por célula a la fractalquina<sup>155,156</sup>.

### ***Infecciones por HIV***

Se ha detectado en nódulos linfáticos y tejido cerebral, un aumento de la expresión de fractalquina. El incremento de CX<sub>3</sub>CL1 protege a las neuronas de la toxinas del HIV-1, pero induce la depleción de linfocitos T helper CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> por contacto con células dendríticas<sup>157</sup>. También ha sido reportado que el polimorfismo en el gen de CX<sub>3</sub>CR1 pueden influir en la patogénesis de la infección por HIV. Los pacientes homocigotas para la variante CX<sub>3</sub>CR1-I249M280, la cual afecta dos aminoácidos, han mostrado correlación con un progreso hacia el desarrollo del SIDA mucho mayor que los otros haplotipos. El análisis funcional del CX<sub>3</sub>CR1 mostró que los pacientes homocigotos con este haplotipo particular, tienen menos adhesión a la fractalquina<sup>114</sup>.

### ***Otras enfermedades inflamatorias***

Se ha reportado que la CX<sub>3</sub>CL1 está involucrada en la inmunopatogénesis de enfermedades inflamatorias del tipo Th-1. Tanto macrófagos tisulares, fibroblastos, células endoteliales y células dendríticas expresan CX<sub>3</sub>CL1 y CX<sub>3</sub>CR1 en pacientes con artritis reumatoidea. Además, la CX<sub>3</sub>CL1, en fluido sinovial de pacientes con artritis reumatoidea promueve la actividad angiogénica *in vitro*. Los queratinocitos de pacientes con psoriasis expresan altos niveles de CX<sub>3</sub>CL1.

Por otro lado, el sistema CX<sub>3</sub>CL1-CX<sub>3</sub>CR1 está involucrado en la hipertensión arterial pulmonar<sup>158</sup>, cáncer de pulmón<sup>159</sup> y hepatitis aguda<sup>160</sup> en humanos y en ratones prediabéticos NOD<sup>161</sup>.



# *Materiales y Métodos*



### 3.1.- Reactivos generales

Se utilizaron los siguientes reactivos: ioduro de propidio (IP), annexin V-FITC, ionomicina, PMA, Formyl methionyl leucyl phenilalanine (FMLP), Fluo 3-AM, Lipopolisacarido (LPS) de *Escherichia coli* 0111:B4, polimixina B, cicloheximida (CHX), actinomicina D (Act D), anisomicin, ortovanadato de sodio (NaVO<sub>4</sub>), Fluoruro de Sodio (NaF) de Sigma (Sigma-Aldrich, USA). Tambien se usaron las siguientes citoquinas: TNF- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), growth factor-beta (TGF- $\beta$ ), interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) obtenidos de Sigma (St. Louis, MO) y la interleuquina 4 (IL4) e interleuquina 10 (IL10) de Preprotech (Preprotech Mexico, Mexico).

Pepstatina, Leupeptina, Aprotinina, phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF), Herbimycin, Genistein, 1-(5-isoquinolinylnsulfonyl)2-methylpiperazine (H7), PD98059, SB203580, LY294002, Wortmanina (Cambiochem-Novabiochem, La Jolla, CA).

Bolitas de latex de poliestireno (2,5% solid latex, diametro 6 $\mu$ m; PolySciences)

### 3.2.- Preparación de la Toxin Shiga tipo 1 (Stx1)

La Stx1 fue provista por Denka Seiken CO Ltd. (Tokio, 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*<sup>162</sup>. 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 Stx.

### 3.3.- Anticuerpos

Para los estudios realizados en pacientes ó en células purificadas se utilizaron los siguientes anticuerpos para caracterizar monocitos: CD14-PECy5 (mouse IgG2a, Immunotech, Marseille, France), CD16-PE (R-phycoerythrin, mouse IgG1, BD-Biosciences, San Jose, CA), CX<sub>3</sub>CR1-FITC (fluorisotiocianated rat IgG2b, Medical & Biological Laboratories CO, Woburn, MA), CD62L-PE (Caltag Laboratories, Burlingame, CA). Para identificar células NK y NKT cells, se usaron anticuerpos anti CD3-PECy5 (mouse IgG1k, BD-Biosciences), CD56-PE (mouse IgG1, Becton Dickinson, San José, CA) y anti-CX<sub>3</sub>CR1 (MBL). Para lisar las muestras de pacientes se utilizo el buffer de lisis de BD.

Para los ensayos de detección de proteínas fosforiladas se utilizo la técnica de Western Blott, se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti-phospho-STAT1, anti phospho-Akt y anti  $\beta$ -

Actina provistos por Cell Signaling (USA) y anti-phospho-STAT3, anti STAT1 y anti-STAT3 provistos por Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)

### **3.4.- Soluciones.**

#### **3.4.1.-Tampón fosfato salino (PBS).**

La solución fue preparada con NaCl 0,138M, KCl 0,027, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,078M y KHPO<sub>4</sub> 0,015 M; pH=7,4.

#### **3.4.2.-Solución de Türk para el recuento de células**

Se preparó una solución con violeta de genciana (100mg), ácido acético glacial (31,25 ml.) y agua destilada (c.s.p. 500 ml.). Para el recuento de células se realizó una dilución 1:20 en esta solución y se procedió al recuento en cámara de Neubauer.

#### **3.4.3.-Solución de azul tripan.**

La misma se preparó a partir de dos soluciones madres con el siguiente contenido: solución A, azul tripan: 0,14 %; solución B, cloruro de sodio: 4,25%. La solución de trabajo se obtuvo mezclando 4 partes de A y una parte de B. Para la determinación de la viabilidad celular las muestras fueron centrifugadas, el sobrenadante descartado y el residuo celular incubado con la solución de azul tripan por 3 minutos a temperatura ambiente. Luego, se procedió al recuento diferencial de las células que excluían el colorante (células viables) y de aquellas que lo incluían (células muertas).

#### **3.4.4.-Medio de cultivo completo (MCC).**

Se empleó medio de cultivo RPMI 1640 (GIBCO Lab., Grand Island, USA), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB; Natocor, Córdoba, Argentina) inactivado por calentamiento a 56°C durante 30 minutos y con el agregado de 1% de solución antibiótico-antimicótico (Gibco,)

#### **3.4.5.-Solución RIPA modificado.**

Se preparó una solución con una concentración final de Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, NP-40 1%, Na-Deoxicolato 0.25 %, NaCl 150 mM, EDTA 1mM, PMSF 1mM, Leupeptina y Pepstatina 1mg/ml cada una, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1mM y NaF 1mM.

**3.4.6.- Solucion de Gelatina .**

Se preparó una suspensión de gelatina (Sigma) 2 % en solución fisiológica. Luego se incubo durante 60 min en baño a 37°C hasta disolver la gelatina. Se esterilizo en autoclave y se conservo hasta su uso a 4°C en condiciones estériles.

**3.4.7.- Soluciones para aislar monocitos:**

**Ficoll Hypaque**

Los mononucleares (MNC) fueron purificados mediante el empleo de una solución de Ficoll-Triyosom preparada en forma similar al método descripto por Böyum (Böyum *et al*, 1968). A 2,4 volúmenes de Ficoll 400 (Pharmacia, Uppsala, Suecia) al 9% en agua destilada, se le agregó un volumen de Triyosom al 34% (Gobby-Novag, Argentina), siendo la densidad final de la solución a 4°C de 1,077 g/l.

**Solución Buffer T10:**

Se preparó una solución de NaCl (8gr), KCl (200mg), PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>Na.H<sub>2</sub>O (50 mg), CO<sub>3</sub>HNa (1gr) y Glucosa (dextrosa, 1gr) en 100 ml de Agua bidestilada. Luego se llevó a pH=7.4

**Solución Buffer T1:**

El buffer T1 se obtuvo a partir de una dilución 1/10 de buffer T10 en agua. Se llevó a pH=7.2

**Buffer de resuspensión:**

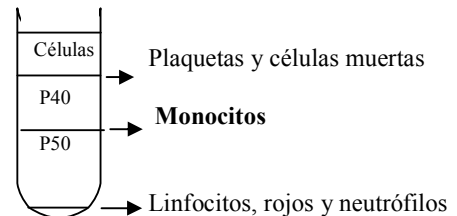
Se preparo una solución con EDTA 5% (80ul), NaCl 9% (16ul), SFB (100ul) y Buffer T1 (1.8ml)

**P100:**

La mezcla de buffer P100, se prepara con 1 ml de buffer T10+9 ml de Percoll. A partir de la solución de P100, se prepararon dos gradientes: P40 y P50.

Gradiente para 1 dador:

	P100 (ml)	T1 (ml)	SFB (ml)
<b>P50</b>	1.25	1.00	0.25
<b>P40</b>	1.00	1.25	0.25



**3.4.8.- Pegado de moléculas a bolitas de latex**

*Pegado de fractalquina soluble a particulas de latex*

Las bolitas de latex fueron incubadas con CX<sub>3</sub>CL1s (10nM) en buffer PBS 1x, a pH=8, durante toda la noche a una temperatura de 4°C. Luego fueron tratadas con BSA/PBS1x a pH=7,4

a temperatura ambiente durante dos horas, previamente a ser utilizadas. Luego los Mo purificados fueron incubados con las bolitas de látex con la CX<sub>3</sub>CL1 adherida, durante el tiempo necesario según el experimento.

### **3.5.- Purificación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y monocitos**

#### **- PBMC**

Sangre de dadores normales voluntarios (Sección Hemoterapia-Cemic) fue recolectada en citrato/dextrosa/adenina. La sangre fue diluida al medio con PBS o solución fisiológica y se sembró sobre un gradiente de Ficoll-Hypaque formando un sistema bifásico, el cual fue centrifugado 30 minutos a 1600rpm a 4°C. Luego de la centrifugación se obtuvo una interfase conteniendo las células mononucleares periféricas y un sedimento de eritrocitos y granulocitos. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) fueron recolectadas, lavadas y resuspendidas en medio completo. La viabilidad celular fue siempre mayor al 98% de acuerdo al test de exclusión de azul Tripan.

#### **- Monocitos**

La purificación de los monocitos mediante la técnica de Percoll se realizó según el siguiente protocolo. Luego de obtener el halo de PBMC a partir de sangre periférica, según lo descrito anteriormente, se le agregó RPMI hasta volumen final de 50ml. Después se centrifugó durante 10 minutos a 1200rpm y se descartó el sobrenadante. El pellet de células se resuspendió en 1.8ml de Buffer de Resuspensión. La muestra se incubó durante 10 minutos a 37°C en un baño, luego del cual se agregaron 16ul de NaCl 9%. Este procedimiento se repitió una vez más luego de la cual se agregaron 16ul de NaCl 9% y se incubó durante 30 minutos en un baño con agitación. Después se agregaron 1.8ml de buffer T1 y 48ul de NaCl 9%. La muestra se sembró sobre una preparación que contiene dos densidades diferentes de Percoll, llamados P50 y P40. Se centrifugó durante 20 minutos a 1640 rpm a 4°C. Se retiró el halo y se lavaron las células con RPMI 10 min a 1200-1500 rpm. La viabilidad de los monocitos, >96% fue determinada mediante el recuento con Tripan blue, y la presencia de CD14 reveló que la pureza fue mayor al 90%.

#### **3.5.1.- Diferenciación de Mo a macrófagos ó células dendríticas**

Mo purificados ( $1.10^6$  cel/ml) mediante gradiente de Ficoll y Percoll, según lo descrito anteriormente, fueron incubados durante 5 días en medio completo suplementado con GM-CSF (50ng/ml, Preprotech) + IL-4 (20ng/ml) en placas de 12 wells, para inducir su diferenciación a células dendríticas. Luego se levantaron las células; y se marcaron con anticuerpos anti-CD1a (marcador de células dendríticas) y CD14 (marcador de Mo) para confirmar que las células hayan

adquirido el fenotipo correcto. Por otro lado, se cultivaron Mo en medio completo con GM-CSF (50ng/ml, Preprotech) durante 5 días para inducir su diferenciación hacia macrófagos. En ambas poblaciones diferenciadas, se analizó mediante citometría de flujo la expresión de CX<sub>3</sub>CR1.

### **3.6.- Cultivo de células.**

#### **- Líneas celulares:**

La línea celular monocítica humana THP1, se cultivó en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB, 1% de glutamina y 1% de antibiótico-antimicótico (Gibco, Invitrogen, Argentina) a 37°C en un ambiente de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **- Obtención y cultivo de células endoteliales**

Las células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) fueron aisladas según el método de *Jaffe et al* (cita). Brevemente, las venas del cordón umbilical fueron canuladas, lavadas con PBS1x, y luego incubadas con medio RPMI conteniendo colagenasa tipo IV(5mg/ml, GIBCO), durante 20 minutos en estufa a 37°C con 5%CO<sub>2</sub>. Después se recogió la suspensión en un tubo Falcon con PBS1x al 1% de suero fetal bovino, y se centrifugaron las células durante 10 minutos a 15000rpm, a 4°C. Finalmente el pellet se resuspendió en medio RPMI suplementado con 20% SFB, heparina (76ug/ml), factor de crecimiento endotelial (50ug/ml; ROCHE), antibiótico Streptomycin/penicilina (1x, GIBCO), piruvato de sodio (1mM) y glutamina (2mM, Sigma).Las células aisladas se sembraron y cultivaron en un flask de 25cm<sup>2</sup> previamente gelatinizado, durante los días necesarios para que llegaran a confluencia. Luego se removieron con una solución de tripsina al 1% con EGTA, se lavaron y se sembraron en placas de 96 wells previamente gelatinizadas (20.000 células/well/100 µl). Este número de células fue suficiente para lograr una Monocapa confluyente. Las células HUVEC se utilizaron entre el primer y tercer pasaje.

#### **- Obtención y cultivo de células epiteliales**

Las células epiteliales de túbulo renal humano, HRTEC (human renal tubular epithelial cells), fueron obtenidas a partir de biopsias de riñón provenientes de pacientes adultos, que sufrieron nefrectomía debido a carcinoma renal, en la unidad de Urología, Hospital de Clínicas “José de San Martín, Buenos Aires Argentina. La remoción de una parte de tejido del riñón con fines científicos, fue aprobada por el Comité de Ética de la Universidad de Buenos Aires. La corteza fue diseccionada de la médula renal y los cultivos primarios de HRTEC fueron realizados según bibliografía<sup>163</sup>

Brevemente, los fragmentos corticales fueron incubados durante 1 hora a 37°C en un buffer conteniendo 0.1% colagenasa tipo I (Sigma Chemical). Las células fueron lavadas, centrifugadas y resuspendidas en Medio RPMI suplementado con 10% SFB (GIBCO), 2mM L-glutamina y 100U/ml penicilina/streptomina. Las células se cultivaron a confluencia, luego se tripsinizaron, se lavaron con PBS1x estéril y se congelaron en Suero fetal de ternero al 5% hasta su uso. Para los experimentos las células se resuspendieron en medio completo con 1% de Factor de Crecimiento endotelial (Sigma) en flask de 25cm<sup>2</sup> hasta llegar a confluencia. Las HRTEC se utilizaron entre el segundo y quinto pasaje para los ensayos experimentales. Para los ensayos experimentales se tripsinizaron, se lavaron y se sembraron en placas de 96wells, a una concentración de 10.000 células/well, en medio completo al 1% SFB (condiciones de arresto celular)

### **3.7.- Recuento y fórmula de leucocitos de sangre periférica**

El recuento total de leucocitos fue determinado en una cámara de Neubauer luego de diluir la sangre en una solución de 2% de ácido acético. Este porcentaje fue confirmado por citometría de flujo.

### **3.8- Citometría de flujo**

#### **3.8.1.-Evaluación de la expresión de diferentes moléculas en la superficie celular**

La medición de la expresión en membrana de los marcadores de monocitos se realizó por inmunofluorescencia directa en un citómetro de flujo.

La expresión de los marcadores CD14, CD62L, CD3, CD56 y CX<sub>3</sub>CR1 en células de pacientes con D+SUH y los distintos grupos controles se realizó por inmunofluorescencia directa por citometría de flujo incubando 100 µl de sangre entera con los anticuerpos específicos 30 min a temperatura ambiente. Los controles de isotipo se ensayaron en paralelo. Luego de la incubación, los eritrocitos se lisaron usando la solución de lisis FACS (Becton Dickinson, Immunocytometry System, San Jose, CA) y luego de dos lavados las células se resuspendieron en 0.3 µl de ISOFLOW. La fluorescencia se midió en el citómetro de flujo y el análisis se realizó en 100000 eventos para cada muestra.

Para la marcación de superficie en monocitos purificados, a partir de sangre de dadores sanos, las células lavadas con PBS se incubaron con los Ac ( $3 \times 10^5$  células) por 30 min a 4°C. Luego de dos lavados con PBS las células se resuspendieron en 0.4 ml de ISOFLOW (International Link, S.A., Buenos Aires, Argentina) y la fluorescencia se midió en un citómetro

de flujo Beckton Dickinson FACScan. El análisis se realizó sobre 10000 eventos para cada muestra utilizando el programa Cell Quest (Becton Dickinson).

Para la medición de CX<sub>3</sub>CR1 expresado en membrana ó total, mediante inmunofluorescencia indirecta, se utilizó el anticuerpo IgG anti-CX<sub>3</sub>CR1 humano, hecho en conejo (Torrey Pines Biolabs, Inc, East Orange, USA) y luego un anticuerpo secundario acoplado a FITC (Sigma-Aldrich, USA). Brevemente, la expresión total fue determinada en células previamente fijadas con paraformaldehído y luego permeabilizadas con Permeabilizing Solution2 (Becton Dickinson, CA, USA) durante 10 minutos a temperatura ambiente. La expresión en membrana fue analizada en células sin permeabilizar. La expresión intracelular fue determinada como la diferencia entre la expresión total la de superficie. La fluorescencia específica de CX<sub>3</sub>CR1 fue corregida con el background, determinado como el binding inespecífico del anticuerpo secundario. La fluorescencia se midió también en el Becton Dickinson FACScan. El análisis se realizo en 10000 eventos de cada muestra, utlizando el programa Cell Quest. Los monocitos fueron identificados por forward-side scatter y la presencia de CD14

### **3.8.2.-Evaluación de la movilización de calcio intracelular [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>; Marcación de células con Fluo-3AM.**

Los cambios en los niveles de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> fueron evaluados empleando Fluo 3-acetometil ester (AM) (Sigma, St Louis). Se trata de un compuesto que interacciona con Ca<sup>2+</sup> libre intracelular ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) y una vez que es hidrolizado por las esterasas intracelulares permanece dentro de la célula. Ello permite el monitoreo de cambios en los niveles de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> con posterioridad a un estímulo dado.

El Fluo 3-AM atraviesa la membrana plasmática y la acción de las esterasas lo tornan irreversiblemente impermeable. La suspensión de monocitos fue marcada según se lo descrito previamente (Merrit *et al*, 1990). Brevemente, llos Mo en una concentración de 5x10<sup>6</sup> cél./ml fueron incubados con Fluo 3-AM 4μM en PBS durante 30 min. a 37<sup>0</sup>C. Posteriormente, las células fueron lavadas 3 veces y resuspendidas en una concentración final 5x10<sup>5</sup> cél./ ml. en MCC. Las células permanecieron a 37<sup>0</sup>C hasta su estimulación donde alícuotas de 500μl fueron tratadas con diferentes concentraciones de fractalquina soluble (CX<sub>3</sub>CL1s), fMLP (10<sup>-7</sup>M), ó ionomicina (10μg/ml) y la fluorescencia intracelular monitoreada por citometría de flujo.



### 3.8.3.-Análisis de los datos obtenidos.

Todo incremento en el valor de fluorescencia celular fue interpretado como un aumento de los niveles  $[Ca^{2+}]_i$ . Así, se evaluaron los valores de intensidad de fluorescencia celular antes (valor basal) y después del estímulo

Para el análisis de los datos obtenidos, se realizó un *dot plot*: F11 vs. tiempo, donde se registra la intensidad de fluorescencia de cada Monocito en el momento en que es impactado por el rayo láser del citómetro de flujo.

Para establecer el valor de fluorescencia basal, se realizaron histogramas de intensidad de fluorescencia de los MNC no estimulados y posteriormente se estableció un *marker* que abarcara el 97% de dichas células. Así, los monocitos que incrementaron su fluorescencia en valores superiores al delimitado por el *marker* fueron consideradas como respondedores.

### 3.8.4.-Evaluación de la apoptosis por incorporación de Ioduro de Propidio y Anexina.

El porcentaje de células apoptóticas fue determinado luego de la incubación con Ioduro de Propidio (IP, 50  $\mu$ g/ml)(Sigma) y Anexina V-FITC (Sigma). Luego se cuantificó mediante citometría de flujo

### 3.9.-Western Blot de lisados celulares y ensayos de actividad quinasa.

Para cada condición, se utilizaron  $1 \times 10^6$  cel/ml de monocitos. Luego del tratamiento experimental, se lavaron las células con PBS y se lisaron utilizando 0.650ml de solución de RIPA modificada en constante agitación durante 20 min a 4<sup>0</sup>C. Los lisados fueron centrifugados durante 15 min a 14,00xg. Se determinó la concentración de proteínas utilizando un ensayo de Bradford (Pierce, Rockford, IL). Luego los sobrenadantes fueron preparados para un SDS-PAGE en condiciones reductoras.

El SDS PAGE se corrió en minigeles al 10% acrilamida-bisacrilamida usando soluciones estándar de Tris-Glicina. Se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF (Bio-Rad, Hercules, CA) durante 1,5 h a 300mA y luego se bloqueó dicha membrana con PBS 10% de leche descremada durante 1 h. La membrana fue probada con el primer anticuerpo en PBS 0.4% BSA o en PBS 1% leche descremada, durante toda la noche. Luego de lavar la membrana tres veces con PBS-0.2% Tween-20, se incubó la misma con el segundo anticuerpo anti IgG de conejo o anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rabanito (HRP) (Amersham, Aylesbury, UK). La inmunoreactividad fue detectada utilizando un sistema denominado ECL (Pierce).

### **3.10.-Análisis estadístico de los datos obtenidos.**

Para el análisis estadístico de los datos de pacientes, la significación estadística se calculó utilizando el test utilizando el test Mann-Whitney U. Para los experimentos con células endoteliales, epiteliales y monocitos *in vitro* se utilizó el test paramétrico t-pareado;  $p < 0.05$  fue considerado significativo

# *Resultados*



#### 4.1.-EXPRESIÓN DE CX<sub>3</sub>CR1 EN LEUCOCITOS CIRCULANTES DE PACIENTES CON SUH.

##### 4.1.1.- CLASIFICACIÓN DE LOS GRUPOS CLÍNICOS ESTUDIADOS.

Comenzamos el estudio de la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 en distintas subpoblaciones leucocitarias en pacientes con SUH y en tres grupos controles: niños sanos (S) admitidos para cirugías de rutina no relacionadas con procesos infecciosos, con parámetros hematológicos y renales normales; Urémicos (U) con daño renal agudo y concentraciones elevadas de urea y creatinina en suero (los niveles séricos de urea y creatinina se encontraban entre 13.2 a 29.3 mmol/L y 132.6 a 539.2 μmol/L, respectivamente); Infeccionados (I) con neutrofilia, por estar cursando alguna infección aguda no relacionada con el D+SUH. Sus niveles de leucocitos periféricos se encontraban entre 12 y 40x10<sup>9</sup> células/L, y el porcentaje de PMNs era mayor del 75%. El recuento plaquetario, urea, creatinina y hematocrito se encontraban entre los valores normales. Las edades de los niños de cada grupo, estaban comprendidas entre los 6 meses y 10 años. A continuación se muestra en la *Tabla 1*, los datos de recuento de leucocitos circulantes para cada grupo clínico:

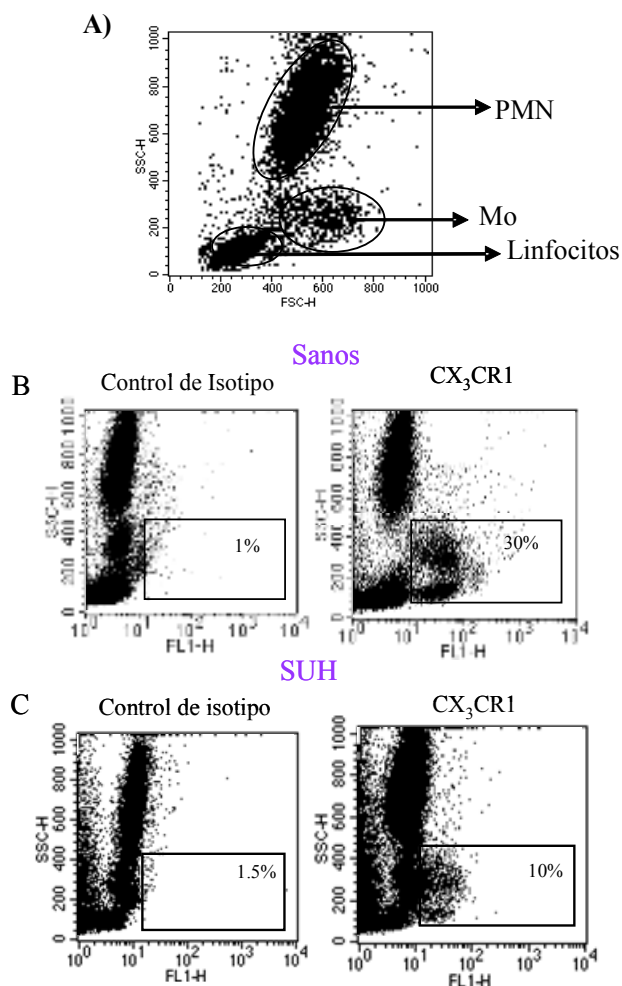
	Sanos (n=21)	SUH (n=31)	U (n=20)	I (n=17)
Leucocitos (x 10 <sup>9</sup> /L)	8.55±2.71	17.06±6.65 <sup>***</sup>	12.35±5.42	20.56±11.87 <sup>***</sup>
% Monocitos	4.8±1.73	7.3±3.3 <sup>***</sup>	6.6±3.1 <sup>#</sup>	7.8±2.8 <sup>***</sup>
Monocitos (x 10 <sup>9</sup> /L)	0.40±0.23	1.26±0.77 <sup>***</sup>	0.70±0.0.39 <sup>**</sup>	1.50±1.27 <sup>***</sup>
Linfocitos (x10 <sup>9</sup> /L)	3.26±1.22	5.14± 2.42 <sup>**</sup>	3.20±1.46 <sup>##</sup>	4.97±5.00
NK (x 10 <sup>9</sup> /L)	0.29±0.16	0.20±0.05	0.30±0.06	0.64±0.26
NK <sup>dim</sup> (x 10 <sup>9</sup> /L)	0.18±0.12	0.09±0.08 <sup>*</sup>	0.22±0.09	0.55±0.60
NK <sup>brigh</sup> (x 10 <sup>9</sup> /L)	0.02±0.02	0.04±0.03	0.02±0.01	0.04±0.02

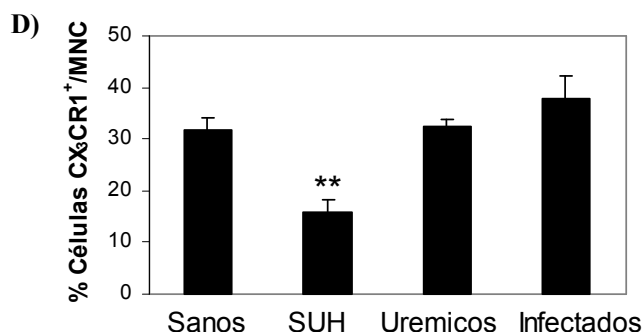
**Tabla 1: Número absoluto de leucocitos circulantes en los diferentes grupos clínicos.** Los datos están expresados como la media±DE. \* p<0.05, \*\* p<0.005, \*\*\* p<0.0001, cualquier grupo comparado con los sanos; # p<0.01, ## p<0.005, comparado con los SUH. Los estudios realizados en células Natural Killer (NK), se realizaron en un menor número de pacientes: Sanos (n=18), SUH (n=16), U (n=9) e I (n=8).

