

Tesis Doctoral

Relevancia de mecanismos inflamatorios en el daño celular inducido por toxina Shiga, agente causal del síndrome urémico hemolítico (SUH)

Landoni, Verónica Inés

2010

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

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

Cita tipo APA:

Landoni, Verónica Inés. (2010). Relevancia de mecanismos inflamatorios en el daño celular inducido por toxina Shiga, agente causal del síndrome urémico hemolítico (SUH). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Landoni, Verónica Inés. "Relevancia de mecanismos inflamatorios en el daño celular inducido por toxina Shiga, agente causal del síndrome urémico hemolítico (SUH)". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**“Relevancia de mecanismos inflamatorios
en el daño celular inducido por toxina
Shiga, agente causal 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. Verónica Inés Landoni

Director de tesis: Dr. Martín Isturiz

Consejero de Estudios: Lidia Szczupak

Lugar de trabajo: Academia Nacional de Medicina

Instituto de Leucemia Experimental, División Inmunología

Buenos Aires, 2010

*Le dedico esta tesis a mamá y papá.
Quienes despertaron en mí la inquietud
intelectual y el amor por el conocimiento.
Porque por ellos amo lo que hago*

Relevancia de mecanismos inflamatorios en el daño celular inducido por toxina Shiga, agente causal del síndrome urémico hemolítico (SUH)

RESUMEN

El síndrome urémico hemolítico (SUH) se caracteriza por anemia hemolítica, trombocitopenia y disfunción renal. La forma típica de SUH se asocia a infecciones por bacterias Gram negativas enterohemorrágicas del género *Shigella* y *Escherichia* productoras de toxina shiga (Stx). La disfunción endotelial inducida por la Stx es central, pero lipopolisacáridos bacterianos (LPS) y neutrófilos (PMN) contribuyen con la patofisiología. La falla renal es característica del SUH, aunque en casos severos, ocurren complicaciones neurológicas usualmente asociadas a casos fatales. Es clara la alteración de la barrera hemato-encefálica (BHE) asociado al daño de las células endoteliales (CEs) que la componen. Los astrocitos (ASTs) son células inflamatorias del cerebro y determinan el funcionamiento de la BHE. Los ASTs están en contacto con CEs, por lo que el estudio de los efectos de Stx y LPS sobre los ASTs, así como la influencia de esta respuesta sobre las ECs es fundamental. Stx1 y LPS indujeron la activación de ASTs y la liberación de TNF- α , óxido nítrico y quimioquinas atrayentes de PMN. Factores liberados por ASTs estimulados con LPS y Stx1 disminuyeron la permeabilidad endotelial e indujeron la activación de CEs favoreciendo la adhesión de plaquetas y PMN. Los efectos evaluados fueron dependientes del TNF- α astrocitario. La respuesta de ASTs frente a Stx1 y LPS podría contribuir con la disfunción de la BHE y el desarrollo de la neuropatología observada en SUH.

Palabras claves: Astrocitos, toxina Shiga, lipopolisacáridos, neutrófilos, daño al endotelio cerebral

Relevance of inflammatory mechanisms in the cellular damage induced by Shiga toxin, the causative agent of hemolytic uremic syndrome (HUS).

SUMMARY

The hemolytic uremic syndrome (HUS) is characterized by hemolytic anemia, thrombocytopenia and renal dysfunction. The typical form of HUS is generally associated with infections by Gram-negative Shiga toxin (Stx)-producing *Escherichia coli* organisms. Endothelial dysfunction induced by Stx is central, but bacterial lipopolysaccharide (LPS) and neutrophils (PMN) contribute to the pathophysiology. The renal failure is characteristic, although in severe cases, neurological complications occur and is usually associated with death. Impaired blood-brain barrier (BBB) is associated with damage to cerebral endothelial cells (ECs) that comprise the BBB. Astrocytes (ASTs) are inflammatory cells in the brain and determine BBB function. ASTs are in contact with ECs, hence the study of the effects of Stx1 and LPS on ASTs, and the influence of this response on ECs is essential. Stx1 and LPS induced activation of ASTs and the release of TNF- α , nitric oxide and PMN attractant chemokines. Factors released by Stx1 and LPS stimulated-ASTs decreased endothelial permeability. Furthermore, these factors induced ECs activation promoting platelet and PMN adhesion. Evaluated effects were dependent on ASTs secreted-TNF- α . Stx1 and LPS induced ASTs response could contribute to BBB dysfunction and to the development of the neuropathology observed in HUS.