#### 4.1.2.- DISTINTAS POBLACIONES DE LEUCOCITOS QUE EXPRESAN CX<sub>3</sub>CR1.

En principio, se identificaron las distintas poblaciones de leucocitos circulantes en sangre. Para esto, se analizó una muestra de sangre periférica de un niño sano, mediante citometría de flujo y se identificaron las subpoblaciones según los parámetros de SSC (complejidad) y FSC (tamaño). (Figura 1A)

Luego, se analizó la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 en las distintas subpoblaciones de leucocitos. En la Figura 1B se observa un ejemplo representativo de un niño sano, donde sólo las poblaciones correspondientes a Mo y NK expresan este receptor, coincidentemente con lo reportado en bibliografía. Para ello, se realizó una marcación en muestras de sangre entera con un anticuerpo anti-CX<sub>3</sub>CR1-FITC, y se analizó el SSC (complejidad) vs. la fluorescencia (FL-1). En los niños sanos, las poblaciones de mononucleares (MNC) expresan CX<sub>3</sub>CR1, mientras que los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) resultaron negativos (Figura 1B), según lo descrito anteriormente.<sup>126,140</sup> Sin embargo, en los niños con SUH, se observó que el porcentaje de leucocitos CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> estaba significativamente disminuido (Figura 1C y D). Esta alteración sólo se observó en el grupo de niños con SUH, mientras que los otros grupos mantuvieron la expresión de dicho receptor (Figura 1D).





**Figura 1: Expresión de CX<sub>3</sub>CR1 en sangre entera**

Se realizó una marcación con un anticuerpo anti-CX<sub>3</sub>CR1 FITC, en sangre entera de niños sanos (n=10), SUH (n=19), Infectados (n=10) y Urémicos (n=14). Luego se analizaron las muestras por citometría de flujo, según materiales y métodos. A) Gráfico de puntos representativo, según FSC vs SSC, donde se observan las típicas poblaciones de leucocitos circulantes. Gráficos de puntos representativos de FSC vs fluorescencia de FITC de B) un niño sano y C) un niño con SUH, mostrando la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 en la población de mononucleares. Se muestra el correspondiente control de isotipo. D) Porcentaje de células mononucleares positivas para la expresión de CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> para cada grupo clínico. Los resultados se expresan como el promedio ± ES. \*\*p<0.001 comparado con todos los grupos clínicos utilizando el test Mann-Whitney U.

A continuación, se investigó en detalle la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 en las distintas subpoblaciones que en condiciones normales poseen este receptor, en principio los monocitos y luego las células NK.

**4.1.3.- EXPRESIÓN DE CX<sub>3</sub>CR1 EN LAS DISTINTAS SUBPOBLACIONES DE MONOCITOS PERIFÉRICOS.**

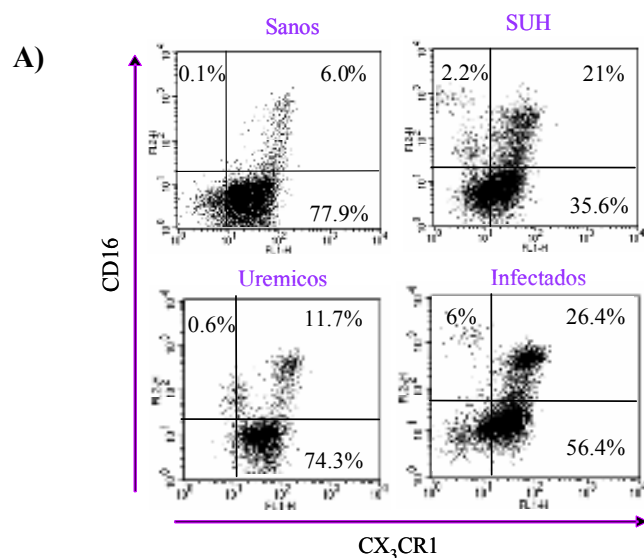
Anteriormente, se ha demostrado la heterogeneidad de los monocitos<sup>112,164</sup> con respecto a la expresión de las moléculas CD14 y CD16, lo cual permite identificar distintas subpoblaciones monocíticas con diferentes características funcionales. Con la idea de analizar la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 en las subpoblaciones de monocitos circulantes, se incubaron muestras de sangre periférica con anticuerpos dirigidos contra los distintos marcadores fenotípicos. Como se observa en la Figura 2A, se definieron cuatro subpoblaciones de monocitos CD14<sup>+</sup> de acuerdo a los niveles de expresión de CD16 y CX<sub>3</sub>CR1: CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup>/CD16<sup>-</sup>; CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> (Doble positivo); CX<sub>3</sub>CR1<sup>-</sup>/CD16<sup>+</sup> y CX<sub>3</sub>CR1<sup>-</sup>/CD16<sup>-</sup> (Doble negativo). En los niños sanos, la mayoría de los monocitos periféricos son “clásicos” CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup>/CD16<sup>-</sup> (≈78%), mientras que las otras subpoblaciones representan menos del 15% de las células. Los niños con SUH, mostraron una pérdida significativa (≈ 45%) de la subpoblación clásica de monocitos CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup>/CD16<sup>-</sup>, acompañada simultáneamente por un aumento de las otras subpoblaciones (Figura 2B).

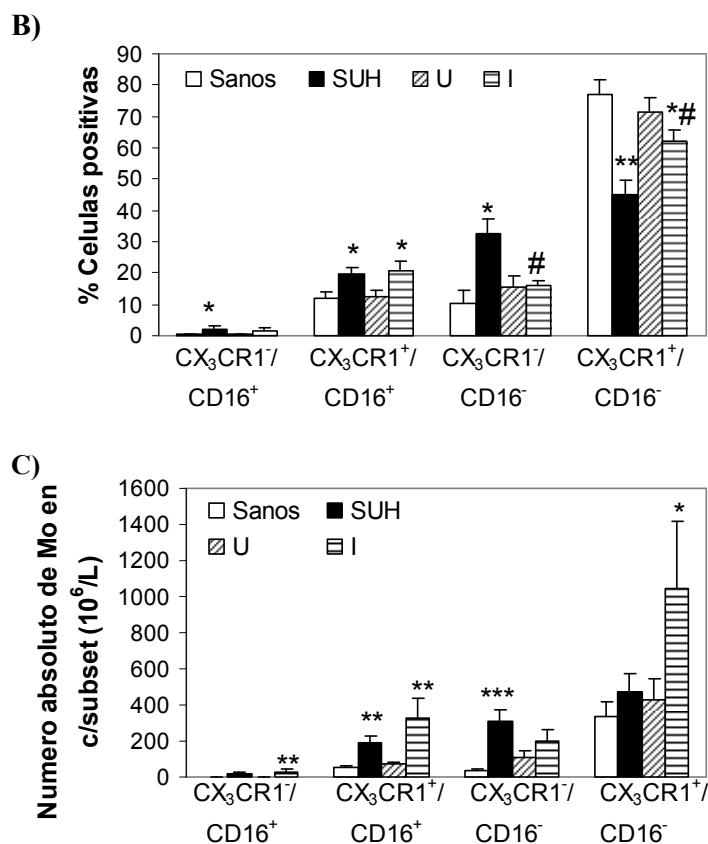
De manera similar, se observó en los Infectados (I), una disminución del porcentaje de monocitos  $CX_3CR1^+/CD16^-$  ( $\approx 62\%$ ), junto con un aumento de las células doble positivas ó negativas. Los Urémicos (U) presentaron proporciones de cada subpoblación semejante a los niños sanos.

Sin embargo las anomalías observadas en los I, fueron menos marcadas que en los niños con SUH, haciendo a éste último grupo significativamente diferente de todos los grupos estudiados. (Figura 2B). Además, los niños con SUH poseen un fenotipo único cuando se analiza la totalidad de los Mo  $CX_3CR1^+$ , mostrando una pérdida significativa del porcentaje de esta subpoblación (Mo  $CX_3CR1^+$ : sanos= $84.6 \pm 2.7\%$ ,  $n=22$ ; SUH= $55.5 \pm 4.0\%$ ,  $n=31$ \*; U= $79.0 \pm 4.3\%$ ,  $n=20$ ; I= $83.3 \pm 1.9\%$ ,  $n=17$ ,  $*p < 0.0001$  comparado con los otros grupos clínicos).

En la Figura 2C se muestra que la distribución de Mo circulantes, dentro de los cuatro subpoblaciones, también fue diferente en número absoluto. Los I y los niños con SUH, mostraron un aumento en el recuento total de monocitos (Tabla 1). Sin embargo, el número de Mo clásicos ( $CX_3CR1^+/CD16^-$ ) está aumentado en los I, pero conservado en los SUH, quienes poseen alternativamente un aumento del número de Mo doble positivos y doble negativos (Figura 2C).

Por último y coincidentemente con otros reportes, realizados en adultos sanos<sup>112,113</sup> notamos que todos los grupos clínicos mostraron mayor expresión de  $CX_3CR1$  en los Mo  $CD16^+$  que en los  $CD16^-$  ( $p < 0.0001$ ). Sin embargo, los Mo de niños con SUH, mostraron una disminución significativa de la expresión por célula expresada como la intensidad media de fluorescencia (IMF) de  $CX_3CR1$ , tanto en la subpoblación de Mo  $CD16^+$ : (IMF  $CX_3CR1$  Sanos= $115.2 \pm 11.1$ ,  $n=10$ ; SUH= $71.3 \pm 9.3$ ,  $n=19$ ;  $p < 0.005$ ), como dentro de los Mo  $CD16^-$ : (Sanos= $48.1 \pm 5.2$ ; SUH= $38.1 \pm 3.9$ ,  $p < 0.05$ ).





### Figura 2: Expresión de CX<sub>3</sub>CR1 en monocitos periféricos de los distintos grupos clínicos

Se marcaron células de sangre entera de niños sanos ( $n=10$ ); con SUH ( $n=19$ ), Urémicos ( $n=14$ ) e Infectados ( $n=10$ ), con anticuerpos anti-CD14-PECy5, anti-CD16-PE y anti-CX<sub>3</sub>CR1-FITC, luego se evaluaron los marcadores por citometría de flujo. Las subpoblaciones de Mo se definieron de acuerdo a la expresión de CD14, y luego a la presencia de CX<sub>3</sub>CR1 y CD16. A) Gráficos de puntos representativos de un niño de cada grupo, donde se muestra la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 y CD16 en los monocitos CD14<sup>+</sup>. B) Se definieron cuatro subpoblaciones, de acuerdo a la expresión en membrana de CX<sub>3</sub>CR1 y CD16. Cada barra representa el promedio  $\pm$  ES del porcentaje de células de cada subpoblación en los distintos grupos clínicos. C) Cada barra representa el promedio  $\pm$  ES del número absoluto de células para cada subpoblación de Mo, en los distintos grupos. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$  diferente comparado con los niños sanos y urémicos; # $p < 0.05$  comparado con los SUH.

#### 4.1.4.- EXPRESIÓN DE CX<sub>3</sub>CR1 Y DE LA SELECTINA CD62L EN MONOCITOS PERIFÉRICOS.

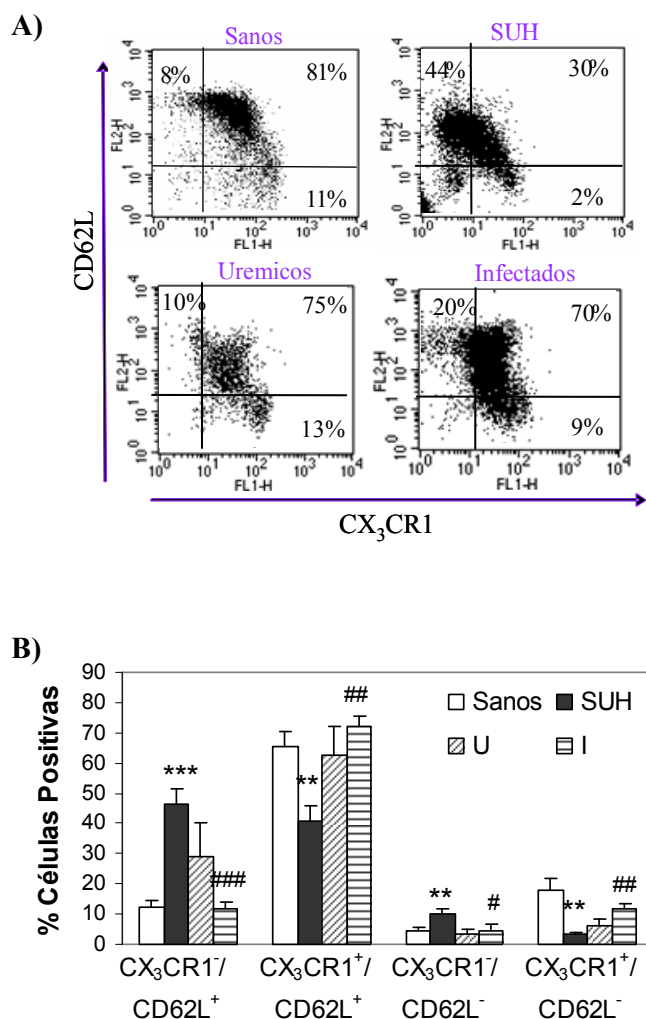
Las subpoblaciones de Mo también difieren en la expresión de la molécula de adhesión CD62L<sup>112</sup>. Por este motivo, se caracterizaron los monocitos midiendo la expresión de CD62L junto con CX<sub>3</sub>CR1 dentro de la región de leucocitos con expresión de CD14, marcador fenotípico de los monocitos.

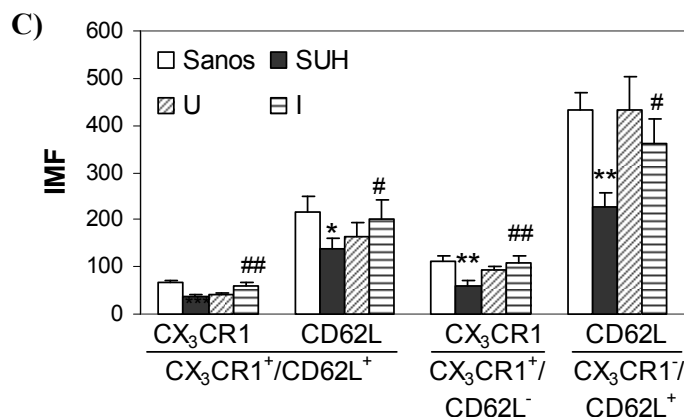
La mayoría de los monocitos circulantes (Mo CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup>/CD16<sup>-</sup>) en los niños sanos, también expresan la selectina CD62L<sup>112</sup>. El análisis comparativo, mostró una reducción significativa de la población doble positiva (CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup>/CD62L<sup>+</sup>) en los niños con SUH (Figura



3A). Esto podría deberse a la pérdida de expresión de CX<sub>3</sub>CR1, ya que el porcentaje total de células CD62L<sup>+</sup> se encuentra conservado (sanos=77,0±5,0 %, n=11; SUH= 86,9±1,6%; n=13, ns). Por otro lado, se encontró que la subpoblación de células CX<sub>3</sub>CR1<sup>-</sup>/CD62L<sup>+</sup> estaba significativamente aumentada (Figura 3A). Al comparar el fenotipo de los Mo, con los otros grupos clínicos (Sanos, I y U) se observó que los U e I, tenían una distribución similar a los Sanos; además los porcentajes de cada subpoblación de Mo en el grupo de I fueron significativamente distintos a los SUH (Figura 3A).

La expresión por célula ó intensidad media de fluorescencia (IMF) de CD62L, está reducida en los pacientes con SUH tanto en la población doble positiva (CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup>/CD62L<sup>+</sup>) como en las células CX<sub>3</sub>CR1<sup>-</sup>/CD62L<sup>+</sup>; (Figura 3B). Esto indicaría que el CD62L fue clivado ó down-regulado.



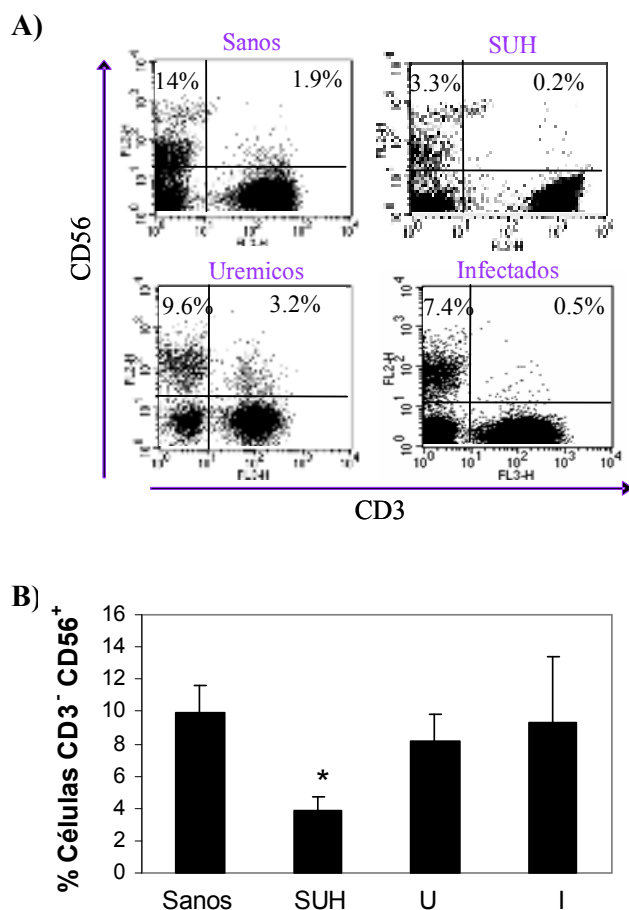


**Figura 3: Expresión de CX<sub>3</sub>CR1 y CD62L en monocitos periféricos de los diferentes grupos clínicos.**

Se analizó la expresión de CD14, CD62L y CX<sub>3</sub>CR1 por Citometría de flujo, en muestras de sangre entera de niños sanos (n=11), con SUH (n=13), Uremicos (n=6) e Infectados (n=11). Se definieron las subpoblaciones de Mo, analizando la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 y CD62L dentro de las células CD14<sup>+</sup>. **A)** Graficos de puntos representativos de un niño de cada grupo, mostrando la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 y CD62L dentro de los Mo CD14<sup>+</sup>. **B)** Se definieron cuatro subpoblaciones de Mo, de acuerdo a la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 y CD62L. Cada barra representa el promedio±ES del porcentaje de células en cada subpoblación. **C)** Cada barra representa el promedio ± ES de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de CX<sub>3</sub>CR1 y CD62L en cada subpoblación de monocitos definidos en **A)**. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 estadísticamente significativo comparado con los Sanos. #p<0.05, ##p<0.01 y ###p<0.001 comparado con los niños con SUH.

#### 4.1.5.- EXPRESIÓN DE CX<sub>3</sub>CR1 EN CÉLULAS NK.

Otra de las subpoblaciones de leucocitos que expresan CX<sub>3</sub>CR1, son las células NK (CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>) y NKT (CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>). Dentro de las NK existen dos subsets, uno con nivel de expresión media de la molécula CD56, acompañado de la expresión de CD16 (CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>) y otro con mayor expresión de CD56 (NK CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>). Además existen las células NK-T (CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>). Tanto la células NK CD56<sup>dim</sup> y aproximadamente el 50% de las NKT, pueden migrar hacia la CX<sub>3</sub>CL1 soluble. Por lo cual, se analizó el porcentaje de dichas células dentro de la población linfocitaria, mediante citometría de flujo utilizando tres anticuerpos: anti-CD3-PECy5, anti-CD56-PE y anti-CX<sub>3</sub>CR1-FITC. Como se observa en la *Figura 4*, los niños con SUH mostraron una disminución del porcentaje de células NK comparado con los otros grupos clínicos (*Figura 4A y 4B*). Sin embargo, no se observaron cambios en el número absoluto de células NK circulantes (*Tabla 1*).

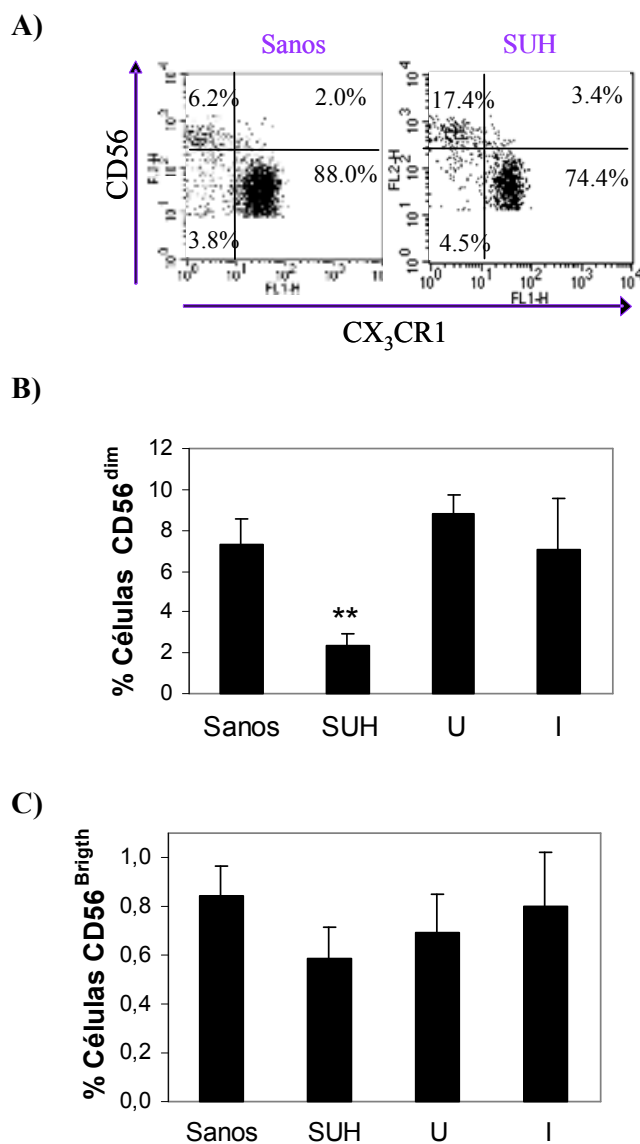


**Figura 4: Análisis de células NK en sangre entera de los distintos grupos clínicos**

Se analizó la expresión de CD3 y CD56 mediante Citometría de flujo, en sangre entera de niños Sanos ( $n=16$ ), con SUH ( $n=14$ ), Uremicos ( $n=5$ ) e Infectados ( $n=6$ ) **A)** Graficos de puntos representativos donde se observa la subpoblación de células NK ( $CD3^-CD56^+$ ) y NKT ( $CD3^+CD56^+$ ), dentro del regione de linfocitos, para cada grupo clínico. **B)** Cada barra representa el promedio  $\pm$  ES de células NK ( $CD3^-CD56^+$ ) dentro de los linfocitos.

La población de células NK, puede dividirse en dos subpoblaciones  $CD56^{dim}$  y  $CD56^{bright}$ . El primero es el más abundante, con baja expresión de CD56, y positivo para CD16 ( $CD56^{dim}CD16^+$ )<sup>165</sup> y  $CX_3CR1$ <sup>166</sup>; mientras que el subpoblación de células NK  $CD56^{bright}$ , no expresan CD16 ni  $CX_3CR1$ <sup>166</sup>. Como se observa en la *Figura 5* el porcentaje de células  $CD56^{dim}$ , e incluso el número absoluto (*Tabla 1*), está significativamente disminuido en los niños con SUH comparado con los otros grupos clínicos; en cambio no se observaron variaciones en las células  $CD56^{bright}$ . La disminución selectiva del subpoblación  $CD56^{dim}$ , también pudo observarse analizando la relación  $CD56^{dim}/CD56^{bright}$ : S:  $10.0 \pm 2.0$  ( $n=14$ ); SUH:  $4.5 \pm 1.3$  ( $n=7$ ); U:  $10.8 \pm 2.5$  ( $n=6$ ); I:  $11.0 \pm 4.3$  ( $n=6$ );  $p < 0.05$ , SUH comparado con sanos. Por último, se observó una disminución significativa de la población NK-T ( $CD3^+CD56^+$ ) sólo en los niños con SUH, tanto en el porcentaje (S= $2.0 \pm 0.4\%$  ( $n=14$ ); HUS= $0.2 \pm 0.8\%$  ( $n=9$ );  $p < 0.0015$ ) como en el número absoluto (sanos= $61.7 \pm 8.7$  ( $\times 10^6$  células/L); SUH=  $16. \pm 5.7$  ( $\times 10^6$  cel/L)  $n=8$ /grupo,  $p < 0.001$ ).

Además, dentro del subpoblación de NK-T, el porcentaje de células  $CX_3CR1^+$ , está reducido en los pacientes con SUH (sanos= $57.0 \pm 5.1\%$ ,  $n=14$  vs SUH= $33.6 \pm 7.7$ ,  $n=9$ ,  $p<0.05$ ).



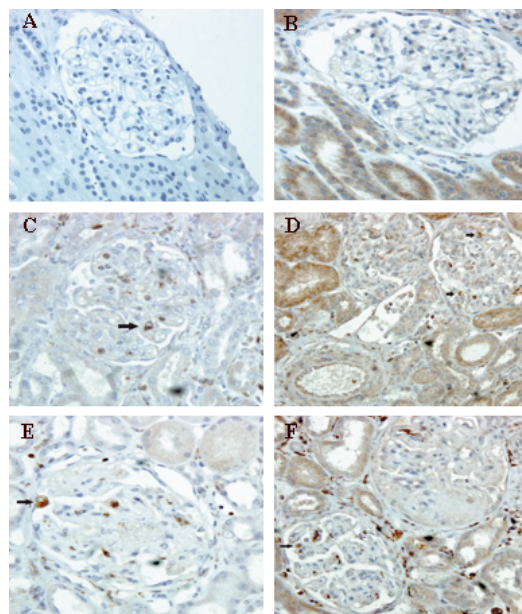
**Figura 5: Análisis de los subpoblaciones de células NK, en los diferentes grupos clínicos.**

Se marcó con anticuerpos anti-CD3-PECy5, anti-CD56-PE y anti- $CX_3CR1$ -FITC en sangre entera de niños Sanos ( $n=16$ ), con SUH ( $n=14$ ), Urémicos ( $n=5$ ) e Infeccionados ( $n=6$ ), y se analizó por citometría de flujo. **A)** Gráficos de puntos representativos de un niño Sano ó con SUH, donde se muestra la expresión de  $CX_3CR1$  dentro de las subpoblaciones de células NK ( $CD56^+ CD3^-$ ):  $CD56^{dim}$  y  $CD56^{bright}$ . El valor en cada cuadrante, representa el porcentaje relativo con respecto al número total de células NK. **B)** Cada barra representa el porcentaje de células NK  $CD56^{dim}$  relativo al número total de leucocitos, expresado como el promedio  $\pm$  ES para cada grupo clínico: niños Sanos ( $n=16$ ); con SUH ( $n=14$ ), Urémicos ( $n=5$ ) e Infeccionados ( $n=6$ ). **C)** Cada barra muestra el porcentaje de células NK  $CD56^{bright}$  relativo al número total de linfocitos, expresado como el promedio  $\pm$  ES, dentro de cada grupo clínico: niños sanos ( $n=18$ ), con SUH ( $n=16$ ), Urémicos ( $n=9$ ) e Infeccionados ( $n=8$ ). \* $p<0.05$  comparado con Sanos; \*\* $p<0.005$  comparado con Sanos y 0.05 comparado con Infeccionados.