Key words: Astrocytes, Shiga toxin-1, lipopolysaccharide, neutrophils, brain endothelial damage.

Agradecimientos

Quiero agradecer a toda la gente que hizo posible el haber terminado esta etapa, familia y amigos que me acompañaron y apoyaron a lo largo de esta carrera.

Quiero decirle gracias a mi familia. A mi mamá, porque me “apuntaló” y acompañó durante toda la carrera y me enseñó los momentos difíciles son sólo escalones. Por inculcarme su pasión y su optimismo. Por llenar mi vida de sueños y chocolates.

Gracias a mi papá, por hacerme sentir importante. Por darme todo. Por las tardes de Borges y las noches del gato rojo que me enseñaron a soñar.

A Ciu, mi hermana, por estar siempre, porque somos dos desde el inicio de la vida. Porque puedo contarle todo. Por las tardes de mate y los días de Shopping. Porque sin ella no hubiera superado mi trauma por las matemáticas.

A mi hermano Pancho, la persona mas buena que conozco Por hacerme reír todo el tiempo. Por los momentos de libros y películas que siempre compartimos.

A mi hermano Ernesto por hacerme más fuerte. Por ponerle música a los años de estudio.

A mi Tía del alma Susana, mi mamá de otra vida. Por sus consejos, su amor y generosidad.

A Marce, por buscarme y encontrarme. Por estar... siempre. Porque su pasión por la ciencia me contagia. Por alentarme, ayudarme y por no dejarme bajar los brazos. Y gracias, especialmente, por quererme con perros y gatos incluídos

A Martín por infundir en mí las ansias por aprender, conocer y dar respuestas. Gracias!!!! Por inspirarme y alentarme, por la libertad que me da para elegir el rumbo de mi trabajo. Por su confianza, apoyo y paciencia. Por su sentido del humor, incluso el de los lunes.

A Pau, una grande, siempre dispuesta a correr conmigo en mis delirios experimentales, mi mano derecha en el labo. Porque siempre esta cuando la necesito.

A Evi, por las charlas hermosas y su compañía en las trasnochadas en el labo. Por el apoyo mientras escribía la tesis y por los horrendos tramites que me ahorra.

A Gabita, por darme siempre más de lo que le pido. Por enseñarme a no desalentarme con los “no significativo”, por recordarme que las hipótesis son infinitas y desafiantes. Por confiar en mí, y hacerme parte de su grupo de trabajo. Gracias!!!!!!.

A Pablito mi amigo, “editor y analizador”, gracias! Mil gracias! Por su ayuda inmensa y su paciencia infinita. Por apoyo y sus consejos. Por ser mí aliado en el humor, (reconozco que “mis” chistes le salen mejor a él).

A Juancito, Merceditas, Lu. Gracias amigos! Por hacer más divertido el trabajo. Por los ratos de mate y cigarrillo. Gracias por que nunca falta el ficoll y el

paraformaldehído. A Connie, por hacerme reír, y por llenar de anécdotas los silencios. Gracias por las impresiones a color!. A Juancito Bruzzo por la ayuda y las ideas que me hacen crecer. A Bar, Mer, Kao, Carmen y Laura, gracias por su diaria compañía.

A Maricarmen o “Mamicarmen” y a Silvia. Por el apoyo, la contención y los consejos. Por las largas horas de charla, chismes y café, por ofrecerme siempre un lugar para estar.

A Raúl, por su bondad y apoyo. Porque siempre está dispuesto a ayudar y por el placer de escuchar sus historias.

A Martita y Susana por su apoyo incondicional y por hacerme sentir integrada desde el primer día.

A los chicos de Mirta; Gracias por “adoptarme”: Por todo lo que me enseñaron. A Mir y Robert siempre dispuestos a ayudarme y brindarme todo lo que necesito. A Pao, Sole, Eli, Majo, Albert y Juli. Gracias por correr conmigo para terminar los últimos experimentos para la tesis. Por la inmensa ayuda. Por todos los “after-lab” y por los “recreos” mas divertidos. Por las arepas y las horas de psicología. Genias totales!!!

A los demás compañeros de la Academia, por ayudarnos y hacernos más fácil las cosas: Martita, Nora y Norma por su ayuda y compañía en las horas de citómetro; Rita, Evelia y Mabel por hacer que el labo funcione; Marcela de citogenética por su enorme generosidad y por las charlas “para descargar”; Pablo por bancarme en el confocal ; las chicas de Viro Patri, Maru, Beatriz, Lili y Ceci, siempre dispuestas a ayudarme

A Marina y sus chicas: Vicky, Leti, Romi, Anita y Pili. Por las cosas que me enseñan. Por la ayuda, el apoyo. y sobretodo por hacerme sentir una más del grupo.