Para investigar si la disminución de las células NK CD56<sup>dim</sup> y NK-T podría deberse a la muerte celular, por señales presentes en la sangre de los niños con SUH, se analizó la capacidad del plasma de inducir apoptosis en NK y NK-T. Para ello, se aislaron monocitos periféricos de dadores adultos sanos y se incubaron con plasma (80%) de niños sanos ó con SUH, durante toda la noche. Luego se marcó con anticuerpos anti-CD56-PE y anti-CD3-PECy5 para identificar la población celular y con anexina V-FITC para detectar las células apoptóticas, según lo descrito<sup>167</sup>. No se observó ningún aumento significativo en la apoptosis, luego del cultivo en plasma de pacientes (datos no mostrados). Tampoco se observaron cambios en la apoptosis en presencia de  $10^{-6}$  M ó de  $10^{-8}$  M de Stx2 (datos no mostrados).

#### **4.1.6.- DETECCIÓN DE CÉLULAS CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> EN CORTES DE RIÑÓN DE PACIENTES CON SUH.**

Se analizó la presencia de macrófagos mediante la detección de uno de sus marcadores específicos: macrosialina (CD68) y también la presencia de células CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> en cortes histológicos de riñón provenientes de pacientes con SUH y de varios grupos controles, mediante inmunohistoquímica realizando marcación simple. En la *Tabla 2*, se muestra el número de macrófagos infiltrados CD68<sup>+</sup> ó de células CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> por glomérulo, presentes en cortes histológicos de muestras de riñón de niños sanos ó pacientes con SUH post diarrea, SUH Atípico, rechazo agudo por trasplante, Lupus sistémico ó enfermedad de Henoch-Schönlein. En paralelo se observó en la zona glomerular, la presencia de neutrófilos (CD68<sup>-</sup> y CX<sub>3</sub>CR1<sup>-</sup>; datos no mostrados) y de algunos macrófagos y/ó linfocitos en los túbulos de los cortes de SUH. A continuación, en la *Figura 6*, se muestran secciones seleccionadas en los niños sanos, con SUH típico ó atípico.



**Figura 6. Inmunohistoquímica de biopsias renales.**

Se muestran cortes con marcación simple para CD68 (A,C,E) y para CX<sub>3</sub>CR1 (B,D,F). La inmunohistoquímica se realizó en cortes de riñón de niños sanos (A, B), de niños con SUH (C, D), y de niños con SUH atípico, debido a la deficiencia de factor H (E, F). La figura muestra la presencia de CD68 (flechas) y de células CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> dentro del glomérulo proveniente de niños con ambos tipos de SUH. Aumento original: x400 (A-C, E); x200 (D, F); y x1000 en el panel E insertado (muestra macrófagos CD68<sup>+</sup>). Las imágenes fueron adquiridas utilizando un microscopio Leica, equipado con objetivos 40x/0.65 NA (A-C, E) ó 20x/0.50 NA (D, F) ó con lentes para inmersión de 100x/1.30 NA (inserto E). La cámara y el software también pertenecen a Leica (Heidelberg, Germany).

Edad (años)	Δtiempo (días) <sup>†</sup>	Número de células / glomeruli		
		CD68 <sup>+</sup>	CX <sub>3</sub> CR1 <sup>+</sup>	
<b>Riñón normal</b>	5	-	0	0
	8	-	0	0
	20	-	0	0
	25	-	0	0
<b>SUH post diarrea</b>	0.75	30	1	3
	2	<7 <sup>§</sup>	3	2
	2.5	300	3	2
	3	21	1	4
	3	7	8	3
	4	21	2	2
	6	NR	3	4
	6	30	2	4
	6	21 <sup>§</sup>	14	5
<b>SUH Atípico</b>	1	NR	2	10
	6	NR	2	2
	7	Crónico	2	5
	8	Crónico	NR	8
	8	<7	5	15
	8	<7	3	8
	16	Crónico <sup>¶</sup>	1	0
<b>Rechazo agudo</b>	3		2	3
<b>Lupus sistémico</b>	12		7	10
	16		10	8
<b>Henoch-Schönlein</b>	6		26	36
	8		4	2

**Tabla 2: Inmunohistoquímica de biopsias renales.**

<sup>†</sup> Se refiere al número de días entre el comienzo del SUH y la biopsia renal. <sup>§</sup> Necrosis Cortical. <sup>¶</sup> Reparación luego del trasplante. NR: No realizado.

#### 4.1.7.- PARÁMETROS EVALUADOS EN LOS PACIENTES CON SUH. CORRELACIONES

Retrospectivamente, los pacientes fueron categorizados en tres clases según sus parámetros clínicos y bioquímicos, de acuerdo al criterio de Gianantonio <sup>6</sup>.

	Severidad de la disfunción renal		
	Grado I (n=9)	Grado II (n=13)	Grado III (n=9)
<b>Parámetros generales</b>			
Edad (meses)	31.0±23.2	42.4±36.3	40.3±33.5
Duración de la diarrea (días)	5.0±3.6	1.8±0.6	3.2±0.9
<b>Parámetros sanguíneos y renales</b>			
Plaquetas (x10 <sup>9</sup> /L)	98.9±123.5	67.6±28.2	49.3±21.1
Hematocrito	22.0±3.0	21.0±5.1	20.1±5.5
Urea (mmol/L)	20.1±14	28.6±14.8	37.8±27.5
Creatinina (µmol/L)	195±167	292±211	617±297
Días desde el inicio de la diarrea *	5.5±1.9	5.4±4.4	7.0±8.4

**Tabla 3: Datos Clínicos y bioquímicos de los pacientes con SUH.**

Los pacientes fueron clasificados en casos leves (Grado I: sin anuria), casos moderados (Grado II: menos de 7 días de anuria), ó casos severos (Grado III: más de 7 días de anuria). Los datos representan la media ± SD. \* Días desde el inicio de la diarrea: se refiere al número de días entre el inicio de la diarrea y la recolección de la muestra de sangre.

#### Correlaciones

Seguidamente a los resultados mostrados, se analizó la existencia de correlaciones entre las alteraciones inmunológicas encontradas en los niños con SUH y el grado de severidad, tal como se observa en la *Tabla 4*.

Se encontró correlación negativa entre la severidad de la enfermedad y el porcentaje total de Mo circulantes CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup>. Entre las subpoblaciones de Mo, la severidad de los pacientes con SUH tuvo correlación negativa con el porcentaje de células CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup>/CD62L<sup>+</sup> ( r= -0.67, p= 0.0096, n=13). O sea aquellos niños que tuvieron mayor compromiso renal presentaron una

disminución más marcada en la subpoblación de Mo “clásica” en los niños Sanos. En paralelo, se observó correlación positiva entre la severidad y el porcentaje de células que perdieron el CX<sub>3</sub>CR1 ( $r=0.60$ ,  $p=0.027$ ,  $n=13$ ).

También se notó que la expresión de CD62L en ambas subpoblaciones de Mo, CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> y CX<sub>3</sub>CR1<sup>-</sup>, correlaciona de forma negativa con la severidad ( $r= -0.62$ ,  $p=0.022$ ; y  $r= -0.56$ ,  $p=0.045$ ,  $n=13$  para ambos), lo cual significa que se acentúa la pérdida de CD62L al aumentar el compromiso renal. No se observó ninguna correlación con el porcentaje de células NK.

Parámetros	Sanos	SUH			Correlación
		I	II	III	
%Mo CX <sub>3</sub> CR1 <sup>+</sup>	84.5± 2.7	60.7±8.8	68.7±10.6	34.7±8.8*	$r= -0.4$ $p=0.017$
%Mo CX <sub>3</sub> CR1 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup>	65.4 ± 4.5	65.4 ± 4.5	53.6± 6.2	58.1± 9**	$r= -0.67$ $p=0.001$
%Mo CX <sub>3</sub> CR1 <sup>-</sup> CD62L <sup>+</sup>	12.2± 4.5	35.3± 4.1*	28.7± 12.3	55.5± 7.3***	$r= 0.6$ $p=0.027$
IMF CD62L (en CX <sub>3</sub> CR1 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> )	217.4± 31.6	303.5± 5.1	136.8± 9	94.4± 26.5**	$r= -0.56$ $p=0.045$
IMF CD62L (en CX <sub>3</sub> CR1 <sup>-</sup> CD62L <sup>+</sup> )	432.7± 64.2	432.7±64.5	329.4± 29.8	262.7±41.2**	$r= -0.62$ $p=0.022$

**Tabla 4: Correlaciones.** Los datos fueron analizados mediante el test Mann Whitney. \* $<p0.05$ ; \*\* $<p0.005$ , \*\*\* $<p0.0005$  comparado con los Sanos. Las correlaciones entre los datos inmunológicos y clínicos fueron analizada con el test no paramétrico Spearman



Hasta la actualidad, aun no se conoce como la Stx alcanza su órgano blanco. Conocer ese mecanismo, seria de mucha utilidad para el desarrollo de nuevas estrategias preventivas ó terapéuticas de la enfermedad. El receptor específico de Stx, Gb3, se encuentra presente en endotelio y epitelio renal. Tambien se ha identificado una variante del receptor presente en células del sistema inmune como el Mo<sup>20,27,168</sup>. Por eso se ha propuesto que el Mo, podría actuar como transportador ó células “carrier” de la toxina.<sup>1</sup>

Por otro lado, se ha demostrado que los Mo/macrófagos contribuyen al daño endotelial ó epitelial, durante enfermedades renales mediante la producción de enzimas proteolíticas, citoquinas y factores de crecimiento como la IL1, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ . Algunos de estos factores en el caso del SUH, sensibilizan al endotelio a los efectos de la Stx, mientras otros actúan como efectores directos de daño tisular. En otros casos dichos factores inducen la proliferación de fibroblastos y la producción de matriz extracelular llevando a la fibrosis. Si bien el mecanismo mediante el cual las células mononucleares entran al intersticio no está aún bien identificado, es muy probable que factores quimiotácticos y moléculas de adhesión estén involucradas<sup>169</sup>. En diferentes enfermedades glomerulares se encontró que una de las quimioquinas/molécula de adhesión que participa en la infiltración de células mononucleares, es la fractalquina. El bloqueo de la interacción de esta molécula con su receptor, mejora la falla renal en modelo experimentales de glomerulonefritis<sup>3</sup>

Teniendo en cuenta estos antecedentes y los resultados presentados, en donde demostramos la disminución absoluta y relativa de las poblaciones leucocitarias CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> (NK y Mo) en sangre periférica en pacientes con SUH, nos planteamos dos hipótesis de trabajo para analizar los procesos a través de los cuales los Mo podrían contribuir al daño endotelial/epitelial en presencia de la Stx.: 1) que la interacción CX<sub>3</sub>CL1-CX<sub>3</sub>CR1, ayudara al ó potenciara el reclutamiento de leucocitos CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> potencialmente citotóxicos (Mo y NK) en endotelios/epitelios injuriados, con alta expresión de CX<sub>3</sub>CL1. Dentro de esta hipótesis consideramos la posibilidad que los MO, sirvieran también como transportadores de la toxina Stx. Para esto, como modelo experimental *in vitro*, se utilizaron cultivos de células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) y de células epiteliales renales humanas (HRTEC), Mo purificados de dadores voluntarios y Stx1, ya que es una toxina comercial, purificada por HPLC y sin trazas de otros contaminantes como LPS, que podrían interferir en los resultados. 2) que a través de la activación leucocitaria, en forma directa por la Stx y/ó indirectamente a través de las señales de daño que expresa el endotelio/epitelio tras la injuria por la Stx (aumento de moléculas de adhesión, quimioquinas, citoquinas, factores protrombóticos), los Mo modulen específicamente la expresión de su receptor CX<sub>3</sub>CR1. Para esto, como modelo experimental *in vitro*, se utilizaron Mo purificados de dadores voluntarios, células de la línea monocítica THP-1 y

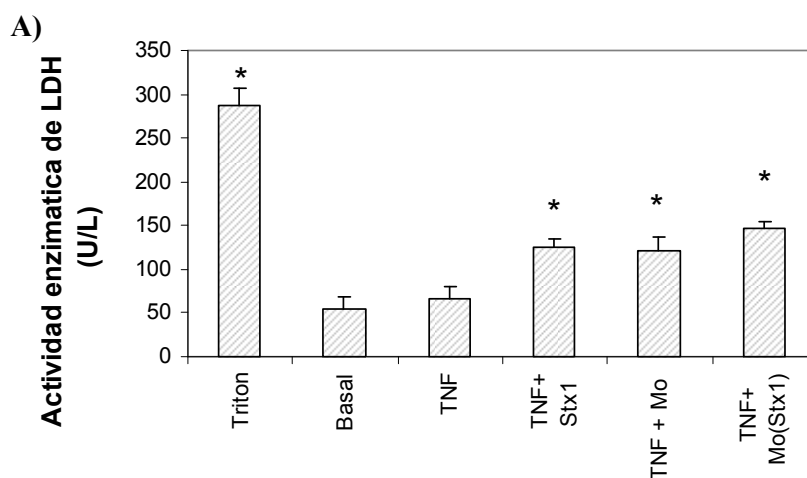
diversos factores inflamatorios y citoquinas presentes en los pacientes con SUH (LPS, Stx1, TNF, IL-10, IFN $\gamma$ ).

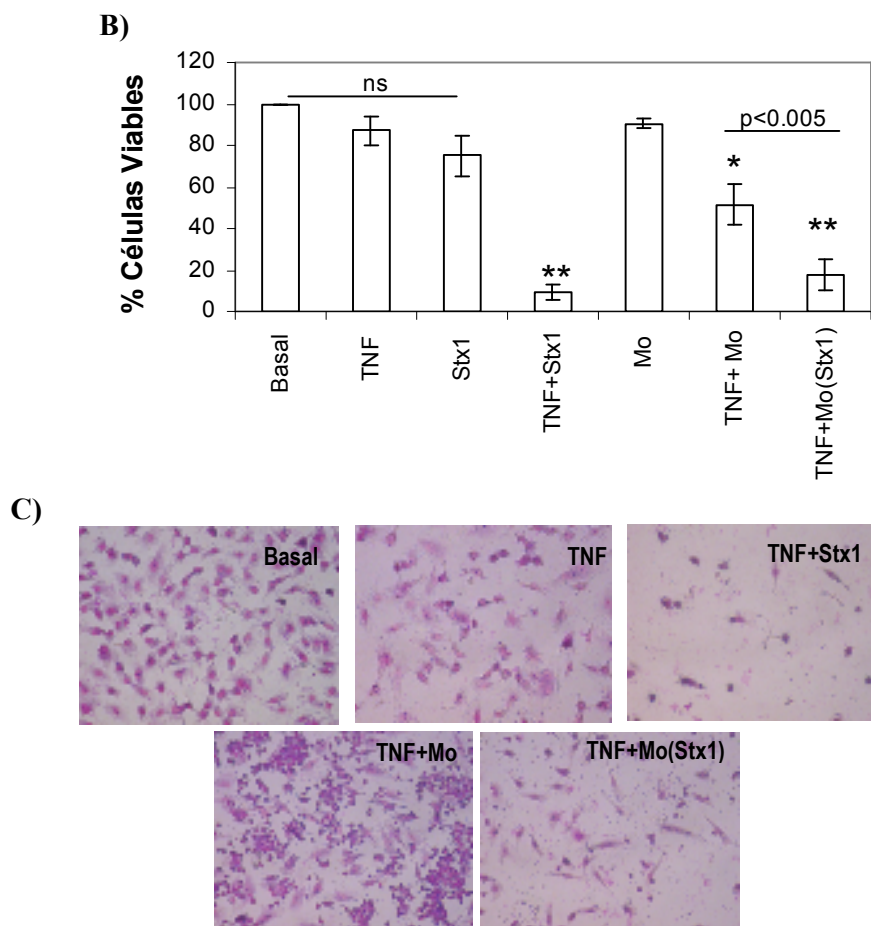
A continuación se mostraran los resultados obtenidos con respecto a la hipótesis 1) y 2) en la sección 4.2 y 4.3 respectivamente.

#### 4.2-DAÑO EN ENDOTELIO Y EPITELIO MEDIADO POR LOS MONOCITOS Y LA Stx1. ROL DE LA CX<sub>3</sub>CL1.

##### 4.2.1.- EFECTO CITOTÓXICO DE LA Stx1 Y LOS MONOCITOS, SOBRE CÉLULAS ENDOTELIALES DE CORDÓN UMBILICAL HUMANO (HUVEC)

Las células HUVEC, se mantuvieron durante 20 hs con Medio RPMI (basal) ó con TNF- $\alpha$  (10ng/ml) para inducir la expresión de Gb3, receptor específico de la Stx, tornándolas de esta manera, sensibles a la acción citotóxica de dicha toxina. Paralelamente, dicho estímulo inflamatorio induce la expresión de fractalquina anclada a membrana<sup>126</sup>. Luego se incubaron con Stx1 (50ng/ml) ó con Monocitos(Mo) que habían sido previamente incubados con Medio (Mo) ó con Stx1 (Mo(Stx1)) durante 1 h a 37°C y lavados dos veces, para eliminar el exceso de toxina que no hubiera sido captado por los monocitos. Después de 6 hs, se recogió el sobrenadante para evaluar la actividad de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH) como indicador de daño endotelial, y además las células HUVEC se fijaron y tiñeron con colorante May Grünwald-Giemsa, para realizar el recuento de las células viables por microscopía óptica. Como se observa en la *Figura 7 (A y B)* si bien la estimulación con TNF $\alpha$  *per se*, no afecta la viabilidad del endotelio, lo sensibiliza al efecto citotóxico de la Stx1 como de los Mo. Finalmente, los Mo(Stx1) incrementaron aún más el daño celular comparado con los Mo basales (*Figura 7 B y C*). Esto podría deberse a que el Mo(Stx1) se activa luego de interactuar con la toxina y libera factores inflamatorios que contribuyen al daño endotelial; ó también puede ser consecuencia del efecto directo de Stx1 captada por el Mo (por unión inespecífica ó específica con su receptor) y liberada sobre el endotelio.





**Figura 7: Daño en células HUVEC por acción de la Stx1 y los Mo, luego de 6 hs de tratamiento.**

Se incubaron las monocapas de células endoteliales ( $2 \cdot 10^4$  células/pozo) con medio sólo o con  $TNF\alpha$  (10ng/ml) durante 24hs. Después se trataron las células con Stx1 (50ng/ml), Mo ( $2 \cdot 10^5$ ) ó Mo(Stx-1) durante 6 hs, se recogió el sobrenadante para la medición de LDH y se fijaron y tiñeron las células HUVEC con colorante May Grünwald-Giemsa, para proceder al recuento del número de células viables. Se contaron tres campos en cada condición experimental, por duplicado. A) Medición de LDH en el sobrenadante luego de 6 hs, expresada en U/ml. El detergente Triton fue utilizado como control de máxima liberación/actividad de la enzima.  $*p < 0.05$  comparado con  $TNF\alpha$ ; t-test pareado ( $n=3$ ). B) Los datos se muestran como el promedio del número de células vivas, relativizado al basal.  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.005$  comparado con  $TNF\alpha$ ; t-test pareado ( $n=5$ ). C) Fotografías representativas donde se observa el daño endotelial en diferentes condiciones (200x)

#### **4.2.2.- PAPEL DE LA FRACTALQUINA EN EL DAÑO MEDIADO POR LOS Mo(Stx1) SOBRE EL ENDOTELIO ACTIVADO.**

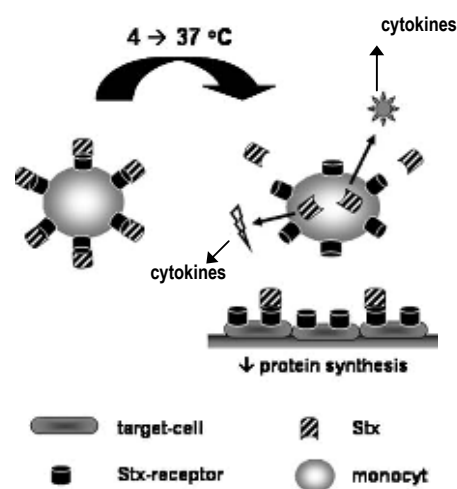
Efectos similares y más reproducibles se obtuvieron al aumentar el tiempo de incubación a 20 hs y disminuir la concentración de Stx1 (5ng/ml), por lo cual en adelante, los experimentos se realizaron en dichas condiciones. Adicionalmente, para evitar la variabilidad de los Mo entre los distintos dadores, se ensayó la línea monocítica THP1, (la cual expresa CX<sub>3</sub>CR1 constitutivamente)

Como se muestra en la *Figura 8 A*, se encontró que el daño ejercido por la Stx1, es específico ya que se revierte casi totalmente en presencia de anticuerpos neutralizantes anti-Stx1/Stx2 (Ac, 2µg/ml). Las células THP1 en condiciones basales (THP1) ó preincubadas con Stx1 (THP1(Stx1)), se comportaron de manera similar a los Mo produjeron similar daño endotelial que los Mo (*Figura 8A*). Similar fue el efecto cuando los Mo ó las THP1 se incubaron con Stx1 a 4°C, para frenar el metabolismo celular y la posible endocitosis de la toxina, previa a la incubación con el endotelio.

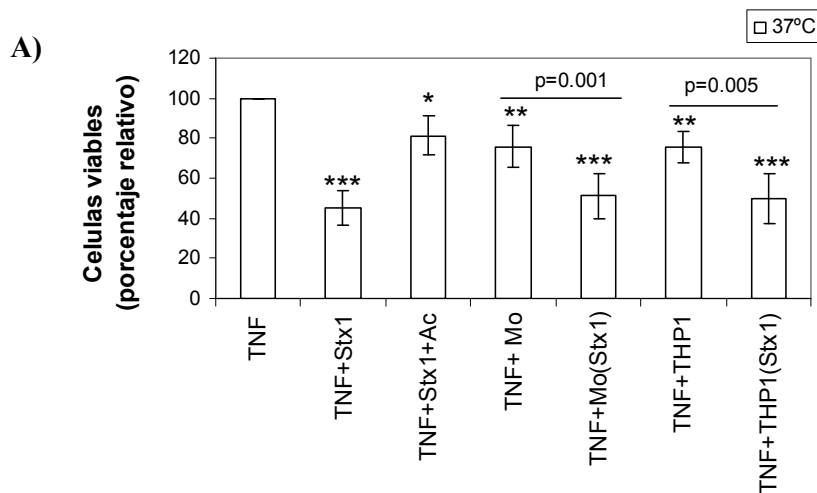
En paralelo, para descartar que los efectos citotóxicos vistos, se debieran a trazas de Stx1 libre en el medio, se evaluó el efecto del sobrenadante del lavado de los Mo(Stx1) (*Figura 8B*). Dicho sobrenadante no tuvo ningún efecto tóxico sobre el endotelio sensibilizado con TNFα.

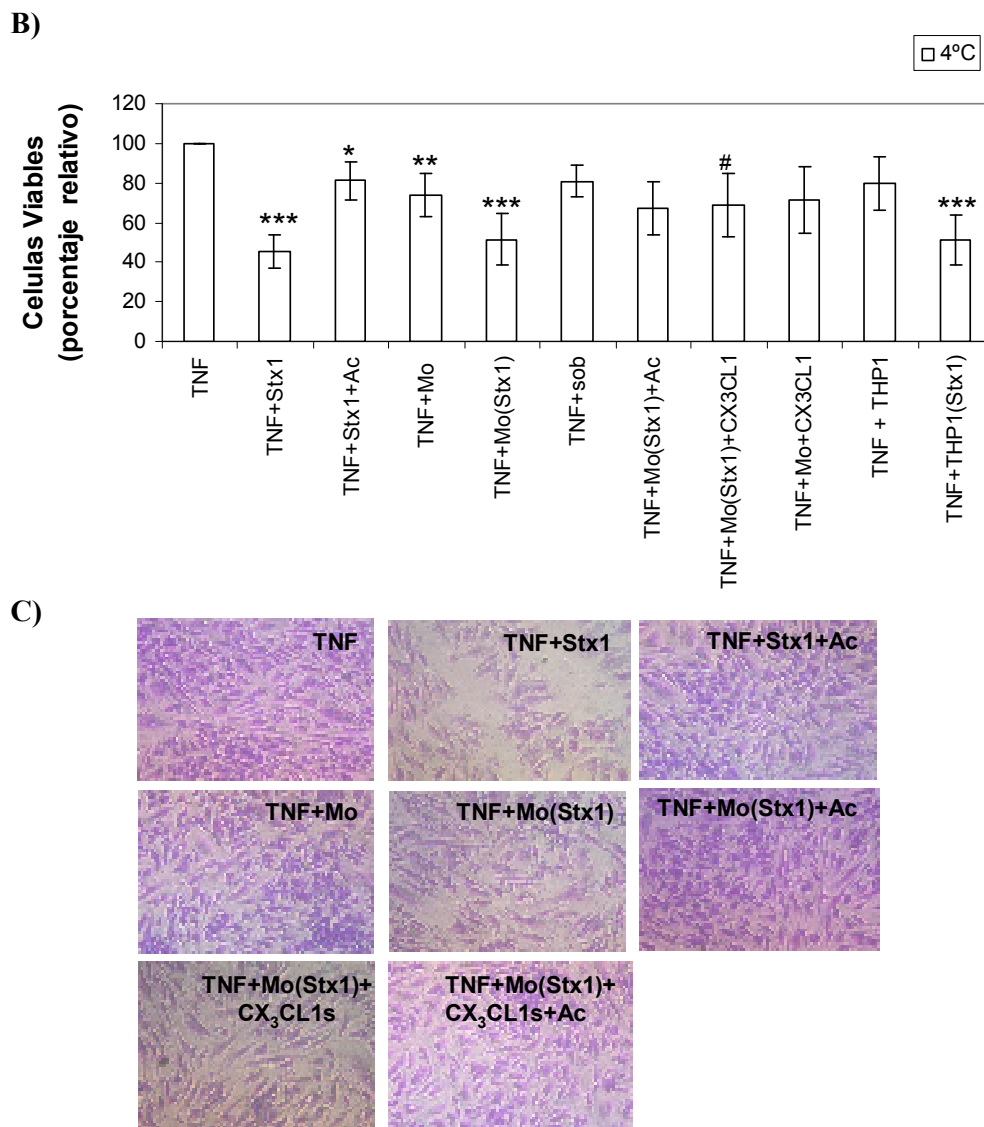
#### Esquema:

Los monocitos cargados con Stx a 4°C se incubaron sobre las células target, a 37°C. Luego de 20 hs se evaluó el daño en el endotelio o epitelio. Extraído de <sup>1</sup>



Finalmente, con la idea de investigar si el sistema CX<sub>3</sub>CL1-CX<sub>3</sub>CR1 participa en el daño endotelial mediado por los Mo(Stx1), se bloqueó esta interacción con CX<sub>3</sub>CL1 soluble. Para ello los Mo preincubados con Medio ó Stx1, se incubaron con CX<sub>3</sub>CL1 soluble (500ng/ml) durante 30 minutos en frío, antes de entrar en contacto con el endotelio. En estas condiciones, el daño endotelial ejercido en presencia de Mo(Stx1) disminuye significativamente. Por otro lado los efectos fueron los mismo en presencia de Mo basales, con ó sin esta quimioquina soluble (*Figura 8B*)