A Ceci Calatayud, por ayudarme a llevar adelante este proyecto, Por su generosidad y buena voluntad.

A mis amigos de la vida, los chicos de la Facu. Por hacer de esos años los mejores. Gracias a todos por estar!!!. Porque cada uno me enseñó a ser mejor persona. A la Mary, por su pasión por las cosas y por enseñarme que hay que jugarse. A la Julidecarre que nos cuidó siempre, por “ordenar” nuestras vidas y organizar las reuniones para que no pasara mucho tiempo sin vernos. A Gero mi amigo para filosofar. A la Pipi por enseñarme el compromiso por las cosas. A Carito por su sensibilidad. A maru por enseñarme a ser fuerte. A Jimenita, por ser especial y única.. A Fernandita por sus consejos. A Juancito por su alegría.

INDICE

- I. RESUMEN
- II. SUMMARY
- III. AGRADECIMIENTOS
- IV. INDICE

| | |
|--|-----------|
| 1 BREVE INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS | 1 |
| 2 INTRODUCCIÓN | 6 |
| 2.1 GENERALIDADES | 6 |
| 2.2 ASPECTOS CLÍNICOS DEL D+SUH | 9 |
| 2.3 PRESENCIA DE CITOQUINAS EN LOS PACIENTES CON D+SUH | 10 |
| 2.3.1 FACTORES PRONÓSTICO DEL D+SUH | 10 |
| 2.4 PATOFISIOLOGÍA DEL SUH | 11 |
| 2.4.1 TRATAMIENTO | 11 |
| 2.4.2 EPIDEMIOLOGÍA | 13 |
| 2.5 INTERACCIÓN DE STX CON DISTINTOS TIPOS CELULARES | 14 |
| 2.5.1 POLIMORFONUCLEARES NEUTRÓFILOS (PMN) | 14 |
| 2.5.2 PLAQUETAS | 15 |
| 2.5.3 CÉLULAS ENDOTELIALES | 16 |
| 2.6 RELACIÓN CON OTROS COMPONENTES BACTERIANOS Y DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA | 16 |
| 2.6.1 ÓXIDO NÍTRICO (NO) | 16 |
| 2.6.2 LIPOPOLISACÁRIDOS | 17 |
| 2.7 BARRERA HEMATO-ENCEFÁLICA (BHE) | 17 |
| 2.8 FUNCIÓN DE LA BHE | 18 |
| 2.9 EL FENOTIPO DE LA BHE | 19 |
| 2.10 COMPONENTES DE LA BHE | 19 |
| 2.10.1 CÉLULAS ENDOTELIALES CEREBRALES | 19 |
| 2.10.2 ASTROCITOS | 20 |
| 2.10.3 UNIONES OCLUYENTES O TIGHT-JUNCTIONS (TJS) | 21 |
| 2.10.4 LAS UNIONES ADHERENTES (AJS) | 22 |
| 2.10.5 EL CITOESQUELETO | 23 |
| 2.11 FACTORES QUE ALTERAN LA INTEGRIDAD DE LA BHE | 24 |
| 2.12 PAPEL DE LOS ASTROCITOS EN LA INDUCCIÓN DEL | |