**Figura 8: El daño mediado por los Mo(Stx1), involucra a la vía de la fractalquina.**

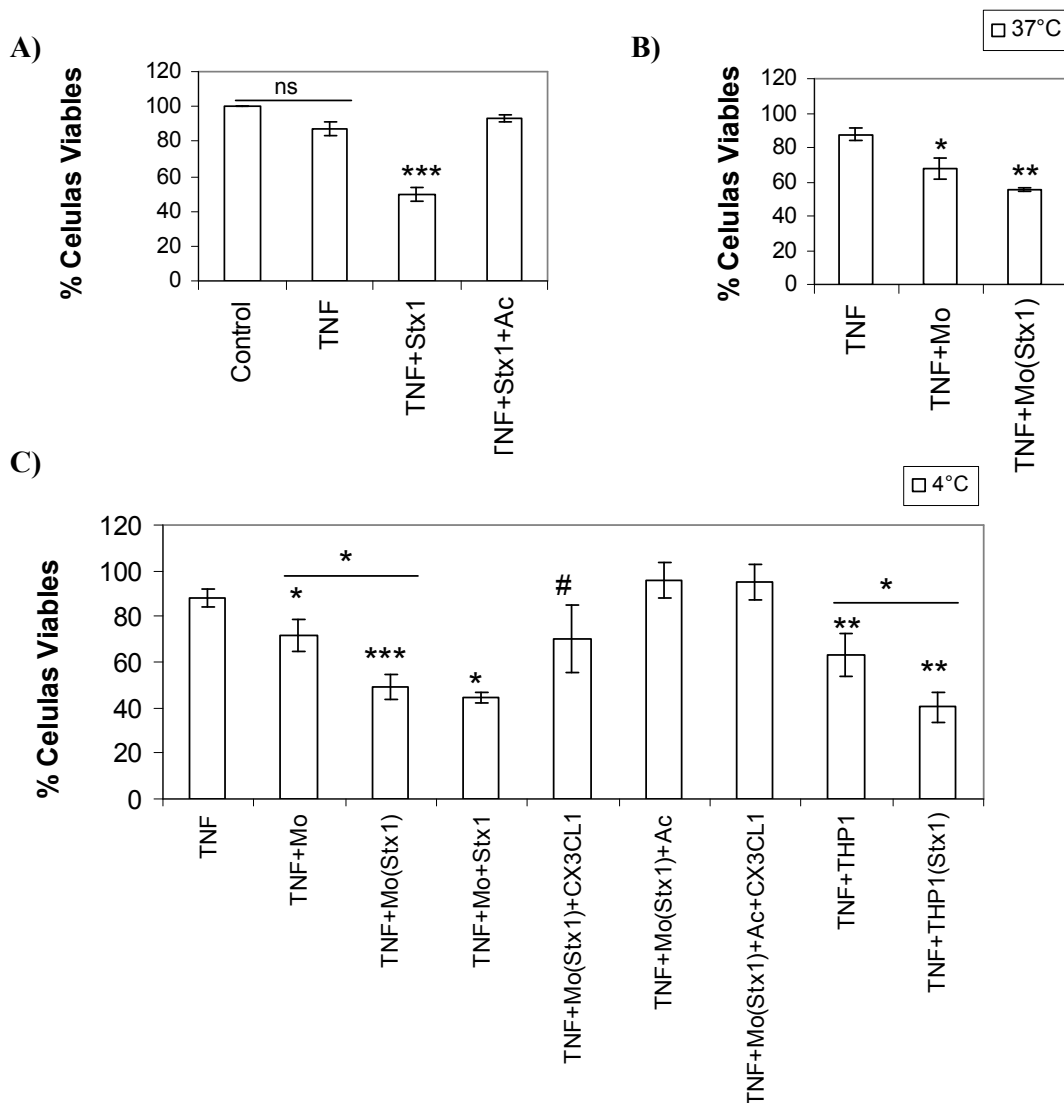
Se trataron las monocapas de células endoteliales ( $2 \cdot 10^4$  células/pozo) con  $TNF\alpha$  (10ng/ml) durante 24hs y luego se incubaron con Stx1 (5ng/ml) ó Mo en diferentes condiciones durante 20hs más, se fijaron y tiñeron las células HUVEC con colorante May Grünwald-Giemsa, para proceder luego al recuento del número de células viables. Se contaron tres campos en cada condición experimental, por duplicado. Los datos se muestran como el promedio del número de células, relativizado al  $TNF\alpha$ . \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.001$  comparado con  $TNF\alpha$ ; # $p < 0.05$  comparado con Mo(Stx1); t-test pareado ( $n=5$ ). Los Mo ó Mo(Stx1) se preincubaron durante 1 h a A)  $37^\circ C$  ó B)  $4^\circ C$ . C) Fotografías representativas donde se observa el daño endotelial en diferentes condiciones (200x)

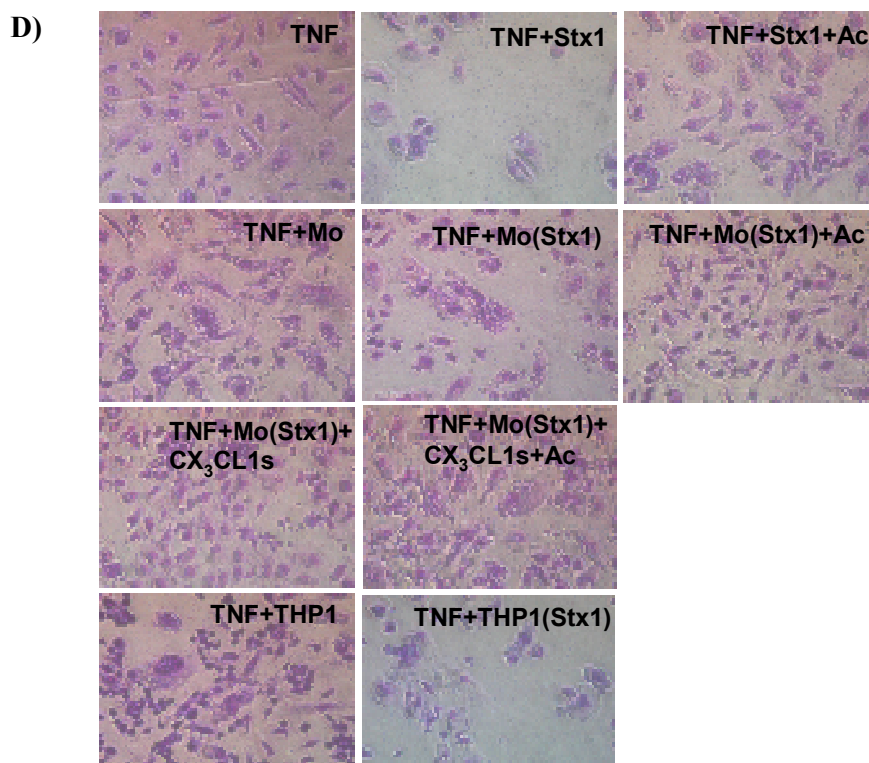
#### 4.2.3. EFECTO DE LA Stx1 Y LOS MONOCITOS SOBRE CÉLULAS EPITELIALES DE TÚBULO PROXIMAL DE RIÑÓN (HRTEC)

Durante el desarrollo del SUH, el epitelio renal, es un blanco que resulta gravemente dañado <sup>72</sup>. Por eso, se utilizaron células epiteliales de túbulo proximal de riñón (HRTEC) de biopsias humanas, para estudiar el efecto de los Mo, Mo(Stx1) y la participación de la vía de la

fractalquina. Las células HRTEC, expresan constitutivamente el Gb3, lo cual las hace sensibles a la toxina, de todos modos, se pretrataron con TNF $\alpha$  (10ng/ml) y LPS (1 $\mu$ g/ml) para inducir la expresión de la fractalquina, según reportado en bibliografía<sup>152</sup>. Tanto monocitos como células THP1, fueron incubados durante 1 h con medio ó con Stx1 (5ng/ml) a 4°C para permitir la adhesión de la Stx1.

Como se muestra en la *Figura 9A*, se observó que mientras el TNF- $\alpha$  *per se* no afecta la viabilidad de las células epiteliales, es evidente la acción citotóxica de la Stx1, de manera específica, ya que se revierte en presencia de Ac. Si bien, los Mo provocan daño epitelial, éste es incrementado aun más cuando los Mo son preincubados con Stx1 (Mo(Stx1)), a 37°C (*Figura 9B*) ó a 4°C (*Figura 9C*). El daño por Mo(Stx1), disminuyó significativamente en presencia de Ac anti Stx ó de CX<sub>3</sub>CL1 soluble. Las células THP1 actuaron de similar manera, tal como sucedió en el caso del endotelio. (*Figura 9C*).



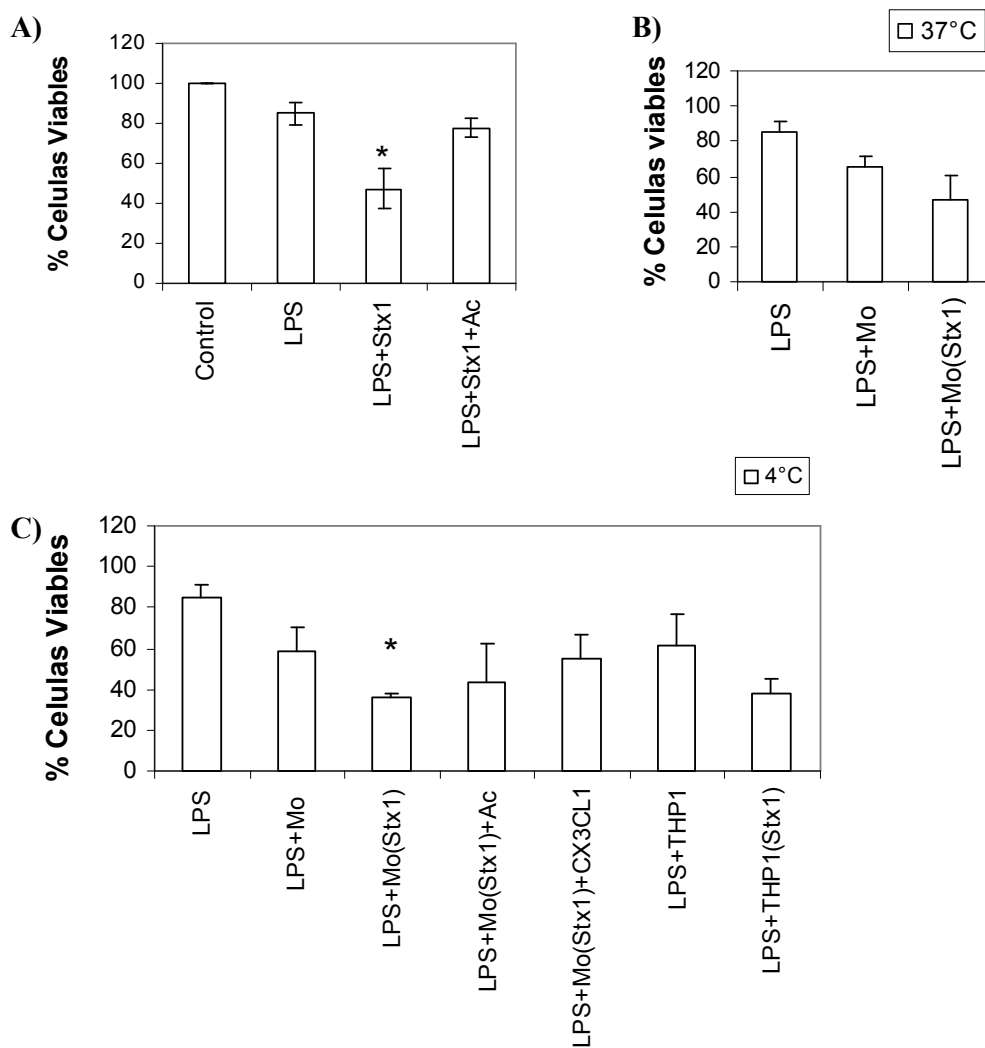


**Figura 9: Daño mediado por Stx1 y monocitos en células epiteliales estimuladas con TNF $\alpha$ .**

Las células HRTEC fueron incubadas durante 20 hs con medio (control) ó TNF $\alpha$  (10 ng/ml). Luego fueron tratadas con Stx1 (5ng/ml), Mo ó Mo(Stx1), THP1 ó THP1(Stx1) durante 20 hs y después fijadas con colorante May Grünwald-Giemsa, para proceder luego al recuento del número de células viables. Se contaron tres campos en cada condición experimental, por duplicado. Los datos se muestran como el promedio del número de células, relativizado al control. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.001$  comparado con TNF $\alpha$ ; # $p < 0.05$  comparado con Mo(Stx1) A) Las células epiteliales se incubaron con Medio ó con TNF $\alpha$  (10ng/ml) junto a Stx1, en presencia o ausencia de Ac. B) Los Mo ó Mo(Stx1) se preincubaron durante 1 h a 37°C ó C) 4°C. D) Fotografías representativas donde se observa el daño epitelial en diferentes condiciones (200x)

Otro factor inflamatorio que activa el epitelio, e induce la expresión de CX<sub>3</sub>CL1 en membrana, es el LPS (Lipopolisacárido). Bajo estas condiciones de estimulación ó activación, también se observó daño en presencia de Stx1 (Figura 10A), con Mo sin ó con Stx1 a 37°C (Figura 10B) ó 4°C (Figura 10C). Los Ac anti Stx ó la incubación con CX<sub>3</sub>CL1 soluble lograron disminuir el daño, tal como ocurrió en el epitelio sensibilizado con TNF $\alpha$ .





**Figura 10: Daño mediado por Stx1 y monocitos en células epiteliales estimuladas con LPS**

Las células HRTEC fueron incubadas durante 20 hs con medio (control) ó LPS (1µg/ml). Luego fueron tratadas con Stx1 (5ng/ml), Mo ó Mo(Stx1), THP1 ó THP1(Stx1) durante 20 hs y después fijadas con colorante May Grünwald-Giemsa, para proceder luego al recuento del número de células viables. Se contaron tres campos en cada condición experimental, por duplicado. Los datos se muestran como el promedio del número de células, relativizado al control. \* $p < 0.05$  comparado con LPS.

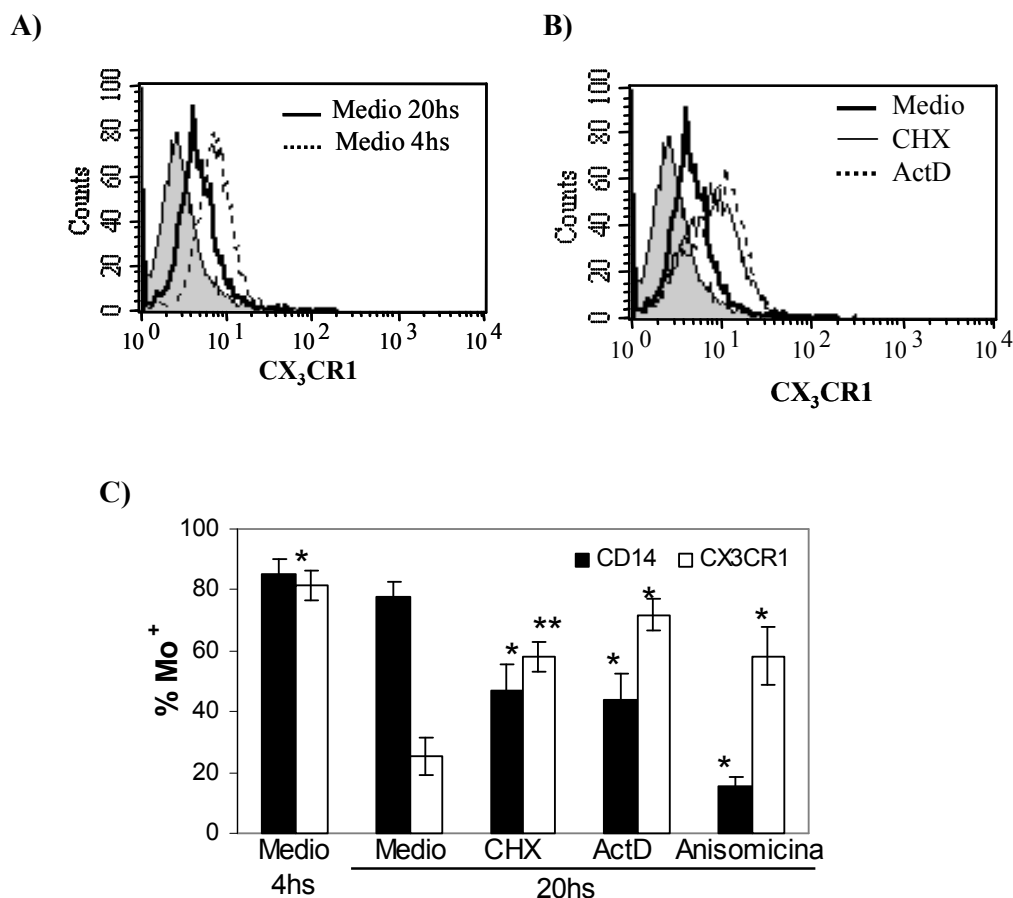
### **4.3. MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CX<sub>3</sub>CR1 EN MONOCITOS.**

#### **4.3.1- EXPRESIÓN DE CX<sub>3</sub>CR1 EN MONOCITOS DURANTE EL CULTIVO. EFECTO DE INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS PROTEICA.**

Se purificaron Mo humanos según lo indicado en materiales y métodos, obteniendo un grado de pureza >95% (fenotipo CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>-</sup>/CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup>). Se analizó la expresión de CD14, marcador de la población monocítica, y de CX<sub>3</sub>CR1, receptor para fractalquina, después de 0, 4 ó 20 hs de cultivo. Se observó una pérdida significativa de CX<sub>3</sub>CR1 en membrana, mientras que la expresión de CD14 se mantenía constante luego de 20hs de cultivo. (*Figura 11, A y C*). Para descartar que la pérdida de CX<sub>3</sub>CR1 se debía a ausencia de señales de sobrevivencia, se trataron los Mo con el factor activador de colonias de macrófagos, GM-CSF (50ng/ml), durante 20hs. En dichas condiciones tampoco se logró evitar la disminución de CX<sub>3</sub>CR1 (%CX<sub>3</sub>CR1: Medio=63.2±4.1; GM=58.5±9.16; %CD14: Medio= 81.3± 8.3; GM=71.1±7.0; n=3)

Luego, con la idea de analizar si la downregulación de CX<sub>3</sub>CR1, era dependiente de la síntesis proteica, se probaron distintos inhibidores a nivel traduccional como la cicloheximida (CHX; 1ug/ml), y a nivel transcripcional como la actinomicina D (ActD; 0.5ug/ml) ó la anisomicina (0.1ug/ml). (*Figura 11, B y C*). Se observó que los inhibidores evitaron la downregulación de CX<sub>3</sub>CR1 durante el cultivo, acompañado de una pérdida significativa de CD14 (*Figura 11C*), indicando que tanto la pérdida de CX<sub>3</sub>CR1 como la expresión de CD14, son dependientes de la síntesis proteica. En paralelo, se analizó si la pérdida de CX<sub>3</sub>CR1 observada en los Mo, era consecuencia de la muerte celular, para ello se evaluó la apoptosis mediante citometría de flujo. Se observó que aunque los inhibidores, evitaron la pérdida de CX<sub>3</sub>CR1 durante el cultivo, también inducen un incremento en el porcentaje de monocitos apoptóticos. (Medio= 32%, CHX= 48%; ActD= 44%).

Estos datos sugieren que la ausencia de señales de supervivencia para el Mo durante el cultivo, no se asocian a la *down*-regulación de CX<sub>3</sub>CR1. Tampoco así, las señales apoptóticas, ya que si bien los inhibidores indujeron mayor apoptosis, en esas condiciones no se observó la pérdida del receptor.



**Figura 11: La expresión de CX<sub>3</sub>CR1 en membrana disminuye en monocitos durante el cultivo.** Se purificaron monocitos humanos y se cultivaron ( $1 \times 10^6$ /ml) durante 4 hs en medio ó durante 20 hs con medio ó con los siguientes inhibidores de síntesis proteica: CHX ( $1 \mu\text{g/ml}$ ), ActD ( $0.5 \mu\text{g/ml}$ ) ó Anisomicina ( $0.1 \mu\text{g/ml}$ ). Luego se lavaron las células, se incubaron con anticuerpos anti-CX<sub>3</sub>CR1 FITC, anti-CD14 PEcy5, ó con el control de isotipo, y se analizaron por citometría de flujo. **A)** Histograma representativo de la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 en membrana luego de 4 hs (línea discontinua) ó 20 hs de cultivo (línea continua). El histograma relleno corresponde al control de isotipo. **B)** Histograma correspondiente a un experimento donde se muestra la modulación de la expresión de CX<sub>3</sub>CR1, luego de 20hs de cultivo, con medio (línea negra), CHX (línea gris) ó ActD (línea discontinua). **C)** Los datos son expresados como el porcentaje de células CX<sub>3</sub>CR1 ó CD14 positivas, dentro de la región de monocitos definido por los parámetros de complejidad (forward, FSC) y tamaño (size, SSC). Cada barra representa el promedio  $\pm$  ES de 17 dadores sanos para los cultivos en medio, y de 6 dadores para los experimentos de inhibición de síntesis proteica. La estadística de los datos fue calculada por el t-test pareado, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  comparado con el medio a las 20hs, t-test pareado.

Uno de los mecanismos de regulación para los receptores de quimioquinas ampliamente estudiados, es la endocitosis. Por lo tanto se analizó si un mecanismo endocítico mediaba la disminución de CX<sub>3</sub>CR1 en los Mo. Para ello se investigó el efecto de la citocalasina B, inhibidor de la formación de los microfilamentos de actina, la cual logra finalmente evitar la movilización del citoesqueleto y la endocitosis. Se trataron los monocitos con medio ó citocalasina B ( $0.5 \mu\text{g/ml}$ ) durante 20 hs, y luego se analizó por citometría de flujo tanto la

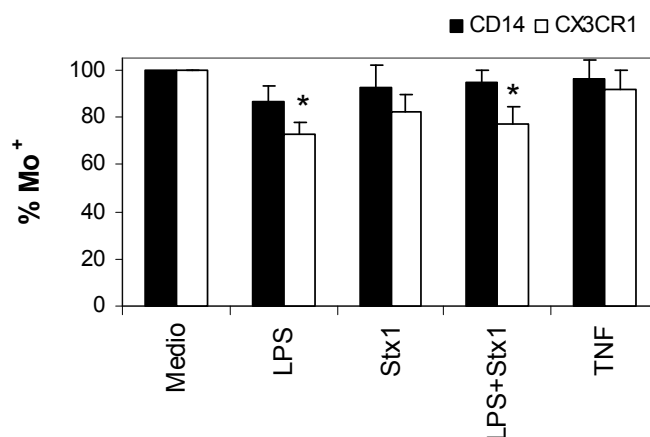
expresión de CX<sub>3</sub>CR1 como de CD14. Se observó que la presencia de citocalasina B, evitaba parcialmente la disminución de CX<sub>3</sub>CR1, acompañado de una significativa pérdida de expresión de CD14 (%CX<sub>3</sub>CR1 Medio: 26.3±5.8; CitB: 45.6± 3.7\*; %CD14 Medio: 81.7±7.7; CitB: 63.6± 8.3\*\*; \*p<0.05, \*\*p<0.01 comparado con el medio a las 20hs, t-test pareado; n=3).

Otra posibilidad que se consideró como posible mecanismo implicado en la *down*-regulación de CX<sub>3</sub>CR1, es el clivaje de este receptor durante el cultivo por acción de proteasas. Por ello, se analizó el efecto de un “cocktail” comercial de inhibidores de proteasas (leupeptina, pepstatina A, aprotinina, 4-(2-aminoetil)benzenesulfonil fluoride (AEBSF), bestatina.). Sin embargo no se observó ningún tipo de efecto sobre la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 (datos no mostrados), luego del cultivo de los Mo en presencia del *cocktail*.

Finalmente para investigar si la pérdida del receptor se debe al efecto de algún factor soluble secretado por el monocito durante el cultivo, se recogió el sobrenadante luego de 20 hs de cultivo y se utilizó como medio condicionado sobre Mo recién purificados. Dicho sobrenadante no modificó la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 luego de 4 hs de cultivo, (%CX<sub>3</sub>CR1: Medio: 85.5±3.8 vs Sobrenadante: 80±2,7; n=7).

#### 4.3.2.- PAPEL DE MEDIADORES INFLAMATORIOS Ó ANTIINFLAMATORIOS SOBRE LA EXPRESIÓN DE CX<sub>3</sub>CR1.

Con el objetivo de analizar si la pérdida de CX<sub>3</sub>CR1 durante el cultivo ó su expresión basal podrían ser activamente moduladas, se ensayó el efecto de distintos activadores ó deactivadores de los Mo. En principio se investigó el efecto de estímulos inflamatorios presentes en el SUH, como LPS (100ng/ml), TNF- $\alpha$  (10ng/ml) y la toxina Shiga-1 (Stx1, 5ng/ml) y se observó que dichos factores reducen la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 luego de 4 hs de cultivo, aunque sólo el LPS lo hizo de forma significativa (*Figura 12*). Los factores inflamatorios aceleraron la downregulación de CX<sub>3</sub>CR1, ya que luego de 20hs de cultivo, la expresión de dicho receptor fue similar en presencia o ausencia de dichos agonistas.



**Figura 12: La expresión de CX<sub>3</sub>CR1 en membrana luego de 4 hs en presencia de factores inflamatorios.**

Se purificaron monocitos humanos y se cultivaron ( $1 \times 10^6$ /ml) en medio, TNF $\alpha$  (10ng/ml), LPS (100ng/ml), Stx1 (5ng/ml) ó LPS junto con Stx1. Luego de 4 hs se lavaron las células y se incubaron con anticuerpos anti-CX<sub>3</sub>CR1 FITC, anti-CD14 PEcy5, ó con el control de isotipo, y se analizaron por citometría de flujo. Los datos son expresados como el porcentaje de células CX<sub>3</sub>CR1 ó CD14 positivas dentro de la región de monocitos, relativizados con respecto al Medio. Cada barra representa el promedio  $\pm$  ES. La estadística de los datos fue calculada por el t-test pareado, \* $p < 0.01$  comparado con el medio a las 4hs, t-test pareado.

Por otro lado, se analizó el efecto de ciertos agentes antiinflamatorios para el monocito como la IL-4, IL-10 y TGF- $\beta$ . Se observó que la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 durante el cultivo, no se modificó con IL-4 ó de TGF- $\beta$  (20hs: Medio=70.5 $\pm$ 12,1%, IL4= 73.01 $\pm$ 17.7% n=6; Medio=83.1 $\pm$  9.6, TGF $\beta$ =87.1 $\pm$ 11.3; n=5), sin embargo en presencia de IL-10 se evitó la pérdida de dicho receptor de forma significativa. (Medio=48.1 $\pm$ 5.1%; IL10=78.3 $\pm$ 5.8%\*; n=17, \* $p < 0.0001$  comparado con el Medio a las 20hs).

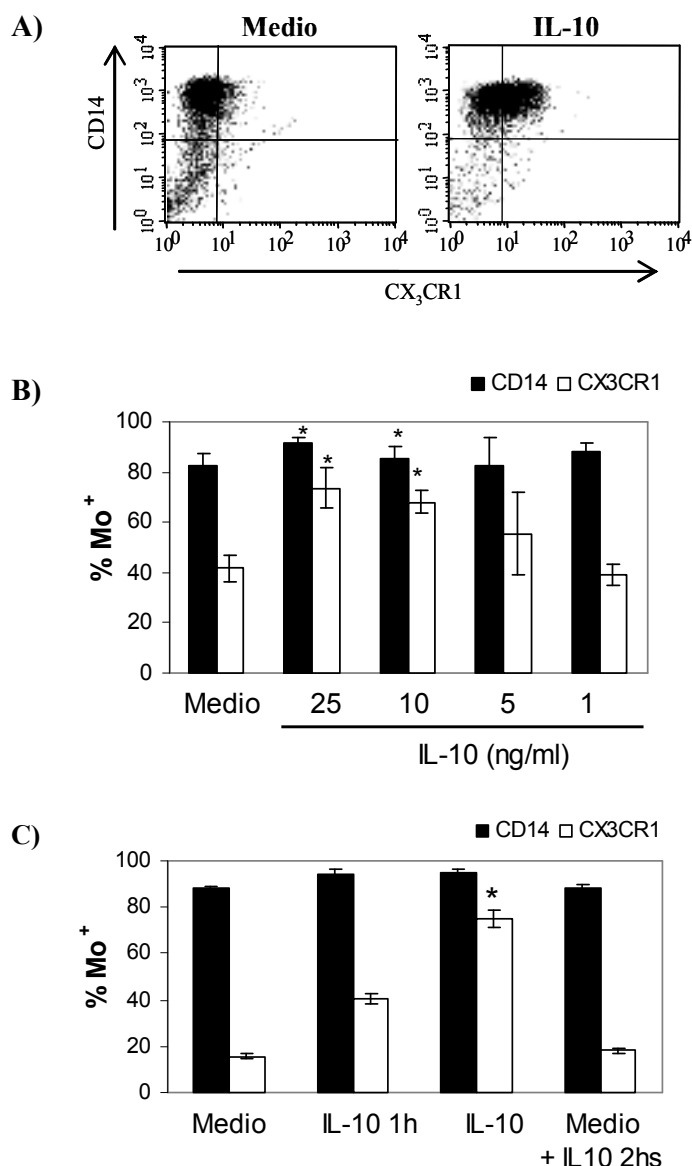
El efecto de los factores utilizados, fue específico para CX<sub>3</sub>CR1, ya que la expresión de CD14 no se modificó por los mediadores inflamatorios ó antiinflamatorios en las condiciones experimentales testeadas; a excepción de la IL-10, la cual aumentó significativamente la expresión de CD14 luego de 20hs de cultivo, coincidentemente con reportes de bibliografía. 170,171.

Estos datos sugirieron que la disminución de CX<sub>3</sub>CR1 en membrana, observada luego del cultivo, podía deberse a un proceso activo, factible de ser modulado por condiciones del cultivo ó por el balance de citoquinas en el medio.

#### **4.3.4.- EFECTO DE LA IL-10 SOBRE LA EXPRESIÓN DE CX<sub>3</sub>CR1.**

Luego de observar que la pérdida de CX<sub>3</sub>CR1 se evitaba en presencia de IL-10, y teniendo en cuenta que esta citoquina posee efectos antiinflamatorios ó deactivadores sobre los monocitos, nos pareció interesante investigar el mecanismo de acción implicado en la modulación del receptor. Para ello, se incubaron los monocitos durante 20 hs con distintas concentraciones de dicha citoquina. Se observó que la IL-10, evitaba la pérdida de CX<sub>3</sub>CR1 de manera dosis-dependiente, con efecto a concentraciones de 10-25ng/ml (Figura 13A y B), por lo cual se decidió trabajar en el resto de los experimentos con la dosis de 10ng/ml de IL-10. La expresión de CD14 también se incrementó en presencia de IL-10.

Con el objetivo de analizar si la modulación ejercida por la IL-10 sobre la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 era tiempo dependiente, se realizaron los siguientes experimentos: se incubaron los monocitos durante 1 h con IL-10, se lavaron y continuaron en cultivo por 20 hs más, en ese caso la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 alcanzó valores intermedios. Sin embargo, cuando las células fueron incubadas con IL-10 durante las últimas dos horas del cultivo, no se evitó la pérdida de expresión de CX<sub>3</sub>CR1, (Figura 13C). Estos resultados demostraron que la downregulación de CX<sub>3</sub>CR1 durante el cultivo, no es reversible y que además el efecto de IL-10 es tiempo dependiente.



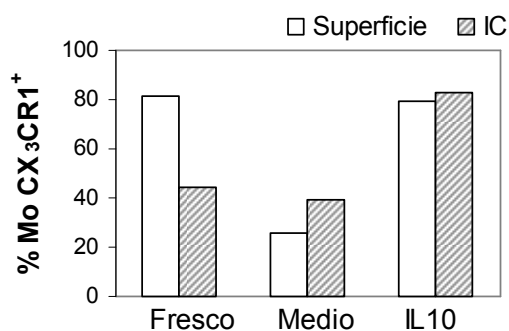
**Figura 13: La presencia de IL-10, evita la downregulación de CX<sub>3</sub>CR1 durante el cultivo.**

Se incubaron monocitos purificados ( $1 \times 10^6$ /ml) con Medio ó con distintas concentraciones de IL-10 durante 20 hs, luego se analizó la expresión de CD14 y CX<sub>3</sub>CR1 por citometría de flujo. **A)** Grafico de puntos mostrando la sobreexpresión de CD14-CX<sub>3</sub>CR1 en monocitos, luego de 20 hs de cultivo con IL-10 (10 ng/ml). **B)** Se incubaron monocitos ( $1 \times 10^6$ /ml) con distintas dosis de IL-10 durante 20hs. **C)** Se incubaron monocitos ( $1 \times 10^6$ /ml) en medio ó con IL-10 (10 ng/ml) agregada en distintos tiempos: IL-10 1h

(1h, se lavan las células y se cultivan durante 19 h); IL-10 (IL-10 durante 20hs); Medio+IL-10 2hs (se cultivan las células en medio 18hs y luego en presencia de IL-10 durante 2 hs mas). Cada barra representa el promedio  $\pm$  ES de  $n=16$  para el cultivo en medio e IL-10, y de  $n=3$  para los experimentos de curvas de tiempo y dosis. \* $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  comparado con el medio, t-test pareado.

#### 4.3.5- MECANISMOS CELULARES ACTIVADOS POR LA IL-10.

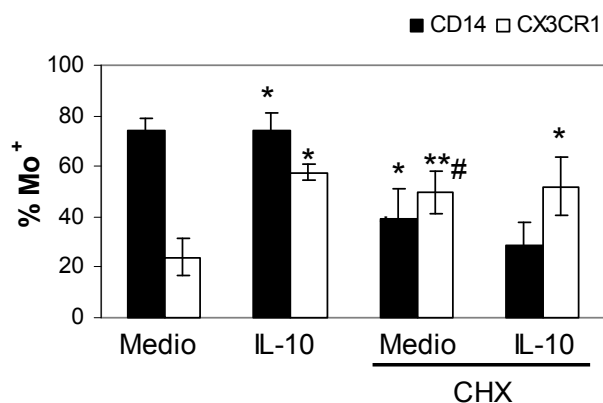
Con el objetivo de comprender el mecanismo celular implicado en la regulación de CX<sub>3</sub>CR1 en presencia de IL-10, se examinó si esta citoquina lograba movilizar el pool intracelular del receptor presente en los monocitos<sup>172</sup>. Para ello, se analizó la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 en membrana e intracelular, en células intactas ó permeabilizadas respectivamente, mediante citometría de flujo. Luego del cultivo, se observó que la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 en membrana decreció significativamente, pero no así el contenido intracelular (ic) de dicho receptor. En cambio, luego del tratamiento con IL-10, la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 en membrana se mantuvo, mientras que el pool intracelular aumentó significativamente. Estos datos nos sugirieron que la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 luego del tratamiento con IL-10, podría deberse no sólo a una movilización del pool intracelular, sino también a la síntesis *de novo* ó la inhibición de la degradación intracelular de dicho receptor.



**Figura 14: Expresión de CX<sub>3</sub>CR1 en superficie e intracelular**

Se utilizaron monocitos ( $1 \times 10^6/ml$ ) recién purificados (Fresco) ó luego del cultivo en Medio ó en IL-10 durante 20 hs, para analizar la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 en superficie en células intactas, ó el contenido intracelular en células permeabilizadas, por citometría de flujo. Se muestra un ejemplo representativo, donde cada barra representa el porcentaje de CX<sub>3</sub>CR1 en superficie e intracelular (ic)

Por otro lado, se evaluó el efecto de la IL-10 en presencia del inhibidor de síntesis proteica, cicloheximida (CHX). Como se observa en la *Figura 15*, el tratamiento simultáneo con IL-10 y CHX no causan efectos aditivos. La CHX también redujo la expresión de CD14 y bloqueó el aumento que inducía la IL-10 sobre este receptor. (*Figura 15*).



**Figura 15: Efecto del inhibidor CHX, sobre la modulación CX<sub>3</sub>CR1 mediada por IL-10.**

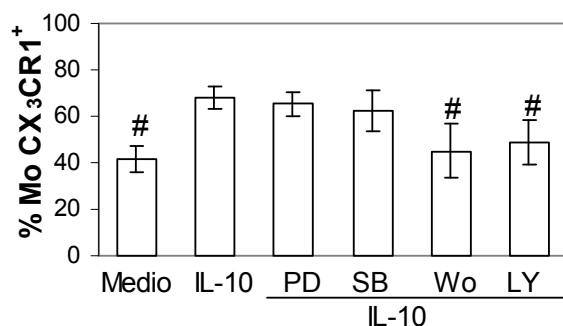
Monocitos purificados fueron cultivados ( $1 \times 10^6$ /ml) con medio ó con IL-10 (10 ng/ml) ó en ambas condiciones junto con CHX (1  $\mu$ g/ml), durante 20hs. Luego se analizó por citometría de flujo, el porcentaje de células positivas para la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 ó CD14, dentro de la región de monocitos. Cada barra representa el promedio  $\pm$  ES (n=5). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$  comparado con el Medio sólo; # $p < 0.005$  comparado con la IL-10, t-test pareado.

#### **4.3.6.- SEÑALES INTRACELULARES QUE PARTICIPAN EN LA MODULACIÓN DE CX<sub>3</sub>CR1 EJERCIDA POR IL-10.**

Está reportado que diferentes kinasas están involucradas en el mecanismo de acción de las citoquinas, en particular las MAPKs juegan un rol importante en la modulación ejercida por la IL-10 sobre varios receptores de superficie<sup>173</sup>. Entonces, con la idea de investigar que señales intracelulares podían estar involucradas en la modulación de CX<sub>3</sub>CR1 mediada por IL-10, se analizó el papel de las MAPks (ERK y p38). Para ello, se trataron monocitos con IL-10 durante 20 h, en presencia de los inhibidores de ERK (PD98059, 20  $\mu$ M) ó de p38 (SB203580, 30  $\mu$ M). Como se observa en la *Figura 16*, ninguno de los inhibidores de MAPK evitaron el efecto regulatorio de la IL-10. Sin embargo, ha sido reportado que ciertos efectos biológicos de la IL-10 están mediados por la PI3K<sup>174,175</sup>, entonces para analizar el papel de dicha kinasa en nuestro modelo, se incubaron monocitos con IL-10 y los inhibidores de la PI3K: Wortmanina (Wo, 100 nM) ó LY294002 (25  $\mu$ M).

En la *Figura 16*, se muestra que ambos inhibidores de la PI3K, bloquearon el efecto de la IL-10 sobre la expresión de CX<sub>3</sub>CR1. La presencia del inhibidor LY294002, no afectó la viabilidad celular, determinada por tinción con Tripan blue; no afectó la morfología celular, evaluada por citometría de flujo; y tampoco modificó la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 y CD14 en condiciones basales (datos no mostrados).



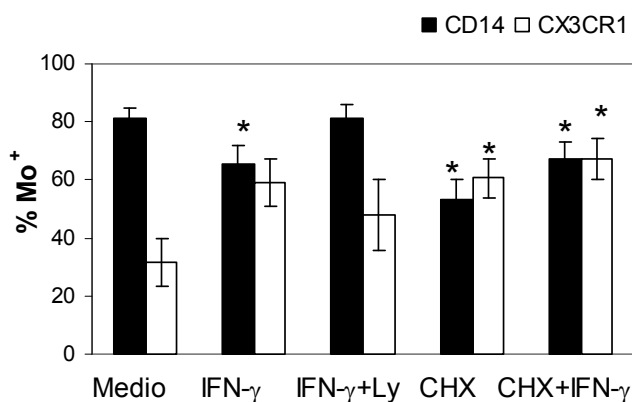


**Figura 16: Efecto de los inhibidores de MAPK ó de la PI3K sobre la regulación de la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 mediada por IL-10.**

Se preincubaron monocitos ( $1 \times 10^6$ /ml) durante 1h con distintos inhibidores de kinasas: (PD98059,  $20 \mu\text{M}$ ; SB20358,  $30 \mu\text{M}$ ; Wo,  $100 \text{ nM}$ ; LY294002,  $25 \mu\text{M}$ ) y luego se cultivaron durante 20hs en presencia de IL-10 ( $10 \text{ ng/ml}$ ). Los resultados se expresan como el porcentaje de células positivas  $\pm$  ES para la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 ( $n=5-7$ ). #  $p < 0.05$  comparado con IL-10, *t*-test pareado.

#### 4.3.7.- EFECTO DEL IFN- $\gamma$ SOBRE LA EXPRESIÓN DE CX<sub>3</sub>CR1.

Existen reportes que demuestran que el IFN- $\gamma$  y la IL-10 suelen tener efectos antagónicos en los monocitos<sup>176,177</sup>. Por este motivo, se estudió cual era el efecto del IFN- $\gamma$ , sobre la expresión de CX<sub>3</sub>CR1. Inesperadamente, se observó que la presencia de IFN- $\gamma$  ( $240 \text{ U/ml}$ ) evitó la pérdida de CX<sub>3</sub>CR1 durante el cultivo, a través de un mecanismo dependiente de la PI3K, y que además no se inhibe en presencia de CHX, de manera semejante a los efectos observados con la IL-10. (Figura 17). Por otro lado, y coincidentemente con reportes previos, el IFN- $\gamma$  down-reguló significativamente la expresión de CD14 (Figura 17).



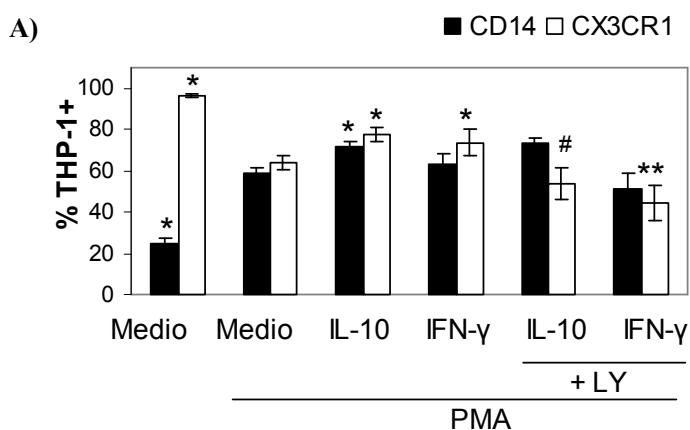
**Figura 17: El IFN- $\gamma$  evita la disminución de CX<sub>3</sub>CR1 durante el cultivo.**

Monocitos purificados fueron cultivados ( $1 \times 10^6$ /mL) durante 20hs con medio ó con IFN- $\gamma$  ( $240 \text{ U/ml}$ ) sólo, junto con LY294002 ( $25 \mu\text{M}$ ) ó junto con CHX ( $1 \mu\text{g/ml}$ ). Luego se analizó la expresión de CD14 y CX<sub>3</sub>CR1 mediante citometría de flujo. Los resultados se expresan como el porcentaje de células CX<sub>3</sub>CR1 ó CD14 positivas dentro de la región de monocitos. Cada barra representa el promedio  $\pm$  ES de 5-7 dadores, excepto para el medio ó IFN- $\gamma$  donde el  $n=11$ . \* $p < 0.05$  comparado con el medio; \*\*  $p < 0.05$  significativo comparado con IFN- $\gamma$  sólo; *t*-test pareado.

#### 4.3.8.- LA LÍNEA CELULAR THP-1, MADURADA EN PRESENCIA DE PMA, DISMINUYE SELECTIVAMENTE LA EXPRESIÓN DE CX<sub>3</sub>CR1

Con el objetivo de analizar las señales intracelulares que participan en la modulación de CX<sub>3</sub>CR1 en una población pura de células, se utilizó la línea monocítica THP-1, que expresa constitutivamente CX<sub>3</sub>CR1. En principio, se validaron las células THP-1 como modelo celular, analizando si modulaban la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 de la misma manera que los monocitos, en presencia de estímulos pro/anti-inflamatorios. .

El tratamiento de esta línea con PMA (5ng/ml), ester forbol activador de PKC, durante 48 hs, es un protocolo aceptado para madurar monocitos<sup>178</sup>. En nuestro modelo, se observó que las células diferenciadas con PMA, aumentaron significativamente su expresión de CD14 (aproximadamente del 20 al 60 %), acompañado de un descenso en la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 en membrana (aproximadamente del 90 al 60%), (Figura 18A). Estos resultados, reprodujeron los cambios observados en los monocitos durante el cultivo de 20 hs. Luego, se examinaron los efectos de IL-10 e IFN- $\gamma$  sobre la expresión de CX<sub>3</sub>CR1, en células THP-1 maduras. Como se observa en la Figura 18A, ambas citoquinas indujeron un aumento en la expresión de CX<sub>3</sub>CR1, el cual fue revertido en presencia del inhibidor específico LY294002; mientras que las MAPKs no tuvieron ningún efecto (datos no mostrados), de forma similar a lo ocurrido en monocitos. La IL-10 logró incrementar la presencia de CD14, tal como ocurre en la línea celular HL-60 según reportes.<sup>175</sup>



**Figura 18:** La línea monocítica THP-1 disminuye la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 durante la maduración con PMA.

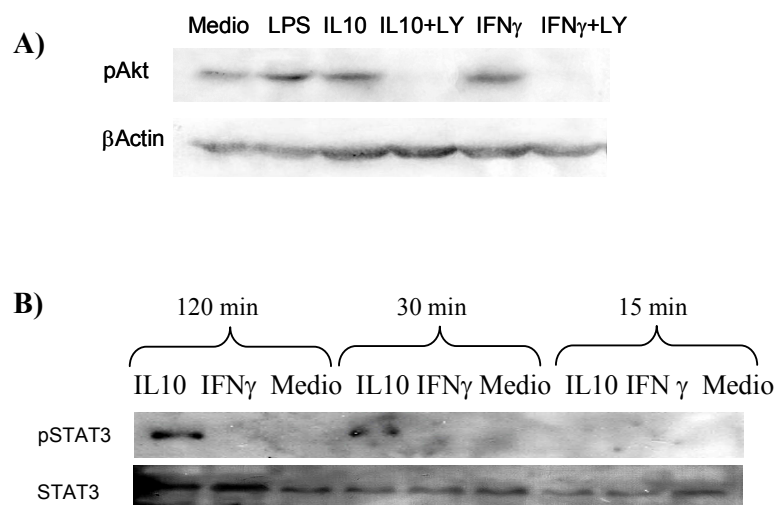
Las células THP-1 ( $1 \times 10^6$ /ml) fueron diferenciadas durante 48hs con PMA (5 ng/ml), luego se incubaron con medio, IL-10 (10 ng/ml) ó IFN- $\gamma$  (250 U/ml) durante 20hs. En algunos casos, se preincubaron 1h con LY294002 (25 $\mu$ M). Se analizó la expresión de por citometría de flujo. Los resultados muestran el porcentaje de células positivas  $\pm$  ES para cada marcador (n=5). \* $p < 0.05$  comparado con medio+PMA; \*\* $p < 0.05$  comparado IFN- $\gamma$  sólo; # $p < 0.02$  comparado con IL-10 sólo.

#### 4.3.9.- SEÑALES INTRACELULARES ACTIVADAS POR IL-10 E IFN $\gamma$

Uno de los efectores de la PI3K mejor caracterizados, es la serina-treonina kinasa llamada Akt (PKB)<sup>179</sup>. Por ello, se evaluó el estado de fosforilación de Akt para corroborar la activación de de la PI3K, en células THP1 maduras con PMA, luego del tratamiento con IL-10 é IFN- $\gamma$ . Los resultados mostrados en la *Figura 19A*, indican que tanto la IL-10 como el IFN- $\gamma$ , inducen después de 60 minutos, la fosforilación de Akt en las células THP-1. Esta activación se bloqueó en presencia de LY294002 (*Figura 19A*).

El IFN- $\gamma$  y la IL-10, luego de unirse a sus receptores, inician la activación de las kinasas Janus (JAK), las cuales finalmente activan a los factores STAT causando la transcripción de genes tempranos<sup>180-182</sup>. En nuestro sistema, se confirmó mediante WB, la activación de los factores STATs en presencia de ambas citoquinas. Se observó que mientras STAT3 sólo se activó con IL-10 (*Figura 19B*), el factor STAT1 fue fosforilado tanto con IL-10 como con IFN- $\gamma$  (*Figura 19C*).

Se investigó si señales “río abajo” de la PI3K, estaban implicadas en la fosofrilacion del STAT1 por efecto de ambas citoquinas. Para ellos se pretrataron células THP-1 con LY294002 ó medio durante 60 minutos, y luego se incubaron con IL-10 e IFN- $\gamma$  30 minutos, finalmente se evaluó la fosforilación de STAT1. Como se describe en la *Figura 19C*, la preincubación con LY294002 no evitó la fosforilación de STAT1, al menos en el residuo tirosina.



C)



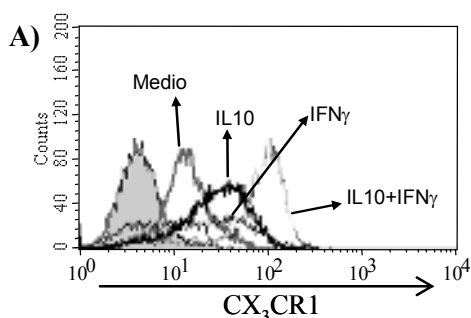
**Figura 19: Análisis de la activación de Akt, STAT3 y STAT1 en presencia de IL-10 e IFN- $\gamma$**

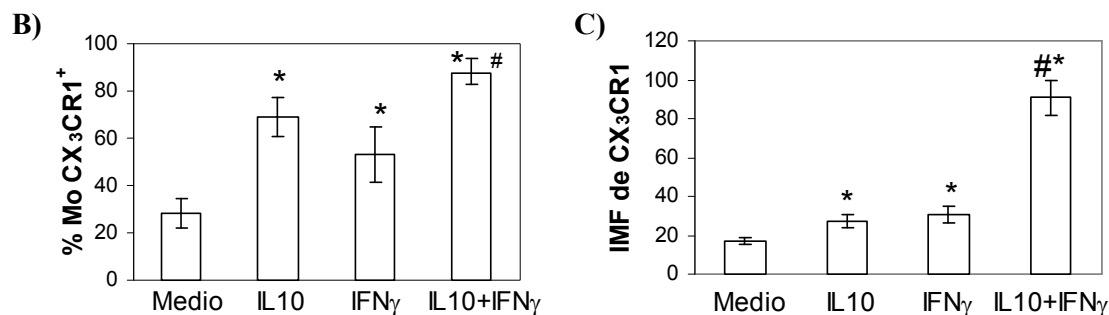
Células THP1 ( $2 \cdot 10^6$  células), previamente diferenciadas con PMA, fueron tratadas durante los tiempos indicados con Medio, IFN $\gamma$  (250 U/ml) ó IL10 (10 ng/ml). Luego se realizaron extractos proteico para ser analizados por inmunoblotting. **A)** Se incubaron las células con ó sin el inhibidor LY294002 (25 $\mu$ M) durante 60 minutos, y luego se estimularon con IL10 ó IFN durante 60 minutos más. Finalmente se prepararon extractos proteicos para analizar la fosforilación de Akt, mediante inmunoblotting, según materiales y métodos. Como control positivo, se incubaron células con LPS (1  $\mu$ g/ml) durante 60 minutos; y como control de "loading" en cada calle, se analizó la presencia de  $\beta$ -Actina. **B)** Se trataron las células con IL10 ó IFN durante 15, 30 ó 120 minutos y se realizaron extractos proteicos para estudiar la fosforilación de STAT3. **C)** Células THP-1 diferenciadas con PMA ( $1 \times 10^6$ /ml), se incubaron en medio ó con LY294002 (25  $\mu$ M) durante 60 minutos, y luego con IL-10 ó IFN- $\gamma$  durante 30 minutos. Se prepararon extractos proteicos para analizar la fosforilación de STAT1 en tirosina mediante inmunoblotting.

**4.3.10.- EFECTO DE LA IL-10 Y EL IFN- $\gamma$  DE MANERA CONJUNTA, SOBRE LA MODULACIÓN DE CX<sub>3</sub>CR1.**

Dado que ambas citoquinas, en nuestro modelo produjeron el mismo efecto sobre la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 aunque generalmente suelen activar caminos intracelulares antagónicos<sup>176,177</sup>, nos pareció interesante estudiar el efecto de la IL-10 y el IFN- $\gamma$ , de manera simultánea. Esto nos permitiría analizar si ambas citoquinas comparten señales intracelulares o de lo contrario activan caminos transduccionales independientes.

Cuando los monocitos fueron incubados simultáneamente con IFN- $\gamma$  e IL-10, se observó un incremento del porcentaje de monocitos CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup>, aún mayor que con cada citoquina por separado (Figura 20 B); sin embargo al analizar la expresión por célula de CX<sub>3</sub>CR1 mostrada como la intensidad media de fluorescencia (IMF), se notó claramente un efecto sinérgico ó potenciador de ambas citoquinas. (Figura 20 A y C).

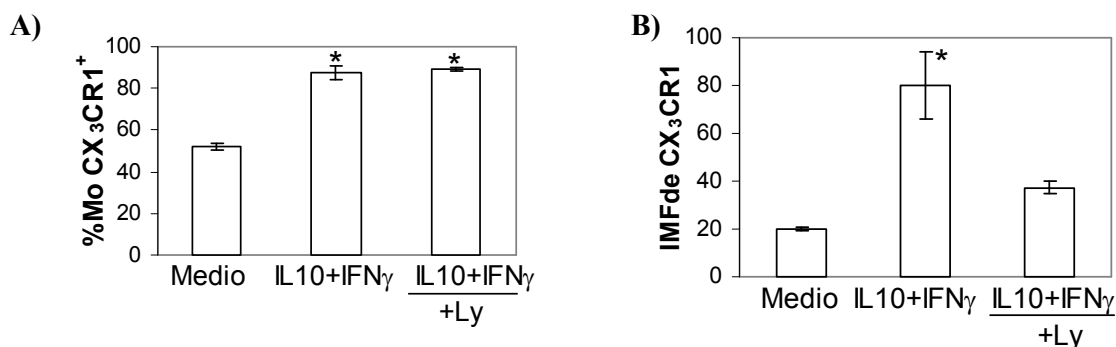




**Figura 20. Efecto sinérgico de la IL-10 y el IFN- $\gamma$**

Monocitos purificados fueron cultivados ( $1 \times 10^6$ /mL) durante 20hs con medio, IFN- $\gamma$  (240 U/ml), IL-10 (10 ng/ml) ó ambas citoquinas. Luego se analizó la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 mediante citometría de flujo. **A)** Histograma representativo de la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 luego del cultivo en medio, con IL-10, con IFN- $\gamma$  ó con ambas citoquinas. El histograma relleno corresponde al control de isotipo. La ordenada representa el número de células mientras que la abcisa corresponde a la intensidad de fluorescencia. **B)** Porcentaje de células CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> dentro de la región de monocitos. **C)** Los resultados se expresan como la IMF. Cada barra representa el promedio  $\pm$  ES. \* $p < 0.05$  comparado con el medio; # $p < 0.05$  comparado con el IFN- $\gamma$  sólo.