| | |
|--|-----------|
| FENOTIPO CEREBRAL | 26 |
| 2.13 ASTROCITOS EN LA INFLAMACIÓN | 27 |
| 2.13.1 ACTIVACIÓN | 27 |
| 2.13.2 RESPUESTA INFLAMATORIA | 28 |
| 2.13.3 PRODUCCIÓN DE QUIMIOQUINAS | 28 |
| 2.13.4 FORMACIÓN DE LA CICATRIZ GLIAL | 29 |
| 2.14 EL ENDOTELIO CEREBRAL EN LA INFLAMACIÓN | 29 |
| 2.14.1 EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN | 30 |
| 2.14.2 PRODUCCIÓN DE QUIMIOQUINAS | 31 |
| 2.15 FISIOPATOLOGÍA DEL SUH EN EL SISTEMA NERVIOSO | 31 |
| | |
| 3 MATERIALES Y METODOS | 35 |
| 3.1 Evaluación de los efectos de Stx1 sobre ASTs | 35 |
| 3.1.1 Estudios de la reacción astrocitaria e interacción con Stx1 | 35 |
| 3.1.1.1 Preparación de la Stx. | 35 |
| 3.1.1.2 Obtención de cultivos primarios de ASTs. | 35 |
| 3.1.1.3 Cultivos y tratamientos de ASTs | 36 |
| 3.1.1.4 Análisis de muerte celular. | 36 |
| 3.1.1.5 Expresión de la Proteína fibrilar glial ácida (GFAP). | 37 |
| 3.1.1.6 Evaluación de la expresión del receptor de la toxina (Gb3). | 37 |
| 3.1.1.7 Ensayo de unión e internalización de Stx1. | 38 |
| 3.1.2 Estudio de la respuesta inflamatoria de ASTs | 38 |
| 3.1.2.1 Recolección de Medio condicionado de ASTs | 38 |
| 3.1.2.2 Determinación de la secreción de TNF- α | 39 |
| 3.1.2.3 Determinación de óxido nítrico (NO) | 40 |
| 3.1.2.4 Ensayo de quimiotaxis de PMN | 40 |
| 3.1.3 Estudio de la interacción de ASTs con PMN | 40 |
| 3.1.3.1 Obtención de PMN de rata. | 40 |
| 3.1.3.2 Ensayo de adhesión y citotoxicidad por PMN | 41 |
| 3.1.4 Estudio de la función Astrocitaria | 42 |
| 3.1.4.1 Ensayo de lesión y cicatrización | 42 |
| 3.1.4.2 Evaluación de la proliferación celular | 42 |
| 3.2 Evaluación de los efectos de factores astrocitarios inducidos por Stx1 | 43 |
| 3.2.1 Obtención y cultivo de células endoteliales | 43 |
| 3.2.1.1 Obtención de células endoteliales primarias de cordón umbilical | 43 |
| 3.2.1.2 Pasaje de las células HUVEC | 43 |
| 3.2.2 Obtención de células endoteliales con fenotipo de endotelio cerebral. | 43 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.2.1 Preparación de MC-ASTs para diferenciación de HUVEC | 44 |
| 3.2.2.2 Inducción del fenotipo cerebral en HUVEC | 44 |
| 3.2.2.3 Obtención de MC-ASTs tratados para ensayos celulares | 44 |
| 3.2.3 Estudios del fenotipo cerebral en HUVECd | 45 |
| 3.2.3.1 Determinación de la actividad fosfatasa alcalina endotelial | 45 |
| 3.2.3.2 Evaluación de la expresión y distribución celular de ZO-1 | 45 |
| 3.2.3.3 Evaluación de la reorganización de la actina | 45 |
| 3.2.4 Estudio de la permeabilidad endotelial | 46 |
| 3.2.4.1 Ensayo de translocación transendotelial de Stx1 | 46 |
| 3.2.4.2 Ensayo de Citotoxicidad en células Vero. | 46 |
| 3.2.5 Estudio de expresión del receptor e interacción con la Stx1 | 47 |
| 3.2.5.1 Evaluación de la expresión del receptor de la toxina (Gb3). | 47 |
| 3.2.5.2 Evaluación de la sensibilidad a la Stx1. | 47 |
| 3.2.6 Estudio de la Activación endotelial | 47 |
| 3.2.6.1 Expresión de ICAM-1 y E-selectina en HUVEC diferencias | 47 |
| 3.2.6.2 Evaluación de Factor Von Willebrand (FVW) liberado. | 48 |
| 3.2.7 Estudio de PMN y su interacción con el endotelio | 49 |
| 3.2.7.1 Obtención de leucocitos PMN humanos. | 49 |
| 3.2.7.2 Evaluación de la activación de PMN. | 49 |
| 3.2.7.3 Migración transendotelial de PMN. | 50 |
| 3.2.7.4 Ensayo de adhesión de PMN a HUVECd. | 50 |
| 3.2.7.5 Ensayo de citotoxicidad mediada por PMN. | 51 |
| 3.2.8 Estudios realizados en plaquetas y su interacción con el endotelio | 51 |
| 3.2.8.1 Preparación de plaquetas. | 51 |
| 3.2.8.2 Evaluación de la activación de plaquetas. | 51 |
| 3.2.8.3 Evaluación de la adhesión de plaquetas a HUVECd. | 52 |
| 3.3 Análisis estadístico | 52 |
| | |
| RESULTADOS | 54 |
| 4.1 Efectos inducidos por Stx1 en Astrocitos (ASTs) sensibilizados por LPS. | 54 |
| 4.1.1. Los ASTs son blanco de la Stx1 | |
| 4.1.1.1 El pre-tratamiento con LPS sensibiliza a los ASTs a los efectos mediados por Stx1. | 54 |
| 4.1.1.2 La expresión del receptor de Stx1 y la internalización de Stx1 está aumentada en ASTs sensibilizados con LPS. | 56 |