Luego de observar estos resultados, se analizó si el efecto de ambas citoquinas de manera conjunta, también estaba mediado por la PI3K. Para ello se preincubaron los monocitos durante 1 h con el inhibidor LY294002 y luego se agregó IL-10 e IFN- $\gamma$ . Después de 20 hs se analizó la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 mediante citometría de flujo, y aunque el LY294002 no modificó el porcentaje de Mo CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> (Figura 21A), se pudo observar una reversión parcial del efecto de ambas citoquinas cuando se analizó la expresión por célula de CX<sub>3</sub>CR1 (IMF) (Figura 21B), sugiriendo la activación de señales adicionales a la PI3K.



**Figura 21: Papel de la PI3K en el sinergismo de IL10 e IFN- $\gamma$**

Monocitos purificados fueron cultivados ( $1 \times 10^6$ /mL) durante 20hs con medio, con IFN- $\gamma$  (240 U/ml) e IL-10 (10 ng/ml) con ó sin LY294002 (25 $\mu$ M). Luego se analizó la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 mediante citometría de flujo. **A)** Porcentaje de células CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> dentro del región de monocitos, luego de cada tratamiento. **B)** Los resultados se expresan como la IMF. Cada barra representa el promedio  $\pm$  ES. \* $p < 0.05$  comparado con el medio

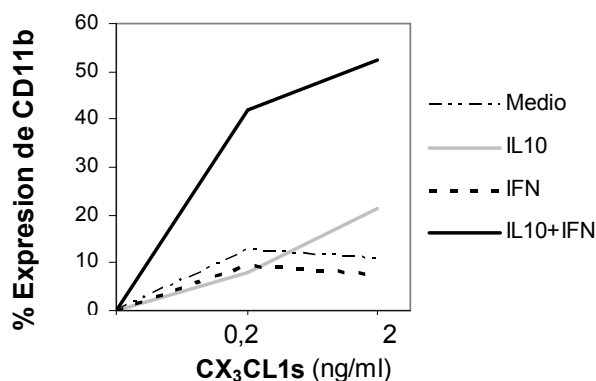
#### 4.3.11.- EFECTO BIOLÓGICO DE LOS CAMBIOS OBSERVADOS EN LA EXPRESIÓN DE CX<sub>3</sub>CR1

Teniendo en cuenta que las quimioquinas, luego de interactuar con sus receptores, pueden inducir la movilización de Calcio intracelular, se investigó éste mecanismo luego del estímulo con CX<sub>3</sub>CL1 soluble. Aunque se observó movilización de Calcio cuando se ensayo la población de mononucleares totales luego de la incubación con CX<sub>3</sub>CL1 soluble (0,1µg/ml; 0,01µg/ml), no se pudo reproducir este resultado en los Mo aislados, probablemente a la activación que sufren los Mo durante la purificación. Por lo tanto no fue posible de utilizar esta aproximación experimental, para evaluar los efectos de las citoquinas IL-10 e IFN-γ, ya que debe hacerse en la población pura.

Finalmente, para investigar si la regulación de la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 observada llevaba asociada cambios en su función por lo cual se midió la respuesta de dicho receptor a la fractalquina soluble (CX<sub>3</sub>CL1s), mediante la modulación de CD11b.

Previamente otros autores habían descripto cambios en la expresión de CD11b en Mo, como respuesta a la estimulación con CX<sub>3</sub>CL1<sup>183</sup> considerándolo un parámetro suficientemente sensible para medir la funcionalidad de CX<sub>3</sub>CR1. Por eso, se realizó este ensayo en nuestro modelo. Para ello, se trataron los Mo con las citoquinas indicadas durante 20 hs, luego se incubaron con distintas dosis de CX<sub>3</sub>CL1 soluble durante 15 minutos en estufa a 37°C, y finalmente se midió la expresión de CD11b por citometría de flujo. Se observó que el porcentaje de aumento de la expresión basal de CD11b por célula fue mayor en los Mo pretratados con IL-10 comparado con los Mo incubados en medio (Figura 22). La máxima respuesta a CX<sub>3</sub>CL1s, se notó en los Mo pretratados con IL10+IFNγ.

Estos datos nos permitieron concluir que la modulación del CX<sub>3</sub>CR1 correlaciona con cambios en su función.



**Figura 22: Porcentaje de aumento de la expresión basal de CD11b por célula**

Se incubaron los monocitos con medio, IL10 (10ng/ml), IFN-γ (250 U/ml) ó ambas citoquinas durante 20hs, luego se incubaron las células con CX<sub>3</sub>CL1 (0,2 y 2 ng/ml) durante 15 minutos a 37°C. Después se

*lavaron los monocitos y marcaron con anticuerpo anti CD11b-PE para analizar por citometría de flujo. Los resultados se muestran como el porcentaje de aumento de la IMF de CD11b en cada tratamiento luego de la estimulación con la quimioquina soluble.*

Considerando que la CX<sub>3</sub>CL1 puede expresarse en forma soluble ó anclada membrana, se realizo el mismo experimento pero esta vez con la CX<sub>3</sub>CL1 acoplada a particulas de latex, para simular condiciones similares a cuando se expresa anclada al endotelio. En este caso los resultados obtenidos fueron similares, sin observarse un incremento mayor de la movilización de CD11b (datos no mostrados)

*Discusión*  
*y*  
*Conclusiones*





Uno de los principales hallazgos de este trabajo fue la significativa disminución de leucocitos CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> circulantes en pacientes con SUH. Esto podría deberse a un mecanismo general que afecte a todas las subpoblaciones de leucocitos ó a distintos mecanismos regulatorios según el tipo celular. Dos procesos generales podrían explicar la reducción de la subpoblación de leucocitos CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup>, 1) disminución de la expresión del receptor a nivel de membrana ó 2) desaparición de la circulación como consecuencia de la interacción específica con su ligando, la fractalquina (CX<sub>3</sub>CL1) sobre endotelio. La modulación del CX<sub>3</sub>CR1 a su vez podría derivar de distintos mecanismos como el clivaje del receptor por enzimas, el bloqueo de la maquinaria biosintética: aumento de la tasa de degradación y/o de internalización. Por otro lado, el reclutamiento específico de células CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> por fractalquina soluble ó anclada a membrana en tejidos, podría explicar la desaparición específica de esta subpoblación de la circulación.

A continuación se demostró que los Mo de los pacientes con SUH presentan un fenotipo alterado con reducción de CX<sub>3</sub>CR1, pérdida de CD62L, junto con un aumento de la expresión de CD16. Además, se observó leucocitosis basada en un aumento del número absoluto de neutrófilos y Mo, notándose incluso que los Mo pertenecientes a la subpoblación CX<sub>3</sub>CR1<sup>-</sup>/CD16<sup>-</sup> y CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> estaban incrementados en número absoluto. Estas alteraciones de las subpoblaciones de Mo, tanto como la pérdida de CD62L, podrían deberse a la diferenciación de los Mo “Clasicos” (CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup>/CD16<sup>-</sup>)<sup>184</sup>, adquiriendo CD16 y perdiendo CD62L y CX<sub>3</sub>CR1. Con respecto a esto, se ha reportado un aumento de la expresión de CD16 en los Mo, cultivados *in vitro* con IL-10<sup>185</sup>, GM-CSF+IL-4<sup>184</sup> ó plasma de pacientes con SUH<sup>106</sup>. La selectina CD62L, encargada de mediar el homing<sup>186</sup> y la adhesión inicial de linfocitos al endotelio<sup>187</sup>, también se expresa en monocitos. Debido a que luego de la activación celular, la CD62L es clivada<sup>188,189</sup>, se ha propuesto que la disminución de este receptor participaría en la aparición de la leucocitosis<sup>187</sup>.

Otro tipo celular del sistema inmune que expresa CX<sub>3</sub>CR1, son las células NK que pueden ser atraídas a las áreas de inflamación<sup>166</sup>. En particular, el la subpoblación de células NK CD56<sup>dim</sup> puede ser reclutado por IL-8 ó CX<sub>3</sub>CL1 soluble, ya que expresan altos niveles de CXCR1 y CX<sub>3</sub>CR1<sup>166</sup>, mientras que las células NK CD56<sup>bright</sup> no muestran respuesta a estas quimioquinas<sup>165</sup>. Las células NKT circulantes, son más heterogéneas ya que sólo el 50 % de ellas expresa CX<sub>3</sub>CR1<sup>166</sup>. En los niños con SUH se observó una disminución tanto en el porcentaje como en el número absoluto de células NK CD56<sup>dim</sup> y células NKT, poblaciones

ambas que expresan el CX<sub>3</sub>CR1, que no parece deberse a un aumento de la apoptosis de estas células.

Es importante destacar que si bien ciertos cambios observados en los monocitos, son semejantes a los presentes en los niños Infectados, algunas características son exclusivas de los SUH, por ejemplo aunque la subpoblación de Mo CD16<sup>+</sup> está aumentado en los niños Infectados, el porcentaje de leucocitos CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> y la expresión de CD62L están conservadas. Más aún, las poblaciones de NK y NKT no muestran alteraciones en los otros grupos clínicos. Teniendo en cuenta que el grupo de Urémicos no presentó las alteraciones mencionadas, se puede descartar que los cambios observados en los SUH se deban a perturbaciones metabólicas asociadas a la falla renal aguda. Aunque el SUH presenta características comunes a otros procesos infecciosos, se caracteriza por el daño endotelial inducido por la Stx, lo cual le confiere un escenario único que conduce a perfiles particulares de activación celular (disminución de células CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup>: Mo, NK y NK-T).

Finalmente, podemos especular que la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 en membrana en Mo y NK, ha sido modulada, de manera semejante a lo que ocurre en células NK activadas con Anticuerpo anti-CD16 ó Linfocitos T estimulados con fitohemaglutinina (PHA)<sup>140,190</sup>. También se ha observado que las células NK, cultivadas en presencia de IL-15, *downmodulan* la expresión de CX<sub>3</sub>CR1, acompañado de pérdida de funcionalidad del receptor, ya que disminuyen la quimiotaxis y la movilización de calcio en respuesta a la CX<sub>3</sub>CL1<sup>145,146,191</sup>.

Por otro lado, la expresión de CX<sub>3</sub>CL1 se incrementa significativamente en respuesta al TNF $\alpha$ , IL-1, IFN- $\gamma$  y Stx<sup>126,127,140,145-147,192</sup>. Varias de estas citoquinas se encuentran elevadas en los niños con SUH<sup>193,194</sup>. De esta manera, estos factores solubles podrían estar induciendo la expresión de CX<sub>3</sub>CL1 en endotelio de estos pacientes. Si bien se ha evaluado además la CX<sub>3</sub>CL1 soluble en suero de (datos no mostrados) en los niños con SUH, las grandes variaciones interindividuales en los controles (rango 0-7,498 pM), hacen difícil obtener una interpretación útil. A pesar de esto, se notó que el 46% de las muestras de orina de los niños con SUH tomadas durante las primeras semanas de la hospitalización, mostraron niveles cercanos al límite superior comparado con los controles, sugiriendo que la CX<sub>3</sub>CL1 pudo ser clivada previamente. En un futuro, realizaremos más estudios sobre la excreción urinaria de CX<sub>3</sub>CL1, la correlación con esta quimioquina soluble en plasma, el requerimiento de diálisis y la severidad de de la enfermedad. Tal vez estos análisis permitirán concluir el significado biológico de esta alteración.

Alternativamente, los Mo CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> podrían haber sido retenidos en tejidos inflamados

que expresan altos niveles de su ligando CX<sub>3</sub>CL1. Nosotros hemos detectado mediante inmunohistoquímica, la presencia de macrófagos CD68<sup>+</sup> y leucocitos CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> en cortes histológicos de riñón de niños con SUH. En línea con estos resultados, *Bazan et al* han reportado que la CX<sub>3</sub>CL1 induce la migración de Mo hacia endotelio inflamado<sup>126</sup>; además *Chapman et al*<sup>190</sup> y *Ancuta et al*<sup>113</sup> reportaron que los Mo CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> pueden migrar a través del endotelio en respuesta a la CX<sub>3</sub>CL1 y adherirse sobre células que expresan esta quimioquina.

Como hemos mencionado anteriormente, en los niños con SUH esta disminuido el porcentaje y número absoluto de células NK CD56<sup>dim</sup> y células NKT, sugiriendo que estas células podrían estar retenidas en el endotelio ó en los tejidos. De ser así, esto podría contribuir al daño endotelial y/o epitelial. Por otro lado se ha observado en pacientes tratados con IL-2, una selectiva desaparición de células NK y NKT, adjudicada a la retención de estas subpoblaciones sobre el endotelio activado<sup>195</sup>. Se ha propuesto que los signos de toxicidad sistémica ante el tratamiento con IL-2, podrían ser consecuencia del daño ejercido por células NK activadas sobre las venulas<sup>196,197</sup>. Más aún, en pacientes con melanoma metastático tratados con IL-2, se han observado síntomas del SUH (adulto)<sup>198</sup>. Aunque el endotelio puede evitar el daño mediado por células NK activadas, mediante la expresión de moléculas MHC clase I; la administración de IL-2 podría activar directa ó indirectamente al endotelio, tornándolo más susceptible a la lisis por células NK<sup>199</sup>. Durante las infecciones por STEC, la acción directa de la Stx y/o mediadores inflamatorios liberados por Mo y células NK, activan al endotelio<sup>92,200</sup>. En este escenario, la expresión de CX<sub>3</sub>CL1 podría colaborar en la adhesión de la subpoblación de células que expresan CX<sub>3</sub>CR1, tales como monocitos y NK, las cuales contribuyen al daño endotelial secretando factores citotóxicos. De manera similar, varios reportes han demostrado que la CX<sub>3</sub>CL1 participa en la patogénesis de los procesos inflamatorios en la pared vascular<sup>193,201</sup>.

Una evidencia indirecta de la participación de las células CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> en la patogénesis del SUH, es la existencia de correlaciones entre menor porcentaje de leucocitos ó monocitos CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> y los días de anurias. Esto nos indica que en nuestra población de pacientes la disminución de células CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> está asociada a una mayor gravedad del paciente, indicando un peor pronóstico. De manera similar, una disminución en la expresión de células NK CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> ha sido asociada a un peor desarrollo de la enfermedad en pacientes de esclerosis múltiple<sup>202</sup>. Pachot *et al* recientemente han reportado un descenso de la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 en Mo circulantes en pacientes con sepsis. Luego del inicio del shock séptico, los Mo

disminuyen su capacidad de producir citoquinas inflamatorias como respuesta a nuevas exposiciones con componentes bacterianos, y también disminuyen su capacidad de presentación antigénica. Más aún, se ha observado que estas alteraciones son más pronunciadas en los pacientes no sobrevivientes, con respecto a los que logran sobreponerse a la enfermedad. Esto ha llevado a sugerir, que la disminución de la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 en monocitos circulantes, podría representar una nueva característica de la inmunodeficiencia inducida por sepsis<sup>183</sup>. En esta patología la pérdida de CX<sub>3</sub>CR1 estaría relacionada con un peor pronóstico.

Las alteraciones celulares observadas en la inmunidad innata al momento del diagnóstico del SUH, nos reafirman el concepto que los mecanismos patogénicos han sido desencadenados con anterioridad a la identificación de la enfermedad en el paciente; y que cualquier terapia específica que intente bloquear estos procesos debería ser instaurada más prematuramente. Esto implica que la implementación de terapias deber ser acompañada de la identificación de factores de riesgo que permitan predecir la evolución hacia el SUH con anticipación.

Otro punto para tener en cuenta al analizar la relevancia de CX<sub>3</sub>CR1 en el SUH, son los reportes sobre la existencia de variantes del receptor y su asociación con distintas enfermedades. Se ha reportado que existe una variante del CX<sub>3</sub>CR1 (CX<sub>3</sub>CR1- I249), donde cambia un aminoácido por otro, que es defectiva para mediar la actividad de adhesión y quimiotaxis. Este polimorfismo del receptor, ha sido asociado con menor riesgo de desarrollar aterosclerosis y disfunción del endotelio en enfermedades coronarias. Considerando estos antecedentes, nos planteamos la posibilidad de que esta variante del CX<sub>3</sub>CR1 participe como factor genético “protector”, en niños infectados con *E.coli* O157:H7, ya que podrían tener menor injuria vascular mediada por las células portadores de CX<sub>3</sub>CR1 (Mo y NK)<sup>127</sup>. Para analizar esta hipótesis, nuestro grupo ha comenzado a analizar los polimorfismos del gen de CX<sub>3</sub>CR1 en pacientes que han sufrido SUH y en niños que han cursado infección por EHEC sin evolucionar al SUH.

A continuación se estudió si los Mo podrían participar en la patogénesis del SUH a través del camino de la CX<sub>3</sub>CL1. Para ello se analizó *in vitro*, si los Mo previamente incubados con Stx1, contribuyen al daño endotelial y epitelial, ya sea por 1) mecanismo que implica el cargado de la Stx y liberación sobre el endotelio/epitelio y/ó 2) mecanismo que implica la adhesión y daño de los Mo activados por Stx.

En este modelo encontramos que los factores inflamatorios, aumentan la sensibilidad

del endotelio a la acción de la Stx, los Mo ó los Mo(Stx1). La mayor sensibilidad a la Stx en el endotelio sensibilizado ha sido previamente reportada y comentada en la introducción. El menor número de células HUVEC viables en presencia de Mo basales, cuando aquéllas han sido sensibilizadas, podría deberse a que el TNF $\alpha$  es un factor inflamatorio que dispara señales sobre el endotelio, induciendo la expresión de moléculas de adhesión y citoquinas; en cuyas condiciones el Mo se activa secretando aun más factores inflamatorios que pueden dañar al endotelio. Por último es interesante destacar que los Mo(Stx1) indujeron mayor daño en el endotelio, analizando tanto los valores de LDH como el número de células viables. Esto nos indicaría que los Mo incubados con Stx1, pueden interactuar con la toxina mediante su receptor específico, activarse y secretar factores que contribuyen al daño endotelial, ó también captar la toxina (vía receptor específico ó inespecífico) y luego liberarla sobre el endotelio sensibilizado. Para aproximarnos a la respuesta, los Mo(Stx1) se incubaron junto con anticuerpos anti-Stx neutralizantes, observando una reversión del daño endotelial, lo cual sugiere que al menos uno de los mecanismos implicados en el daño está mediado por acción directa de la Stx1 sobre el endotelio. Esto se observó tanto con los Mo(Stx1) incubados a 37°C ó a 4°C donde se frena el metabolismo celular previo a la incubación; permitiéndonos suponer que en ambos casos el Mo puede “captar toxina” y liberarla sobre el endotelio.

Como se ha mencionado en la introducción de la tesis, varios grupos han reportado que los Mo tienen un receptor para la Stx. Esto les permite interactuar con la Stx, internalizarla y seguir el camino hasta los lisosomas donde sería degradada. Durante este transporte, los Mo se activan provocando el aumento de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B, que inducen finalmente la síntesis de factores inflamatorios como TNF $\alpha$ , IL6, IL8, IL1 $\beta$ . Recientemente, *Geelen et al* han estudiado la hipótesis de que los Mo podrían actuar como “carrier” de la toxina hasta el endotelio renal <sup>1</sup>. Ellos han demostrado que si preincubaban los Mo con Stx2 durante 3hs a 4°C, para evitar la internalización de la toxina, y luego los cultivan sobre células Vero (expresan Gb3) ó HUVEC a 37°C, se observa una inhibición de la síntesis proteica sobre ambas líneas celulares, reversible parcialmente en presencia de Ac anti-Stx. Esto indica que parte del daño, se debe al efecto directo de la Stx2. Sin embargo si el mismo ensayo se repite a 4°C, no se observa presencia de la toxina sobre las células Vero, sugiriendo que el Mo en esas condiciones no libera la toxina. Estos resultados los llevó a concluir que aunque el Mo participaría en la patogénesis del SUH, no actuaría como transportador de Stx. En nuestro modelo, si bien se observó daño endotelial mediado por los Mo(Stx1) que fue parcialmente bloqueado por anticuerpos anti-Stx, lo cual sugiere que el Mo debió captar la Stx1 y liberarla

sobre el endotelio, se necesitarían más ensayos para analizar el mecanismo mediante el cual ocurre esto.

En segundo lugar, sabiendo que la estimulación del endotelio con TNF $\alpha$  también induce la expresión de CX<sub>3</sub>CL1 anclada a membrana <sup>126</sup>, utilizamos esta quimioquina soluble para bloquear al CX<sub>3</sub>CR1 en los Mo y evitar así la interacción con la CX<sub>3</sub>CL1 expresada en membrana endotelial. Se observó que el daño endotelial por los Mo(Stx1), disminuye significativamente en estas condiciones. Esto sugiere que dicha quimioquina participa en el daño endotelial posiblemente favoreciendo la interacción entre ambos tipos celulares.

En paralelo, se observaron resultados similares en células epiteliales de túbulo proximal de riñón, lo cual es interesante ya que si bien las células HUVEC han sido ampliamente utilizadas para el estudio de efectos citotóxicos de la Stx, las células epiteliales HRTEC representan un modelo de otro tejido blanco de la toxina. En bibliografía se ha demostrado que la estimulación de células HRTEC con TNF $\alpha$ , induce tanto el mRNA de CX<sub>3</sub>CL1 como la expresión de la proteína <sup>152</sup>. La adhesión de células THP1 cuando se incuban con CX<sub>3</sub>CL1 soluble, disminuye significativamente, indicando que posiblemente la interacción de esta quimioquina-molécula de adhesión con su receptor específico sobre los leucocitos, mediaría el reclutamiento y adhesión de los mismos a sitios tubulares <sup>152</sup>. En este contexto, *Zanchi et al*, han descrito recientemente que la Stx2 induce en células HUVEC la expresión de CX<sub>3</sub>CL1 anclada a membrana ó soluble, promoviendo la captura de leucocitos a través de CX<sub>3</sub>CR1 <sup>127</sup>. También observaron la expresión de CX<sub>3</sub>CL1 en endotelio glomerular de ratones tratados con Stx2, demostrando así que *in vivo* la toxina induce la expresión de esta quimioquinas, la cual promueve la interacción entre leucocitos CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> y el endotelio, contribuyendo a la disfunción de la microvasculatura observada en el SUH. Este dato, provee una conexión entre la disminución de los leucocitos CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> circulantes y la presencia de ese subset de células en tejido renal observados en los pacientes con SUH. Es interesante destacar que la CX<sub>3</sub>CL1 se expresa en riñón y cerebro, donde además está presente el receptor específico de la Stx, Gb3. Paralelamente, en esos órganos, es donde predominan las lesiones microangiopáticas en los casos fatales de SUH. Se ha demostrado mediante el uso de Anticuerpos neutralizantes anti-CX<sub>3</sub>CL1 y anti-CX<sub>3</sub>CR1 que la adhesión de leucocitos inducida por Stx2 es dependiente de la interacción fractalquina-receptor <sup>127</sup>. En este contexto, la adhesión de leucocitos a la CX<sub>3</sub>CL1 anclada a membrana, puede ser facilitada por el reclutamiento de leucocitos a través de la secreción de MCP-1 e IL8 secretada por el endotelio en presencia de Stx2 <sup>203</sup>. En conjunto, estos reportes sumados a nuestra observación de que la CX<sub>3</sub>CL1 participa en el daño mediado

por el Mo(Stx1), nos provee de un fundamento más para sugerir que esta quimioquina estaría involucrada en la patogénesis del SUH.

Como hemos mencionado anteriormente, los Mo son un componente central de la respuesta inmune, con capacidad de migrar según el patrón de moléculas de adhesión y quimioquinas expresadas en el tejido. Por otro lado, durante la activación o desactivación, maduración o diferenciación de estas células, es posible la modulación de la expresión de los receptores para quimioquinas. En este caso, nosotros reportamos la regulación de CX<sub>3</sub>CR1 en monocitos durante la maduración y la influencia de distintos agentes inflamatorios ó antiinflamatorios durante este proceso. Se observó una disminución de la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 en los Mo durante el cultivo de 20 hs, no asociada a apoptosis ó señales de muerte, siendo un proceso activo dependiente de la síntesis proteica. Por otro lado, células THP-1 maduras con PMA, disminuyen la expresión de CX<sub>3</sub>CR1, mimificando la pérdida observada en el Mo durante el cultivo. De manera semejante, ha sido reportado que la expresión del receptor para quimioquinas CCR2, pero no el CCR1, es *down*modulado durante la diferenciación con PMA<sup>204-206</sup>. Estos resultados indican que la maduración *per se*, es responsable de la pérdida selectiva de CCR2<sup>206</sup> y CX<sub>3</sub>CR1.

Además demostramos la pérdida de CX<sub>3</sub>CR1 en presencia de TNF $\alpha$ , Stx1 y LPS en los Mo. Coincidentemente, *Pachot et al*<sup>183</sup>, observaron también la disminución de CX<sub>3</sub>CR1 en Mo en condiciones *in vitro*, luego de la incubación con LPS ó con bacterias inactivadas con calor, debido a una disminución en la tasa de transcripción del gen. Por otro lado, estudios en células mononucleares muestran que la exposición a agentes microbianos ó agentes inflamatorios (ej. LPS, IL-1, y TNF- $\alpha$ ) inducen una disminución de ciertos receptores CC para quimioquinas, (CCR1, CCR2, CCR5), posiblemente para evitar la emigración de células que llegaron al sitio inflamatorio<sup>204,207,208</sup>.

En nuestro modelo, mientras estímulos pro-inflamatorios aceleran la pérdida de CX<sub>3</sub>CR1 durante el cultivo en Mo, la IL10 previene esta pérdida y aumenta la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 en células THP1 diferenciadas. El efecto de la IL-10 es dosis y tiempo dependiente, sugiriendo un mecanismo activo de regulación, y específico ya que otros factores deactivadores de Mo, como IL-4 y TGF- $\beta$  no afectaron la expresión del CX<sub>3</sub>CR1. En línea con estos resultados se ha reportado que la IL-10 puede upregular selectivamente la expresión de CCR1, 2 y 5 en Mo<sup>209</sup>.

Paralelamente el IFN- $\gamma$  que suele inducir la maduración de Mo<sup>206,210</sup> también evitó la pérdida de CX<sub>3</sub>CR1 en Mo e indujo la up-regulación en THP-1. Más aún, cuando se incubaron

los Mo con IFN- $\gamma$  e IL-10, se observó un efecto sinérgico alcanzando máxima expresión de CX<sub>3</sub>CR1. Estos resultados sugieren que ambas citoquinas podrían compartir señales intracelulares y además tener vías de señalización adicionales ó alternativas.

Cuando se incubaron los Mo simultáneamente con IL-10 ó IFN- $\gamma$  junto con la CHX, no se observaron efectos aditivos, por lo cual sugerimos que este inhibidor de la síntesis proteica podría estar evitando la *síntesis de novo*, necesaria para la modulación de CX<sub>3</sub>CR1 ejercida por IL-10 e IFN- $\gamma$ ; e incluso evitando la síntesis de algún factor involucrado en la pérdida de CX<sub>3</sub>CR1. Otra posibilidad sería que las citoquinas, estén involucradas en la estabilización del mRNA del receptor, de esta manera en presencia de ellas, podría disminuir la tasa de degradación del mensajero ó aumentar la vida media del mismo.

Se han descrito dos mecanismos importantes de regulación de receptores para quimioquinas. Uno de ellos involucra la presencia de un depósito intracelular y su rápida movilización ó internalización desde la superficie celular, luego de interactuar con su ligando específico<sup>211</sup>. Aunque no hay información disponible sobre la regulación de CX<sub>3</sub>CR1 en Mo, se ha demostrado recientemente que la quimioquina MCP-1, luego de 15 minutos, induce un aumento transiente de CX<sub>3</sub>CR1 en la superficie celular.<sup>172</sup> En nuestras condiciones experimentales, no hemos observado resultados semejantes (de “up”-regulación/sobreexpresión por movilización del depósito) incubando con IL-10 ó IFN- $\gamma$  durante tiempos cortos (15 ó 20 minutos)(datos no mostrados). Sin embargo, luego de evaluar la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 en superficie e intracelular, podemos concluir que, durante el cultivo la tasa de aparición de CX<sub>3</sub>CR1 en la membrana de los Mo es menor a la tasa de degradación ó pérdida. Cuando los Mo son incubados con IL-10, poseen una tasa de formación del receptor mayor a la de degradación, cualquiera sea el mecanismo involucrado. Esto nos permite especular que el CX<sub>3</sub>CR1 puede ser acumulado en compartimentos intracelulares. El segundo mecanismo propuesto implica variaciones a nivel de mRNA, tanto en la inducción de la transcripción como en la estabilidad del mRNA<sup>212</sup>. En particular, se ha reportado que el mRNA de CX<sub>3</sub>CR1 puede ser regulado en diferentes células bajo distintas condiciones. Por ejemplo, Kaziolec *et al*, han demostrado que en fibroblastos humanos se induce este mRNA en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mediador de stress oxidativo<sup>213</sup>; además resultados semejantes se observaron en microglia luego de la isquemia<sup>214</sup>. También se ha demostrado que la IL10 induce el aumento del mRNA en Mo<sup>215,216</sup>, mientras que el LPS lo reduce<sup>183,215</sup>. Sin embargo hasta el momento nosotros no hemos observado diferencias a nivel de mRNA, mediante la técnica de RT-PCR (datos no mostrados).



La IL-10, secretada por ciertas células, tiene un rol esencial en la inhibición de las funciones de Mo/macrófagos suprimiendo el fenotipo Th1<sup>217</sup>. En contraste, el IFN- $\gamma$  es una citoquina producida por células NK y linfocitos T, con efecto pleiotrópico y con la función de orientar la respuesta hacia un patrón Th1, mediante el cual los LT activan a los macrófagos<sup>218,219</sup>. En general, la IL-10 y el IFN- $\gamma$  tienen efectos divergentes en las funciones de los monocitos y se antagonizan cuando son incubadas simultáneamente. Por ejemplo la IL-10 en presencia de IFN- $\gamma$ , reprime menos la producción de citoquinas y quimioquina, y la disminución de la expresión de MHC clase II<sup>176</sup>. El efecto reciproco es igual y ha sido reportado que la IL-10 inhibe la fosforilación de STAT1 mediada por el IFN- $\gamma$  y la subsecuente inducción de genes de respuesta temprana<sup>177</sup>. En nuestro modelo, encontramos que si bien la IL-10 y el IFN- $\gamma$  modulan de manera antagónica la expresión de CD14, inducen el mismo efecto sobre CX<sub>3</sub>CR1 evitando su pérdida. Sin embargo, también existen reportes mostrando ambas citoquinas pueden tener efectos similares en Mo, como el aumento del receptor para el Fc de IgG y la actividad ADCC dependiente de Fc<sup>220-222</sup>. El IFN- $\gamma$  y la IL-10 se unen a sus receptores específicos e inducen señales a través de la activación de las proteínas Janus kinase (Jak) y los factores de transducción (STAT), causando la transcripción de genes de respuesta temprana<sup>180-182</sup>. Mientras que la IL-10 activa al STAT1, y STAT3, el IFN- $\gamma$  activa solo al STAT1<sup>180-182</sup>. Existen evidencias acerca del efecto de la IL10 sobre la funcionalidad en los monocitos, a través de la fosforilación del factor STAT3, mientras que los efectos inmunomoduladores de IFN- $\gamma$  están mediados por la activación del STAT1<sup>223,224</sup>. Los efectos opuestos de ambas citoquinas, han sido atribuidos a las señales antagónicas inducidas por STAT1 y STAT3<sup>176,177</sup>. Sin embargo, algunos efectos moduladores de la IL-10 sobre los Mo, se le han adjudicado a efectos mediados por STAT1<sup>170</sup>, en especial el aumento de expresión de CD14, tal como nosotros también lo observamos. En base a estos datos y a que en nuestro modelo ambas citoquinas provocaron el mismo efecto, nuestra hipótesis fue que el efecto estaba mediado por el factor STAT1. En este sentido, el gen humano que codifica para CX<sub>3</sub>CR1 ha sido clonado, y posee posibles sitios de binding para los STATs en su promotor<sup>225</sup>, sugiriendo que estos factores de transcripción podrían ser importantes en la regulación del CX<sub>3</sub>CR1. Además ha sido reportado que las proteínas Jak, pueden activar otras moléculas implicadas en la señalización, en particular de la familia de la PI3K<sup>174,226</sup>. Con respecto a este, hemos demostrado la activación de la enzima Akt, sustrato río abajo de PI3K, tanto con IL-10 como con IFN- $\gamma$ . Más aun, la inhibición de la PI3K evito la upregulación de CX<sub>3</sub>CR1 mediada por IL10 e IFN, en Mo y células THP-1 maduras con PMA; demostrando así que Akt esta

implicado en el efecto de IL10 e IFN- $\gamma$  sobre la modulación de la expresión de CX<sub>3</sub>CR1. Existen descriptos actualmente muchos sustratos posibles de ser fosforilados por Akt <sup>226</sup>, otorgando posibles rutas alternativas mediante la cual IL-10 e IFN- $\gamma$ , pueden ejercer sus efectos. Esto incluye, la activación de NF $\kappa$ B <sup>227</sup> y la capacidad de Akt de translocar al núcleo donde puede, influenciar la transcripción de proteínas y ciclo celular <sup>228</sup>. Aunque recientemente, se ha reportado que el LY294002 inhibe la fosforilación de STAT1 inducida por IL-10 en células monocíticas <sup>170</sup>, nosotros no encontramos que inhiba la fosforilación en tirosina del STAT1, sin embargo no podemos descartar que bloquee la activación en el residuo serina. Se necesitan más estudios para elucidar completamente las moléculas y las señales implicadas en la upregulación de CX<sub>3</sub>CR1 en presencia de ambas citoquinas.

Se observó que la modulación del CX<sub>3</sub>CR1, lleva asociado cambios en su funcionalidad evaluados mediante la movilización de la molécula CD11b luego de la incubación con CX<sub>3</sub>CL1 soluble. Si bien en presencia de IL10, la funcionalidad se incrementó con respecto al basal, se observó un efecto mucho mayor en presencia de IL10 con IFN $\gamma$ . En línea con estos resultados, otros autores han reportado que los Mo tratados con MCP-1 incrementan la expresión de CX<sub>3</sub>CR1, correlacionando con un incremento en su funcionalidad medida como mayor adhesión ó quimiotaxis a la CX<sub>3</sub>CL1 <sup>172</sup>.

En conjunto, los resultados destacan el concepto de que las citoquinas producidas localmente ó los productos bacterianos pueden regular la cinética, composición y función de los infiltrados de leucocitos, afectando tanto la producción de quimioquinas como la expresión de receptores.

Finalmente, es importante mencionar que a pesar que existen muchos reportes, demostrando que el bloqueo de la interacción de CX<sub>3</sub>CR1 con su ligando, puede atenuar el daño renal en modelos experimentales de glomerulonefritis, rechazo de trasplantes, etc...también se debe tener presente que la fractalquina no sólo participa de la adhesión y quimiotaxis de leucocitos, sino que también tiene funciones homeostáticas. En particular, se ha demostrado que en la microglia, considerada como los macrófagos del Sistema Nervioso Central, la neurotoxicidad inflamatoria se suprime en presencia de CX<sub>3</sub>CL1 <sup>229</sup>. Por otro lado, recientemente se ha descrito que la fractalquina puede ser liberada por linfocitos apoptóticos mediante un mecanismo que implica caspasas, para atraer macrófagos CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> que podrán eliminarlos y colaborar en el mantenimiento de la homeostasis evitando una inflamación aun mayor. <sup>230</sup>.

Podemos concluir que la CX<sub>3</sub>CL1 está involucrada en el daño que ejercen los Mo(Stx1) sobre el endotelio y epitelio. Junto con la observación de la presencia de células CX<sub>3</sub>CR1 en cortes histológicos renales de pacientes con SUH, y la correlación negativa entre la disminución de los leucocitos CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> circulantes y el daño renal en los pacientes, sugerimos que es una vía importante a través de la cual los Mo interactúan con el endotelio y contribuyen a la patogénesis del SUH. Por otro lado, se logró modular la expresión de CX<sub>3</sub>CR1 en Mo purificados, encontrando que dos citoquinas, IL10 e IFN $\gamma$  generalmente encuadradas en funciones antagónicas, asociadas a deactivación y activación respectivamente del monocito, modulan su expresión en el mismo sentido. Es importante, acompañar estos datos con el análisis de la funcionalidad del receptor, ya que nos indica cual es la relevancia fisiológica de estos cambios. Nosotros concluimos que la función sólo se ve significativamente incrementada con el tratamiento simultáneo de ambas citoquinas. Así mismo, el IFN $\gamma$  induce la expresión de CX<sub>3</sub>CL1 sobre endotelio, mientras que la IL10 no lo hace. Por lo tanto es importante tener en cuenta el contexto fisiopatológico, en cuanto a la cinética de inducción y secreción de citoquinas, los distintos microambientes en donde se producen y las alteraciones específicas durante los procesos patológicos, antes de extrapolar en forma directa a lo que pasa *in vivo*.

# *Bibliografía*



1. Geelen JM, van der Velden TJ, van den Heuvel LP, Monnens LA. Interactions of Shiga-like toxin with human peripheral blood monocytes. *Pediatr Nephrol.* 2007;22:1181-1187.
2. Combadiere C, Potteaux S, Rodero M, et al. Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytosis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation.* 2008;117:1649-1657.
3. Feng L, Chen S, Garcia GE, et al. Prevention of crescentic glomerulonephritis by immunoneutralization of the fractalkine receptor CX3CR1 rapid communication. *Kidney Int.* 1999;56:612-620.
4. Segerer S, Hughes E, Hudkins KL, Mack M, Goodpaster T, Alpers CE. Expression of the fractalkine receptor (CX3CR1) in human kidney diseases. *Kidney Int.* 2002;62:488-495.
5. Cockwell P, Chakravorty SJ, Girdlestone J, Savage CO. Fractalkine expression in human renal inflammation. *J Pathol.* 2002;196:85-90.
6. Gianantonio CA, Vitacco M, Mendilaharsu F, Gallo GE, Sojo ET. The hemolytic-uremic syndrome. *Nephron.* 1973;11:174-192.
7. Remuzzi G, Ruggenti P. The hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int.* 1995;48:2-19.
8. Siegler RL, Pavia AT, Christofferson RD, Milligan MK. A 20-year population-based study of postdiarrheal hemolytic uremic syndrome in Utah. *Pediatrics.* 1994;94:35-40.
9. Spizzirri FD, Rahman RC, Bibiloni N, Ruscasso JD, Amoreo OR. Childhood hemolytic uremic syndrome in Argentina: long-term follow-up and prognostic features. *Pediatr Nephrol.* 1997;11:156-160.
10. Tufro A, Arrizurieta EE, Repetto H. Renal functional reserve in children with a previous episode of haemolytic-uraemic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 1991;5:184-188.
11. Repetto HA. Epidemic hemolytic-uremic syndrome in children. *Kidney Int.* 1997;52:1708-1719.
12. Karmali MA, Steele BT, Petric M, Lim C. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet.* 1983;1:619-620.
13. Karmali MA, Petric M, Lim C, Fleming PC, Arbus GS, Lior H. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis.* 1985;151:775-782.
14. Lopez EL, Contrini MM, Devoto S, et al. Incomplete hemolytic-uremic syndrome in Argentinean children with bloody diarrhea. *J Pediatr.* 1995;127:364-367.
15. Kelly J, Oryshak A, Wenetsek M, Grabiec J, Handy S. The colonic pathology of *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Am J Surg Pathol.* 1990;14:87-92.
16. Murray KF, Patterson K. *Escherichia coli* O157:H7-induced hemolytic-uremic syndrome: histopathologic changes in the colon over time. *Pediatr Dev Pathol.* 2000;3:232-239.
17. Jarvis KG, Giron JA, Jerse AE, McDaniel TK, Donnenberg MS, Kaper JB. Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:7996-8000.

18. Paton AW, Paton JC. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfbO111, and rfbO157. *J Clin Microbiol.* 1998;36:598-602.
19. Acheson DW, Moore R, De Breucker S, et al. Translocation of Shiga toxin across polarized intestinal cells in tissue culture. *Infect Immun.* 1996;64:3294-3300.
20. van Setten PA, Monnens LA, Verstraten RG, van den Heuvel LP, van Hinsbergh VW. Effects of verocytotoxin-1 on nonadherent human monocytes: binding characteristics, protein synthesis, and induction of cytokine release. *Blood.* 1996;88:174-183.
21. Cooling LL, Walker KE, Gille T, Koerner TA. Shiga toxin binds human platelets via globotriaosylceramide (Pk antigen) and a novel platelet glycosphingolipid. *Infect Immun.* 1998;66:4355-4366.
22. Karpman D, Papadopoulou D, Nilsson K, Sjogren AC, Mikaelsson C, Lethagen S. Platelet activation by Shiga toxin and circulatory factors as a pathogenetic mechanism in the hemolytic uremic syndrome. *Blood.* 2001;97:3100-3108.
23. te Loo DM, Monnens LA, van Der Velden TJ, et al. Binding and transfer of verocytotoxin by polymorphonuclear leukocytes in hemolytic uremic syndrome. *Blood.* 2000;95:3396-3402.
24. Tazzari PL, Ricci F, Carnicelli D, et al. Flow cytometry detection of Shiga toxins in the blood from children with hemolytic uremic syndrome. *Cytometry B Clin Cytom.* 2004;61:40-44.
25. Te Loo DM, van Hinsbergh VW, van den Heuvel LP, Monnens LA. Detection of verocytotoxin bound to circulating polymorphonuclear leukocytes of patients with hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12:800-806.
26. Ashida A, Matsui K, Chizaki T, et al. Erythrocyte P1 group antigen expression in VTEC-associated hemolytic uremic syndrome. *Clin Nephrol.* 1999;51:73-76.
27. Falguieres T, Mallard F, Baron C, et al. Targeting of Shiga toxin B-subunit to retrograde transport route in association with detergent-resistant membranes. *Mol Biol Cell.* 2001;12:2453-2468.
28. Flagler MJ, Strasser JE, Chalk CL, Weiss AA. Comparative analysis of the abilities of Shiga toxins 1 and 2 to bind to and influence neutrophil apoptosis. *Infect Immun.* 2007;75:760-765.
29. Geelen JM, van der Velden TJ, Te Loo DM, Boerman OC, van den Heuvel LP, Monnens LA. Lack of specific binding of Shiga-like toxin (verocytotoxin) and non-specific interaction of Shiga-like toxin 2 antibody with human polymorphonuclear leukocytes. *Nephrol Dial Transplant.* 2007;22:749-755.
30. Kaneko K, Kiyokawa N, Ohtomo Y, et al. Apoptosis of renal tubular cells in Shiga-toxin-mediated hemolytic uremic syndrome. *Nephron.* 2001;87:182-185.
31. Exeni RA. [Hemolytic uremic syndrome]. *Medicina (B Aires).* 1996;56:197-198.
32. . I Jornada Nacional de Actualización sobre Síndrome Urémico Hemolítico. *Revista medicina.* 2006;66
33. Exeni. Síndrome Urémico Hemolítico. *Archivos Latinoamericanos de Nefrología Pediátrica* 2001;(Exeni R, Síndrome Urémico Hemolítico, *Archivos Latinoamericanos de Nefrología Pediátrica* 2001, 1: 35-36). :35-36.
34. Werber D, Fruth A, Buchholz U, et al. Strong association between shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 and virulence genes stx2 and eae as possible explanation for predominance of serogroup O157 in patients with haemolytic uraemic syndrome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2003;22:726-730.
35. Karch H, Friedrich AW, Gerber A, Zimmerhackl LB, Schmidt MA, Bielaszewska M. New aspects in the pathogenesis of enteropathic hemolytic uremic syndrome. *Semin Thromb Hemost.* 2006;32:105-112.

36. Bentancor A. [Epidemiological role of pets in urban transmission cycle of STEC]. *Medicina (B Aires)*. 2006;66 Suppl 3:37-41.
37. Beutin L, Geier D, Steinruck H, Zimmermann S, Scheutz F. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J Clin Microbiol*. 1993;31:2483-2488.
38. Paton JC, Paton AW. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11:450-479.
39. Crump JA, Sulka AC, Langer AJ, et al. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections among visitors to a dairy farm. *N Engl J Med*. 2002;347:555-560.
40. Ruggerenti P, Remuzzi G. Pathophysiology and management of thrombotic microangiopathies. *J Nephrol*. 1998;11:300-310.
41. Finazzi G, Bellavita P, Falanga A, Viero P, Barbui T. Inefficacy of intravenous immunoglobulin in patients with low-risk thrombotic thrombocytopenic purpura/hemolytic-uremic syndrome. *Am J Hematol*. 1992;41:165-169.
42. Perez N, Spizzirri F, Rahman R, Suarez A, Larrubia C, Lasarte P. Steroids in the hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 1998;12:101-104.
43. Walterspiel JN, Ashkenazi S, Morrow AL, Cleary TG. Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on extracellular Shiga-like toxin I. *Infection*. 1992;20:25-29.
44. Trachtman H, Cnaan A, Christen E, et al. Effect of an oral Shiga toxin-binding agent on diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome in children: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2003;290:1337-1344.
45. Kitov PI, Sadowska JM, Mulvey G, et al. Shiga-like toxins are neutralized by tailored multivalent carbohydrate ligands. *Nature*. 2000;403:669-672.
46. Paton JC, Rogers TJ, Morona R, Paton AW. Oral administration of formaldehyde-killed recombinant bacteria expressing a mimic of the Shiga toxin receptor protects mice from fatal challenge with Shiga-toxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 2001;69:1389-1393.
47. Donohue-Rolfe A, Kondova I, Mukherjee J, Chios K, Hutto D, Tzipori S. Antibody-based protection of gnotobiotic piglets infected with *Escherichia coli* O157:H7 against systemic complications associated with Shiga toxin 2. *Infect Immun*. 1999;67:3645-3648.
48. Matise I, Cornick NA, Booher SL, Samuel JE, Bosworth BT, Moon HW. Intervention with Shiga toxin (Stx) antibody after infection by Stx-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis*. 2001;183:347-350.
49. Boyd B, Richardson S, Garipey J. Serological responses to the B subunit of Shiga-like toxin 1 and its peptide fragments indicate that the B subunit is a vaccine candidate to counter action of the toxin. *Infect Immun*. 1991;59:750-757.
50. Bielaszewska M, Clarke I, Karmali MA, Petric M. Localization of intravenously administered verocytotoxins (Shiga-like toxins) 1 and 2 in rabbits immunized with homologous and heterologous toxoids and toxin subunits. *Infect Immun*. 1997;65:2509-2516.
51. Yamagami S, Motoki M, Kimura T, et al. Efficacy of postinfection treatment with anti-Shiga toxin (Stx) 2 humanized monoclonal antibody TMA-15 in mice lethally challenged with Stx-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis*. 2001;184:738-742.
52. Agin TS, Zhu C, Johnson LA, Thate TE, Yang Z, Boedeker EC. Protection against hemorrhagic colitis in an animal model by oral immunization with isogenic rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* attenuated by truncating intimin. *Infect Immun*. 2005;73:6608-6619.

53. Silberstein CCCW, Repetto H and, C I. A Glucosylceramide Synthase Inhibitor Prevents the Cytotoxic Effects of Shiga Toxin-2 on Human Renal Tubular Epithelial Cells. *Journal of Epithelial Biology and Pharmacology*. 2008;1875-0443/08 2008 71-75.
54. Endo Y, Tsurugi K, Yutsudo T, Takeda Y, Ogasawara T, Igarashi K. 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;171:45-50.
55. Serna At, Boedeker EC. Pathogenesis and treatment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Curr Opin Gastroenterol*. 2008;24:38-47.
56. Kaplan BS, Cleary TG, Obrig TG. Recent advances in understanding the pathogenesis of the hemolytic uremic syndromes. *Pediatr Nephrol*. 1990;4:276-283.
57. Tesh VL, Burris JA, Owens JW, et al. Comparison of the relative toxicities of Shiga-like toxins type I and type II for mice. *Infect Immun*. 1993;61:3392-3402.
58. Sandvig K, Ryd M, Garred O, Schweda E, Holm PK, van Deurs B. Retrograde transport from the Golgi complex to the ER of both Shiga toxin and the nontoxic Shiga B-fragment is regulated by butyric acid and cAMP. *J Cell Biol*. 1994;126:53-64.
59. Sandvig K, Garred O, Prydz K, Kozlov JV, Hansen SH, van Deurs B. Retrograde transport of endocytosed Shiga toxin to the endoplasmic reticulum. *Nature*. 1992;358:510-512.
60. Lord JM, Roberts LM. Toxin entry: retrograde transport through the secretory pathway. *J Cell Biol*. 1998;140:733-736.
61. Sandvig K, van Deurs B. Entry of ricin and Shiga toxin into cells: molecular mechanisms and medical perspectives. *EMBO J*. 2000;19:5943-5950.
62. Cohen A, Hannigan GE, Williams BR, Lingwood CA. Roles of globotriosyl- and galabiosylceramide in verotoxin binding and high affinity interferon receptor. *J Biol Chem*. 1987;262:17088-17091.
63. Lingwood CA. Verotoxins and their glycolipid receptors. *Adv Lipid Res*. 1993;25:189-211.
64. Oosterwijk E, Kalisiak A, Wakka JC, Scheinberg DA, Old LJ. Monoclonal antibodies against Gal alpha 1-4Gal beta 1-4Glc (Pk, CD77) produced with a synthetic glycoconjugate as immunogen: reactivity with carbohydrates, with fresh frozen human tissues and hematopoietic tumors. *Int J Cancer*. 1991;48:848-854.
65. Bitzan M, Richardson S, Huang C, Boyd B, Petric M, Karmali MA. Evidence that verotoxins (Shiga-like toxins) from *Escherichia coli* bind to P blood group antigens of human erythrocytes in vitro. *Infect Immun*. 1994;62:3337-3347.
66. Louise CB, Obrig TG. Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: combined cytotoxic effects of shiga toxin and lipopolysaccharide (endotoxin) on human vascular endothelial cells in vitro. *Infect Immun*. 1992;60:1536-1543.
67. van de Kar NC, Monnens LA, Karmali MA, van Hinsbergh VW. Tumor necrosis factor and interleukin-1 induce expression of the verocytotoxin receptor globotriaosylceramide on human endothelial cells: implications for the pathogenesis of the hemolytic uremic syndrome. *Blood*. 1992;80:2755-2764.
68. Keusch GT, Acheson DW, Aaldering L, Erban J, Jacewicz MS. Comparison of the effects of Shiga-like toxin 1 on cytokine- and butyrate-treated human umbilical and saphenous vein endothelial cells. *J Infect Dis*. 1996;173:1164-1170.
69. Ohmi K, Kiyokawa N, Takeda T, Fujimoto J. Human microvascular endothelial cells are strongly sensitive to Shiga toxins. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;251:137-141.
70. van Setten PA, van Hinsbergh VW, van der Velden TJ, et al. Effects of TNF alpha on verocytotoxin cytotoxicity in purified human glomerular microvascular endothelial cells. *Kidney Int*. 1997;51:1245-1256.



71. Louise CB, Kaye SA, Boyd B, Lingwood CA, Obrig TG. Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: effect of sodium butyrate on sensitivity of human umbilical vein endothelial cells to Shiga toxin. *Infect Immun.* 1995;63:2766-2769.
72. Hughes AK, Stricklett PK, Schmid D, Kohan DE. Cytotoxic effect of Shiga toxin-1 on human glomerular epithelial cells. *Kidney Int.* 2000;57:2350-2359.
73. Hughes AK, Stricklett PK, Schmid D, Kohan DE. Cytotoxic effect of Shiga toxin-1 on human glomerular epithelial cells. *Kidney Int.* 2000;57:2350-2359.
74. Hughes AK, Stricklett PK, Kohan DE. Shiga toxin-1 regulation of cytokine production by human glomerular epithelial cells. *Nephron.* 2001;88:14-23.
75. Inward CD, Varaganam M, Adu D, Milford DV, Taylor CM. Cytokines in haemolytic uraemic syndrome associated with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infection. *Arch Dis Child.* 1997;77:145-147.
76. Karpman D, Hakansson A, Perez MT, et al. Apoptosis of renal cortical cells in the hemolytic-uremic syndrome: in vivo and in vitro studies. *Infect Immun.* 1998;66:636-644.
77. Lingwood CA. Verotoxin-binding in human renal sections. *Nephron.* 1994;66:21-28.
78. Kaneko K, Kiyokawa N, Ohtomo Y, et al. Apoptosis of renal tubular cells in Shiga-toxin-mediated hemolytic uremic syndrome. *Nephron.* 2001;87:182-185.
79. Hughes AK, Stricklett PK, Kohan DE. Cytotoxic effect of Shiga toxin-1 on human proximal tubule cells. *Kidney Int.* 1998;54:426-437.
80. Silberstein C, Pistone Creydt V, Gerhardt E, Nunez P, Ibarra C. Inhibition of water absorption in human proximal tubular epithelial cells in response to Shiga toxin-2. *Pediatr Nephrol.* 2008;23:1981-1990.
81. Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal.* 2001;13:85-94.
82. Wilson ME. Effects of bacterial endotoxins on neutrophil function. *Rev Infect Dis.* 1985;7:404-418.
83. Palermo MS, Alves Rosa MF, Van Rooijen N, Isturiz MA. Depletion of liver and splenic macrophages reduces the lethality of Shiga toxin-2 in a mouse model. *Clin Exp Immunol.* 1999;116:462-467.
84. Louise CB, Obrig TG. Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: combined cytotoxic effects of shiga toxin and lipopolysaccharide (endotoxin) on human vascular endothelial cells in vitro. *Infect Immun.* 1992;60:1536-1543.
85. van de Kar NC, Monnens LA, Karmali MA, van Hinsbergh VW. Tumor necrosis factor and interleukin-1 induce expression of the verocytotoxin receptor globotriaosylceramide on human endothelial cells: implications for the pathogenesis of the hemolytic uremic syndrome. *Blood.* 1992;80:2755-2764.
86. van Setten PA, van Hinsbergh VW, van der Velden TJ, et al. Effects of TNF alpha on verocytotoxin cytotoxicity in purified human glomerular microvascular endothelial cells. *Kidney Int.* 1997;51:1245-1256.
87. Van Setten PA, van Hinsbergh VW, Van den Heuvel LP, et al. Verocytotoxin inhibits mitogenesis and protein synthesis in purified human glomerular mesangial cells without affecting cell viability: evidence for two distinct mechanisms. *J Am Soc Nephrol.* 1997;8:1877-1888.
88. Palermo M, Alves-Rosa F, Rubel C, 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;119:77-83.
89. Karpman D, Andreasson A, Thysell H, Kaplan BS, Svanborg C. Cytokines in childhood hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Pediatr Nephrol.* 1995;9:694-699.