| | |
|--|-----------|
| 4.1.2 Stx1 induce una respuesta inflamatoria en ASTs | 57 |
| 4.1.2.1 La respuesta inflamatoria inducida por Stx1 está potenciada en los ASTs sensibilizados por LPS. | 57 |
| 4.1.2.2 La adhesión y la citotoxicidad mediada por PMN es inducida por Stx1 y está aumentada en ASTs sensibilizados con LPS. | 59 |
| 4.1.3 Stx1 reduce la función de cicatrización de ASTs sensibilizados con LPS. | 60 |
| 4.1.4 La inhibición de NF-κB o el bloqueo de la actividad de TNF-α evita los efectos mediados por Stx1 en ASTs sensibilizados con LPS. | 62 |
| | |
| 4.2 Efecto de los factores solubles liberados por ASTs en respuesta a LPS y/o Stx1 sobre células endoteliales diferenciadas con propiedades de endotelio cerebral. | 66 |
| 4.2.1 El medio condicionado de ASTs induce la diferenciación de CEs periféricas estimulando propiedades de endotelio cerebral. | 66 |
| 4.2.2 Stx1 induce en AST sensibilizados con LPS la liberación de factores tóxicos para HUVECd. | 69 |
| 4.2.3 Stx1 induce en ASTs sensibilizados por LPS la liberación de factores que aumentan la expresión de Gb3 y la sensibilidad al daño por Stx1 en HUVECd. | 71 |
| 4.2.4 Stx1 induce en ASTs sensibilizados con LPS la liberación de factores que disminuyen las propiedades de endotelio cerebral | 73 |
| 4.2.4.1 Stx1 induce en ASTs sensibilizados con LPS la liberación de factores que disminuyen la expresión de ZO-1 y modifican la disposición de los filamentos de actina en HUVECd. | 73 |
| 4.2.4.2 Stx1 en ASTs sensibilizados con LPS induce la liberación de factores que aumentan la translocación de Stx1 a través de HUVECd. | 76 |
| 4.2.5 Stx1 induce en ASTs sensibilizados con LPS la liberación de Factores que activan HUVECd. | 77 |
| 4.2.6 Interacción de PMN con HUVECd inducida por factores liberados por ASTs expuestos a Stx1 y LPS | 78 |
| 4.2.6.1 Stx1 induce en ASTS sensibilizados con LPS la liberación de factores que estimulan la activación de PMN | 78 |
| 4.2.6.2 Stx1 en ASTs sensibilizados con LPS induce la liberación de factores que aumentan la migración transendotelial de PMN | 80 |
| 4.2.6.3 Stx1 induce en ASTs sensibilizados con LPS la liberación de factores que aumentan la adhesión de PMN y la sensibilidad | |

| | |
|--|------------|
| <i>al daño mediado por PMN en HUVECd.</i> | 81 |
| 4.2.7 Stx1 induce en AST sensibilizados con LPS la liberación de factores que inducen un estado protrocoagulante en HUVECd | 84 |
| 4.2.7.1 <i>Stx1 induce en ASTs sensibilizados con LPS la liberación de factores que inducen la liberación de Factor von Willebrand en HUVECd.</i> | 84 |
| 4.2.7.2 <i>Stx1 induce en AST sensibilizados con LPS la liberación de factores que inducen la activación de plaquetas.</i> | 85 |
| 4.2.8 La inhibición de NF-κB o el bloqueo del TNF-α endógeno en ASTs tratados con LPS y Stx1 suprime los efectos observados sobre HUVECd. | 87 |
| 5 APENDICE | 91 |
| 6 DISCUSIÓN | 97 |
| 6.1 <i>Efecto de Stx1 sobre ASTs sensibilizados por LPS.</i> | 97 |
| 6.2 <i>Influencia de los Factores astrocitarios liberados en respuesta a LPS y Stx1 sobre células endoteliales con fenotipo cerebral.</i> | 101 |
| 7 INTEGRACION Y CONCLUSIONES | 113 |
| 8 BIBLIOGRAFIA | 116 |

ABREVIACIONES

Abreviación / nombre completo

| | |
|-----------|---|
| Anti-Stx1 | Anticuerpo anti Stx1 |
| ASTs | Astrocitos |
| BHE | Barrera hemato-encefalica |
| BSA | Seroalbúmina bovina |
| CEs | Células endoteliales |
| D+SUH | Forma epidémica del SUH (diarrea positiva) |
| EHEC | E. Coli enteropatógenicas |
| EM | Esclerosis Múltiple |
| ES | Error estándar |
| f-actina | Actina filamentosa |
| FAN | Fosfatasa alcalina de neutrófilo |
| FAP | Fosfatasa ácida de plaquetas |
| FcγR | Receptor para la porción Fc de las inmunoglobulinas G |
| FGFb | Factor de crecimiento fibroblasto b |
| FITC | Isotiocianato de fluoresceína |
| FMLP | formil-metionil-leucil-fenilalanina |
| FSC | perfil de tamaño |
| FvW | Factor von Willebrand |
| Gb3 | Globotriaosilceramida |
| GFAP | Proteína fibrilar glial ácida |
| HUVEC | Células endoteliales de cordón umbilical humano |
| HUVECd | HUVEC diferenciadas |
| ICAM-1 | Molécula de adhesión intercelular-1 |
| IFM | Intensidad de fluorescencia media |
| IL- | Interleuquina- |
| iNOS | Oxido nítrico sintetasa inducible |
| IROs | Intermediarios reactivos del oxígeno |
| LacCer | Lactosilceramida |
| LPS | Lipopolisacáridos |
| MC | Medio condicionado |
| MC-ASTs | Medio condicionado de astrocitos |
| MCP-1 | Proteína tipo 1 quimioattractante de monocitos |
| M-CSF | Factor estimulador de colonias de la serie monocítica |
| ON | Oxido nítrico |
| PAI-1 | Inhibidor tipo 1 del activador del plasminógeno |
| PBS | Buffer fosfato salino |

| | |
|-----------------|---|
| PE | Ficoeritrina |
| PI | Plaquetas |
| PMN | Neutrófilos |
| PRPs | Plasma rico en plaquetas |
| Px | Polimixina |
| rrTNF- α | TNF- α recombinante de rata |
| SFB | Suero fetal bovino |
| SSC | Perfil de complejidad |
| STEC | E. Coli productora de Stx |
| Stx | Toxina Shiga |
| SUH | Síndrome Urémico Hemolítico |
| TGFb | Factor de crecimiento tumoral b |
| TJs | Uniones ocluyentes |
| TNF- α | Factor de necrosis tumoral α |
| t-PA | Activador del plasminógeno tisular |
| VCAM-1 | Molécula de adhesión vascular-1 |
| VEGF | Factor de crecimiento de endotelio vascular |
| ZO-1 | Zona ocludens-1 |

1. BREVE INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El síndrome urémico hemolítico (SUH) se define clínicamente por una triada de anemia hemolítica, trombocitopenia y disfunción renal (Gianantonio y *col.*, 1973). La forma típica o epidémica del SUH (también denominada D+SUH) se manifiesta, fundamentalmente, en niños lactantes en la primera infancia y en ancianos (Gordjani y *col.*, 1997) . La etapa prodrómica de las formas típicas del SUH se manifiesta en aproximadamente un 90% de los casos con diarreas sanguinolentas que, habitualmente, preceden a la enfermedad en una o dos semanas (Tarr, 1995).

La etiología de esta forma típica de SUH está epidemiológicamente ligada a las infecciones causadas por bacterias Gram negativas enterohemorrágicas del género *Shigella* y *Escherichia* productoras de exotoxinas (STEC), conocidas genéricamente como *shiga-toxins* (Stx), (Paton y Paton, 1998). Las infecciones por la cepa *E.coli* O157:H7 productora de Stx, son las principales responsables del SUH a nivel mundial (Gordjani y *col.*, 1997). Stx1 y Stx2 son unas de las Stx predominantes en el SUH

Esta enfermedad es la causa más frecuente de insuficiencia renal aguda en la población pediátrica y nuestro país tiene la mayor incidencia de SUH en el mundo. Esto se relaciona con daño endotelial glomerular y/o arteriolas del riñón y daño de células epiteliales inducidas por Stx a través de la interacción con su receptor glicolipídico globotriaosylceramida (Gb₃) (Proulx y *col.*, 2001). A pesar de que la Stx es el principal factor patogénico y es necesario para el desarrollo del SUH, la evidencia clínica y experimental sugiere que la respuesta inflamatoria es capaz de potenciar la toxicidad de la Stx. De hecho, los lipopolisacáridos (LPS) presentes en las bacterias Gram negativas productoras de Stx (STEC) así como los polimorfonucleares neutrófilos (PMN) juegan un rol clave para el desarrollo de SUH (Exeni y *col.*, 2007). Más aún, la neutrofilia observada en pacientes correlaciona con el mal pronóstico de la enfermedad (Fernandez y *col.*, 2007).