90. Lopez EL, Contrini MM, Devoto S, et al. Tumor necrosis factor concentrations in hemolytic uremic syndrome patients and children with bloody diarrhea in Argentina. *Pediatr Infect Dis J*. 1995;14:594-598.
91. Ray PE, Liu XH, Xu L, Rakusan T. Basic fibroblast growth factor in HIV-associated hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 1999;13:586-593.
92. Chandler WL, Jelacic S, Boster DR, et al. Prothrombotic coagulation abnormalities preceding the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med*. 2002;346:23-32.
93. Milford DV, Staten J, MacGreggor I, Dawes J, Taylor CM, Hill FG. Prognostic markers in diarrhoea-associated haemolytic-uraemic syndrome: initial neutrophil count, human neutrophil elastase and von Willebrand factor antigen. *Nephrol Dial Transplant*. 1991;6:232-237.
94. van Setten PA, van Hinsbergh VW, van den Heuvel LP, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 levels in urine and serum of patents with hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Res*. 1998;43:759-767.
95. Fitzpatrick MM, Shah V, Trompeter RS, Dillon MJ, Barratt TM. Interleukin-8 and polymorphonuclear leukocyte activation in hemolytic uremic syndrome of childhood. *Kidney Int*. 1992;42:951-956.
96. Fernandez GC, Rubel C, Dran G, Gomez S, Isturiz MA, Palermo MS. Shiga toxin-2 induces neutrophilia and neutrophil activation in a murine model of hemolytic uremic syndrome. *Clin Immunol*. 2000;95:227-234.
97. Fernandez GC, Rubel C, Barrionuevo P, et al. Phenotype markers and function of neutrophils in children with hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2002;17:337-344.
98. Fernandez GC, Gomez SA, Rubel CJ, et al. Impaired neutrophils in children with the typical form of hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2005;20:1306-1314.
99. Pareti FI, Capitano A, Mannucci L, Ponticelli C, Mannucci PM. Acquired dysfunction due to the circulation of "exhausted" platelets. *Am J Med*. 1980;69:235-240.
100. Viisoreanu D, Polanowska-Grabowska R, Suttitanamongkol S, Obrig TG, Gear AR. Human platelet aggregation is not altered by Shiga toxins 1 or 2. *Thromb Res*. 2000;98:403-410.
101. Fong JS, Kaplan BS. Impairment of platelet aggregation in hemolytic uremic syndrome: evidence for platelet "exhaustion". *Blood*. 1982;60:564-570.
102. Provost P, Merhi Y. Endothelium-derived nitric oxide decreases polymorphonuclear leukocyte interaction with the deeply injured arterial wall under intermediate and high shear conditions. *Thromb Haemost*. 1997;78:939-946.
103. Provost P, Merhi Y. Endogenous nitric oxide release modulates mural platelet thrombosis and neutrophil-endothelium interactions under low and high shear conditions. *Thromb Res*. 1997;85:315-326.
104. Herlitz H, Petersson A, Sigstrom L, Wennmalm A, Westberg G. The arginine-nitric oxide pathway in thrombotic microangiopathy. *Scand J Urol Nephrol*. 1997;31:477-479.
105. Dran GI, Fernandez GC, Rubel CJ, et al. Protective role of nitric oxide in mice with Shiga toxin-induced hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int*. 2002;62:1338-1348.
106. Fernandez GC, Ramos MV, Gomez SA, et al. Differential expression of function-related antigens on blood monocytes in children with hemolytic uremic syndrome. *J Leukoc Biol*. 2005;78:853-861.
107. Proulx F, Toledano B, Phan V, Clermont MJ, Mariscalco MM, Seidman EG. 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;52:928-934.

108. Mizuno K, Toma T, Tsukiji H, et al. Selective expansion of CD16<sup>high</sup>CCR2-subpopulation of circulating monocytes with preferential production of haem oxygenase (HO)-1 in response to acute inflammation. *Clin Exp Immunol*. 2005;142:461-470.
109. Belge KU, Dayyani F, Horelt A, et al. The proinflammatory CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>DR<sup>++</sup> monocytes are a major source of TNF. *J Immunol*. 2002;168:3536-3542.
110. Randolph GJ, Sanchez-Schmitz G, Liebman RM, Schakel K. The CD16(+) (Fcγ<sub>3</sub>RIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. *J Exp Med*. 2002;196:517-527.
111. Weber C, Belge KU, von Hundelshausen P, et al. Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *J Leukoc Biol*. 2000;67:699-704.
112. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 2003;19:71-82.
113. Ancuta P, Rao R, Moses A, et al. Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16<sup>+</sup> monocytes. *J Exp Med*. 2003;197:1701-1707.
114. Faure S, Meyer L, Costagliola D, et al. Rapid progression to AIDS in HIV<sup>+</sup> individuals with a structural variant of the chemokine receptor CX3CR1. *Science*. 2000;287:2274-2277.
115. Strauss-Ayali D, Conrad SM, Mosser DM. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *J Leukoc Biol*. 2007;82:244-252.
116. Borrego F, Robertson MJ, Ritz J, Pena J, Solana R. CD69 is a stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effect is blocked by CD94 inhibitory receptor. *Immunology*. 1999;97:159-165.
117. Carson WE, Ross ME, Baiocchi RA, et al. Endogenous production of interleukin 15 by activated human monocytes is critical for optimal production of interferon-gamma by natural killer cells in vitro. *J Clin Invest*. 1995;96:2578-2582.
118. Carson WE, Lindemann MJ, Baiocchi R, et al. The functional characterization of interleukin-10 receptor expression on human natural killer cells. *Blood*. 1995;85:3577-3585.
119. Lanier LL, Le AM, Cwirla S, Federspiel N, Phillips JH. Antigenic, functional, and molecular genetic studies of human natural killer cells and cytotoxic T lymphocytes not restricted by the major histocompatibility complex. *Fed Proc*. 1986;45:2823-2828.
120. Moser B, Loetscher P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol*. 2001;2:123-128.
121. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*. 1998;91:3527-3561.
122. Middleton J, Patterson AM, Gardner L, Schmutz C, Ashton BA. Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood*. 2002;100:3853-3860.
123. Worthylake RA, Burridge K. Leukocyte transendothelial migration: orchestrating the underlying molecular machinery. *Curr Opin Cell Biol*. 2001;13:569-577.
124. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*. 2000;12:121-127.
125. Umehara H, Bloom ET, Okazaki T, Nagano Y, Yoshie O, Imai T. Fractalkine in vascular biology: from basic research to clinical disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:34-40.
126. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature*. 1997;385:640-644.
127. Zanchi C, Zoja C, Morigi M, et al. Fractalkine and CX3CR1 mediate leukocyte capture by endothelium in response to Shiga toxin. *J Immunol*. 2008;181:1460-1469.

128. Garton KJ, Gough PJ, Blobel CP, et al. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *J Biol Chem.* 2001;276:37993-38001.
129. Tsou CL, Haskell CA, Charo IF. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme mediates the inducible cleavage of fractalkine. *J Biol Chem.* 2001;276:44622-44626.
130. Umehara H, Bloom E, Okazaki T, Domae N, Imai T. Fractalkine and vascular injury. *Trends Immunol.* 2001;22:602-607.
131. Umehara H, Imai T. Role of fractalkine in leukocyte adhesion and migration and in vascular injury. *Drug News Perspect.* 2001;14:460-464.
132. Tanaka Y, Adams DH, Hubscher S, Hirano H, Siebenlist U, Shaw S. T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta. *Nature.* 1993;361:79-82.
133. Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nat Immunol.* 2001;2:108-115.
134. Panzer U, Steinmetz OM, Stahl RA, Wolf G. Kidney diseases and chemokines. *Curr Drug Targets.* 2006;7:65-80.
135. Goda S, Imai T, Yoshie O, et al. CX3C-chemokine, fractalkine-enhanced adhesion of THP-1 cells to endothelial cells through integrin-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol.* 2000;164:4313-4320.
136. Umehara H, Goda S, Imai T, et al. Fractalkine, a CX3C-chemokine, functions predominantly as an adhesion molecule in monocytic cell line THP-1. *Immunol Cell Biol.* 2001;79:298-302.
137. Kerfoot SM, Lord SE, Bell RB, Gill V, Robbins SM, Kubes P. Human fractalkine mediates leukocyte adhesion but not capture under physiological shear conditions; a mechanism for selective monocyte recruitment. *Eur J Immunol.* 2003;33:729-739.
138. Murphy PM. Chemokine receptors: structure, function and role in microbial pathogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1996;7:47-64.
139. Lu B, Rutledge BJ, Gu L, et al. Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J Exp Med.* 1998;187:601-608.
140. Imai T, Hieshima K, Haskell C, et al. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell.* 1997;91:521-530.
141. Auffray C, Fogg D, Garfa M, et al. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science.* 2007;317:666-670.
142. Combadiere C, Salzwedel K, Smith ED, Tiffany HL, Berger EA, Murphy PM. Identification of CX3CR1. A chemotactic receptor for the human CX3C chemokine fractalkine and a fusion coreceptor for HIV-1. *J Biol Chem.* 1998;273:23799-23804.
143. Cybulsky MI, Hegele RA. The fractalkine receptor CX3CR1 is a key mediator of atherogenesis. *J Clin Invest.* 2003;111:1118-1120.
144. Moretta L, Ciccone E, Mingari MC, Biassoni R, Moretta A. Human natural killer cells: origin, clonality, specificity, and receptors. *Adv Immunol.* 1994;55:341-380.
145. Sechler JM, Barlic J, Grivel JC, Murphy PM. IL-15 alters expression and function of the chemokine receptor CX3CR1 in human NK cells. *Cell Immunol.* 2004;230:99-108.
146. Barlic J, Sechler JM, Murphy PM. IL-15 and IL-2 oppositely regulate expression of the chemokine receptor CX3CR1. *Blood.* 2003;102:3494-3503.
147. Fraticelli P, Sironi M, Bianchi G, et al. Fractalkine (CX3CL1) as an amplification circuit of polarized Th1 responses. *J Clin Invest.* 2001;107:1173-1181.
148. Schafer A, Schulz C, Eigenthaler M, et al. Novel role of the membrane-bound chemokine fractalkine in platelet activation and adhesion. *Blood.* 2004;103:407-412.

149. Chen S, Bacon KB, Li L, et al. In vivo inhibition of CC and CX3C chemokine-induced leukocyte infiltration and attenuation of glomerulonephritis in Wistar-Kyoto (WKY) rats by vMIP-II. *J Exp Med.* 1998;188:193-198.
150. Furuichi K, Wada T, Iwata Y, et al. Upregulation of fractalkine in human crescentic glomerulonephritis. *Nephron.* 2001;87:314-320.
151. Ito Y, Kawachi H, Morioka Y, et al. Fractalkine expression and the recruitment of CX3CR1+ cells in the prolonged mesangial proliferative glomerulonephritis. *Kidney Int.* 2002;61:2044-2057.
152. Chakravorty SJ, Cockwell P, Girdlestone J, Brooks CJ, Savage CO. Fractalkine expression on human renal tubular epithelial cells: potential role in mononuclear cell adhesion. *Clin Exp Immunol.* 2002;129:150-159.
153. Nelson PJ, Krensky AM. Chemokines, chemokine receptors, and allograft rejection. *Immunity.* 2001;14:377-386.
154. Robinson LA, Nataraj C, Thomas DW, et al. A role for fractalkine and its receptor (CX3CR1) in cardiac allograft rejection. *J Immunol.* 2000;165:6067-6072.
155. Moatti D, Faure S, Fumeron F, et al. Polymorphism in the fractalkine receptor CX3CR1 as a genetic risk factor for coronary artery disease. *Blood.* 2001;97:1925-1928.
156. McDermott DH, Halcox JP, Schenke WH, et al. Association between polymorphism in the chemokine receptor CX3CR1 and coronary vascular endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Circ Res.* 2001;89:401-407.
157. Tong N, Perry SW, Zhang Q, et al. Neuronal fractalkine expression in HIV-1 encephalitis: roles for macrophage recruitment and neuroprotection in the central nervous system. *J Immunol.* 2000;164:1333-1339.
158. Balabanian K, Foussat A, Dorfmueller P, et al. CX(3)C chemokine fractalkine in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165:1419-1425.
159. Fujimoto K, Imaizumi T, Yoshida H, Takanashi S, Okumura K, Satoh K. Interferon-gamma stimulates fractalkine expression in human bronchial epithelial cells and regulates mononuclear cell adherence. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001;25:233-238.
160. Efsen E, Grappone C, DeFranco RM, et al. Up-regulated expression of fractalkine and its receptor CX3CR1 during liver injury in humans. *J Hepatol.* 2002;37:39-47.
161. Cardozo AK, Proost P, Gysemans C, Chen MC, Mathieu C, Eizirik DL. IL-1beta and IFN-gamma induce the expression of diverse chemokines and IL-15 in human and rat pancreatic islet cells, and in islets from pre-diabetic NOD mice. *Diabetologia.* 2003;46:255-266.
162. Duner KI. A new kinetic single-stage Limulus amoebocyte lysate method for the detection of endotoxin in water and plasma. *J Biochem Biophys Methods.* 1993;26:131-142.
163. Uchida H, Kiyokawa N, Horie H, Fujimoto J, Takeda T. The detection of Shiga toxins in the kidney of a patient with hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Res.* 1999;45:133-137.
164. Ziegler-Heitbrock HW. Definition of human blood monocytes. *J Leukoc Biol.* 2000;67:603-606.
165. Frey M, Packianathan NB, Fehniger TA, et al. Differential expression and function of L-selectin on CD56bright and CD56dim natural killer cell subsets. *J Immunol.* 1998;161:400-408.
166. Campbell JJ, Qin S, Unutmaz D, et al. Unique subpopulations of CD56+ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor repertoire. *J Immunol.* 2001;166:6477-6482.

167. Schierloh P, Aleman M, Yokobori N, et al. NK cell activity in tuberculosis is associated with impaired CD11a and ICAM-1 expression: a regulatory role of monocytes in NK activation. *Immunology*. 2005;116:541-552.
168. Ramegowda B, Tesh VL. Differentiation-associated toxin receptor modulation, cytokine production, and sensitivity to Shiga-like toxins in human monocytes and monocytic cell lines. *Infect Immun*. 1996;64:1173-1180.
169. Prodjosudjadi W, Gerritsma JS, Klar-Mohamad N, et al. Production and cytokine-mediated regulation of monocyte chemoattractant protein-1 by human proximal tubular epithelial cells. *Kidney Int*. 1995;48:1477-1486.
170. Rahimi AA, Gee K, Mishra S, Lim W, Kumar A. STAT-1 mediates the stimulatory effect of IL-10 on CD14 expression in human monocytic cells. *J Immunol*. 2005;174:7823-7832.
171. Lingnau M, Hoflich C, Volk HD, Sabat R, Docke WD. Interleukin-10 enhances the CD14-dependent phagocytosis of bacteria and apoptotic cells by human monocytes. *Hum Immunol*. 2007;68:730-738.
172. Green SR, Han KH, Chen Y, et al. The CC chemokine MCP-1 stimulates surface expression of CX3CR1 and enhances the adhesion of monocytes to fractalkine/CX3CL1 via p38 MAPK. *J Immunol*. 2006;176:7412-7420.
173. Dong C, Davis RJ, Flavell RA. MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:55-72.
174. Zhou JH, Broussard SR, Strle K, et al. IL-10 inhibits apoptosis of promyeloid cells by activating insulin receptor substrate-2 and phosphatidylinositol 3'-kinase. *J Immunol*. 2001;167:4436-4442.
175. Crawley JB, Williams LM, Mander T, Brennan FM, Foxwell BM. Interleukin-10 stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase and p70 S6 kinase is required for the proliferative but not the antiinflammatory effects of the cytokine. *J Biol Chem*. 1996;271:16357-16362.
176. Herrero C, Hu X, Li WP, et al. Reprogramming of IL-10 activity and signaling by IFN-gamma. *J Immunol*. 2003;171:5034-5041.
177. Ito S, Ansari P, Sakatsume M, et al. Interleukin-10 inhibits expression of both interferon alpha- and interferon gamma- induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1. *Blood*. 1999;93:1456-1463.
178. Rovera G, Santoli D, Damsky C. Human promyelocytic leukemia cells in culture differentiate into macrophage-like cells when treated with a phorbol diester. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76:2779-2783.
179. Nguyen H, Ramana CV, Bayes J, Stark GR. Roles of phosphatidylinositol 3-kinase in interferon-gamma-dependent phosphorylation of STAT1 on serine 727 and activation of gene expression. *J Biol Chem*. 2001;276:33361-33368.
180. Finbloom DS, Winestock KD. IL-10 induces the tyrosine phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the differential assembly of STAT1 alpha and STAT3 complexes in human T cells and monocytes. *J Immunol*. 1995;155:1079-1090.
181. Riley JK, Takeda K, Akira S, Schreiber RD. Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action. *J Biol Chem*. 1999;274:16513-16521.
182. Ramana CV, Gil MP, Schreiber RD, Stark GR. Stat1-dependent and -independent pathways in IFN-gamma-dependent signaling. *Trends Immunol*. 2002;23:96-101.
183. Pachot A, Cazalis MA, Venet F, et al. Decreased expression of the fractalkine receptor CX3CR1 on circulating monocytes as new feature of sepsis-induced immunosuppression. *J Immunol*. 2008;180:6421-6429.

184. Ancuta P, Weiss L, Haeffner-Cavaillon N. CD14+CD16++ cells derived in vitro from peripheral blood monocytes exhibit phenotypic and functional dendritic cell-like characteristics. *Eur J Immunol.* 2000;30:1872-1883.
185. Olikowsky T, Wang ZQ, Dudhane A, Horowitz H, Conti B, Hoffmann MK. Two distinct pathways of human macrophage differentiation are mediated by interferon-gamma and interleukin-10. *Immunology.* 1997;91:104-108.
186. Kishimoto TK, Jutila MA, Butcher EC. Identification of a human peripheral lymph node homing receptor: a rapidly down-regulated adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:2244-2248.
187. Tedder TF, Steeber DA, Pizcueta P. L-selectin-deficient mice have impaired leukocyte recruitment into inflammatory sites. *J Exp Med.* 1995;181:2259-2264.
188. Chen A, Engel P, Tedder TF. Structural requirements regulate endoproteolytic release of the L-selectin (CD62L) adhesion receptor from the cell surface of leukocytes. *J Exp Med.* 1995;182:519-530.
189. Dadfar E, Lundahl J, Jacobson SH. Monocyte adhesion molecule expression in interstitial inflammation in patients with renal failure. *Nephrol Dial Transplant.* 2004;19:614-622.
190. Chapman GA, Moores KE, Gohil J, et al. The role of fractalkine in the recruitment of monocytes to the endothelium. *Eur J Pharmacol.* 2000;392:189-195.
191. Barlic J, McDermott DH, Merrell MN, Gonzales J, Via LE, Murphy PM. Interleukin (IL)-15 and IL-2 reciprocally regulate expression of the chemokine receptor CX3CR1 through selective NFAT1- and NFAT2-dependent mechanisms. *J Biol Chem.* 2004;279:48520-48534.
192. Fong AM, Robinson LA, Steeber DA, et al. Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow. *J Exp Med.* 1998;188:1413-1419.
193. Litalien C, Proulx F, Mariscalco MM, et al. Circulating inflammatory cytokine levels in hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 1999;13:840-845.
194. Westerholt S, Pieper AK, Griebel M, Volk HD, Hartung T, Oberhoffer R. Characterization of the cytokine immune response in children who have experienced an episode of typical hemolytic-uremic syndrome. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003;10:1090-1095.
195. Aronson FR, Libby P, Brandon EP, Janicka MW, Mier JW. IL-2 rapidly induces natural killer cell adhesion to human endothelial cells. A potential mechanism for endothelial injury. *J Immunol.* 1988;141:158-163.
196. Lentsch AB, Miller FN, Edwards MJ. Mechanisms of leukocyte-mediated tissue injury induced by interleukin-2. *Cancer Immunol Immunother.* 1999;47:243-248.
197. Alexandrescu DT, Maddukuri P, Wiernik PH, Dutcher JP. Thrombotic thrombocytopenic purpura/hemolytic uremic syndrome associated with high-dose interleukin-2 for the treatment of metastatic melanoma. *J Immunother.* 2005;28:144-147.
198. Lanier LL. Face off--the interplay between activating and inhibitory immune receptors. *Curr Opin Immunol.* 2001;13:326-331.
199. Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet.* 2005;365:1073-1086.
200. Harrison JK, Jiang Y, Wees EA, et al. Inflammatory agents regulate in vivo expression of fractalkine in endothelial cells of the rat heart. *J Leukoc Biol.* 1999;66:937-944.
201. Imaizumi T, Yoshida H, Satoh K. Regulation of CX3CL1/fractalkine expression in endothelial cells. *J Atheroscler Thromb.* 2004;11:15-21.

202. Infante-Duarte C, Weber A, Kratzschmar J, et al. Frequency of blood CX3CR1-positive natural killer cells correlates with disease activity in multiple sclerosis patients. *FASEB J.* 2005;19:1902-1904.
203. Zoja C, Angioletti S, Donadelli R, et al. Shiga toxin-2 triggers endothelial leukocyte adhesion and transmigration via NF-kappaB dependent up-regulation of IL-8 and MCP-1. *Kidney Int.* 2002;62:846-856.
204. Tangirala RK, Murao K, Quehenberger O. Regulation of expression of the human monocyte chemotactic protein-1 receptor (hCCR2) by cytokines. *J Biol Chem.* 1997;272:8050-8056.
205. Fantuzzi L, Borghi P, Ciolli V, Pavlakis G, Belardelli F, Gessani S. Loss of CCR2 expression and functional response to monocyte chemotactic protein (MCP-1) during the differentiation of human monocytes: role of secreted MCP-1 in the regulation of the chemotactic response. *Blood.* 1999;94:875-883.
206. Phillips RJ, Lutz M, Premack B. Differential signaling mechanisms regulate expression of CC chemokine receptor-2 during monocyte maturation. *J Inflamm (Lond).* 2005;2:14.
207. Sica A, Sacconi A, Borsatti A, et al. Bacterial lipopolysaccharide rapidly inhibits expression of C-C chemokine receptors in human monocytes. *J Exp Med.* 1997;185:969-974.
208. Juffermans NP, Weijer S, Verbon A, Speelman P, van der Poll T. Expression of human immunodeficiency virus coreceptors CXC chemokine receptor 4 and CC chemokine receptor 5 on monocytes is down-regulated during human endotoxemia. *J Infect Dis.* 2002;185:986-989.
209. Sozzani S, Ghezzi S, Iannolo G, et al. Interleukin 10 increases CCR5 expression and HIV infection in human monocytes. *J Exp Med.* 1998;187:439-444.
210. Scheibenbogen C, Andreesen R. Developmental regulation of the cytokine repertoire in human macrophages: IL-1, IL-6, TNF-alpha, and M-CSF. *J Leukoc Biol.* 1991;50:35-42.
211. Le Y, Oppenheim JJ, Wang JM. Pleiotropic roles of formyl peptide receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001;12:91-105.
212. Xu L, Rahimpour R, Ran L, et al. Regulation of CCR2 chemokine receptor mRNA stability. *J Leukoc Biol.* 1997;62:653-660.
213. Koziolok MJ, Schmid H, Cohen CD, et al. Potential role of fractalkine receptor expression in human renal fibrogenesis. *Kidney Int.* 2007;72:599-607.
214. Echigo T, Hasegawa M, Shimada Y, Takehara K, Sato S. Expression of fractalkine and its receptor, CX3CR1, in atopic dermatitis: possible contribution to skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;113:940-948.
215. Yano R, Yamamura M, Sunahori K, et al. Recruitment of CD16+ monocytes into synovial tissues is mediated by fractalkine and CX3CR1 in rheumatoid arthritis patients. *Acta Med Okayama.* 2007;61:89-98.
216. Jung M, Sabat R, Kratzschmar J, et al. Expression profiling of IL-10-regulated genes in human monocytes and peripheral blood mononuclear cells from psoriatic patients during IL-10 therapy. *Eur J Immunol.* 2004;34:481-493.
217. Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C. Macrophage deactivation by interleukin 10. *J Exp Med.* 1991;174:1549-1555.
218. Young HA, Hardy KJ. Role of interferon-gamma in immune cell regulation. *J Leukoc Biol.* 1995;58:373-381.
219. Penton-Rol G, Polentarutti N, Luini W, et al. Selective inhibition of expression of the chemokine receptor CCR2 in human monocytes by IFN-gamma. *J Immunol.* 1998;160:3869-3873.



220. Liu Y, Masuda E, Blank MC, et al. Cytokine-mediated regulation of activating and inhibitory Fc gamma receptors in human monocytes. *J Leukoc Biol.* 2005;77:767-776.
221. Comber PG, Lentz V, Schreiber AD. Modulation of the transcriptional rate of Fc gamma receptor mRNA in human mononuclear phagocytes. *Cell Immunol.* 1992;145:324-338.
222. te Velde AA, de Waal Malefijt R, Huijbens RJ, de Vries JE, Figdor CG. IL-10 stimulates monocyte Fc gamma R surface expression and cytotoxic activity. Distinct regulation of antibody-dependent cellular cytotoxicity by IFN-gamma, IL-4, and IL-10. *J Immunol.* 1992;149:4048-4052.
223. O'Farrell AM, Parry DA, Zindy F, et al. Stat3-dependent induction of p19INK4D by IL-10 contributes to inhibition of macrophage proliferation. *J Immunol.* 2000;164:4607-4615.
224. Lerner AC, Finbloom DS. Protein tyrosine phosphorylation as a mechanism which regulates cytokine activation of early response genes. *Biochim Biophys Acta.* 1995;1266:278-287.
225. Garin A, Pellet P, Deterre P, Debre P, Combadiere C. Cloning and functional characterization of the human fractalkine receptor promoter regions. *Biochem J.* 2002;368:753-760.
226. Curnock AP, Logan MK, Ward SG. Chemokine signalling: pivoting around multiple phosphoinositide 3-kinases. *Immunology.* 2002;105:125-136.
227. Kane LP, Shapiro VS, Stokoe D, Weiss A. Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. *Curr Biol.* 1999;9:601-604.
228. Klippel A, Escobedo MA, Wachowicz MS, et al. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient for cell cycle entry and promotes cellular changes characteristic of oncogenic transformation. *Mol Cell Biol.* 1998;18:5699-5711.
229. Denes A, Ferenczi S, Halasz J, Kornyei Z, Kovacs KJ. Role of CX3CR1 (fractalkine receptor) in brain damage and inflammation induced by focal cerebral ischemia in mouse. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008;28:1707-1721.
230. Truman LA, Ford CA, Pasikowska M, et al. CX3CL1/fractalkine is released from apoptotic lymphocytes to stimulate macrophage chemotaxis. *Blood.* 2008;112:5026-5036.