En casos severos de SUH, el daño de células endoteliales (CEs) no se limita a al riñón sino que se extiende a otros órganos, tales como el cerebro. Un

amplio espectro de diferentes síndromes neurológicos se observan en pacientes con SUH durante la fase aguda de la enfermedad. De hecho, las complicaciones del sistema nervioso central (SNC) indican un SUH severo y el daño cerebral es la causa más común de muerte (Eriksson y *col.*, 2001). Signos comunes del compromiso del SNC incluyen convulsiones, coma, alteraciones de conciencia, hemiparesia y disturbios visuales, entre otros.

La administración sistémica e intracerebral de Stx, así como la infección por vía oral con STEC han demostrado causar daño cerebral en diferentes modelos animales. Sin embargo, la patogénesis del deterioro del SNC aún no ha sido comprendida plenamente. Se ha sugerido que hay alteraciones a nivel de la barrera hematoencefálica (BHE) debido al aumento en la permeabilidad de la misma y/o debido al daño de las células endoteliales (CEs) cerebrales que la componen. Los síntomas neurológicos en pacientes y animales de experimentación han sido explicados por el daño secundario de neuronas producto a su vez del daño en las CEs. Si bien se ha demostrado que las CEs cerebrales humanas son relativamente resistentes a la toxina, mediadores inflamatorios, como el TNF- α y la IL-1 β , claramente aumentan la sensibilidad de estas células a los efectos tóxicos de la toxina. (Eisenhauer y *col.*, 2001). Más aún, como ocurre con otras células blanco de la Stx, estos mediadores inflamatorios aumentan la expresión del receptor Gb3 de la Stx así como la afinidad de unión al mismo.

Las CEs del cerebro forman parte de la BHE. Estas poseen moléculas de adhesión especializadas que le permiten una unión intercelular estrecha y sistemas de enzimas metabólicas específicas que le confieren propiedades restrictivas protegiendo al cerebro de sustancias nocivas de la sangre y logran bloquear el pasaje de células inmunes hacia el SNC. Al mismo tiempo estas CEs suplen al cerebro de los nutrientes requeridos. Considerando esto, se considera que el compromiso de la integridad de la BHE es un componente central en las patologías asociadas al SNC.

Un gran número de agentes químicos que se encuentran en el plasma o bien son secretados por las células cerebrales asociadas a la BHE, son capaces de aumentar la permeabilidad de la barrera impidiendo su función. Respecto a esto, el LPS, como producto natural de infecciones con bacterias Gram negativas, producen un aumento de la liberación de moléculas

inflamatorias como TNF- α , IL-1 β y especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, las cuales son capaces de aumentar la permeabilidad de la BHE. Además, varios estudios *in vivo*, han demostrado que la toxina impide la función de la barrera incrementando su permeabilidad (Fukuda y col., 2005). Más aún, se ha demostrado que la toxina misma es capaz de atravesar la barrera y entrar al parénquima cerebral (Fujii y col., 1998; Goldstein y col., 2007)

Los astrocitos (ASTs) son células inflamatorias que se encuentran en todo el SNC y se encuentran en estrecho contacto con las CEs cerebrales mediante procesos terminales (*end-foot processes*) (Kacem y col., 1998) envolviendo más del 99% del endotelio constituyente de la BHE. Distintas evidencias indican que la interacción de los ASTs con el endotelio cerebral determina y regula la función de la BHE (Arthur y col., 1987; Beck y col., 1984). Además, los ASTs están en contacto con neuronas mediante uniones comunicantes (*gap junctions*) y liberan factores que son esenciales para la supervivencia neuronal (Blanc y col., 1998). Sin embargo, en respuesta al daño cerebral, los ASTs se activan y liberan mediadores inflamatorios como óxido nítrico y TNF- α , alterando la permeabilidad de la BHE afectando de este modo la supervivencia neuronal y la integridad del tejido cerebral (Abbott, 2000; Chen y col., 2000). Además, citoquinas y quimioquinas derivadas de ASTs pueden estimular el sistema inmune periférico y atraer leucocitos inflamatorios al sitio de injuria (Wang y col., 2000).

Teniendo en cuenta todo esto, los ASTs se encuentran en una posición crucial en la que podrían influenciar tanto la viabilidad neuronal como la integridad de las CEs cerebrales una vez que la toxina y factores asociados a la infección STEC atraviesan la barrera y alcanzan el parénquima.

Dado el rol inflamatorio de los ASTs y la estrecha asociación anatómica entre los ASTs y el endotelio cerebral, la **hipótesis** de este trabajo es que los efectos inducidos por LPS y Stx1 en ASTs podrían estar involucrados en el daño cerebral observado en los casos severos de SUH.

Por lo tanto, el **objetivo central** de este proyecto es evaluar si la Stx1 sola o en combinación con LPS, es capaz de inducir una respuesta inflamatoria en ASTs y, por otra parte, analizar la influencia de esta respuesta sobre CEs

con propiedades de endotelio cerebral para poder comprenderla y, eventualmente, poder integrarla en el marco de la neuropatogenia del SUH.

A continuación se definen los objetivos específicos:

1- Efectos inducidos por Stx1 en Astrocitos (ASTs)

- Determinar la toxicidad inducida por Stx1 sobre ASTs en presencia o ausencia de LPS, un factor inflamatorio que tiene incidencia fundamental en el SUH .
- Evaluar la activación de ASTs estimulados con Stx1 y/o LPS.
- Evaluar en ASTs la modulación por LPS del receptor GB₃ de la Stx1 y la internalización de Stx1.
- Analizar el efecto de la Stx1 sobre la síntesis de moléculas inflamatorias y quimioattractantes en ASTs sensibilizados por LPS.
- Evaluar el efecto de Stx1 sobre la sensibilización al daño mediado por PMN sobre ASTs sensibilizados por LPS.
- Evaluar la capacidad migratoria en la repuesta de reparación de ASTs estimulados con Stx1 y/o LPS.
- Determinar el mecanismo de potenciación de los efectos inducidos por Stx1 sobre ASTs sensibilizados por LPS.

2- Efecto de los factores solubles liberados por ASTs en respuesta a LPS y/o Stx sobre células endoteliales con propiedades de endotelio cerebral.

Determinar los efectos de factores liberados por ASTs estimulados con LPS y/o Stx1 sobre:

- La citotoxicidad de células endoteliales
- La modulación del receptor Gb3 en células endoteliales y la sensibilización al daño inducido por Stx1
- La integridad y permeabilidad del de las células endoteliales
- La activación de células endoteliales, neutrófilos y plaquetas
- La interacción de células endoteliales con neutrófilos y plaquetas

2. INTRODUCCIÓN GENERAL

2.1 GENERALIDADES

El síndrome urémico hemolítico (SUH) es una enfermedad caracterizada por la triada anemia hemolítica traumática (eritrocitos fragmentados), trombocitopenia y daño renal agudo (Gianantonio *y col.*, 1973). La forma típica o epidémica del SUH (también denominada D+SUH) afecta a niños menores de cinco años y es usualmente precedida por un prodromo de diarrea sanguinolenta. Si bien el principal órgano afectado es el riñón, también se observan lesiones severas en la pared del colon, daño en el miocardio por isquemia y alteraciones metabólicas, y oclusión vascular en el sistema nervioso central (Gianantonio *y col.*, 1973). La lesión de microangiopatía trombótica (MAT) típica del SUH es debida a la formación de trombos de plaquetas y fibrina que ocluyen la microvasculatura en los órganos afectados. Así, la disfunción endotelial es el factor más importante del proceso microangiopático, que consiste en un engrosamiento de la pared vascular de capilares y arteriolas, con hinchazón y desprendimiento de las células endoteliales (CEs) de la membrana basal y acumulación de material esponjoso en el subendotelio (Remuzzi y Ruggenenti, 1995). Actualmente no existe tratamiento específico para el D+SUH, sino que los pacientes son tratados con terapias de soporte destinadas a paliar los síntomas. La diálisis peritoneal es el principal tratamiento para eliminar los metabolitos tóxicos y reducir el daño renal agudo. Si bien de esta forma se ha reducido significativamente la mortalidad de esta enfermedad, existe una gran proporción de niños (hasta un 50%) que presentan secuelas renales o neurológicas severas (Spizzirri *y col.*, 1997b; Siegler *y col.*, 1994; Gagnadoux *y col.*, 1996).

Si bien en un principio se especuló que el agente etiológico era de origen viral (Gianantonio *y col.*, 1973), más tarde Karmali *y col.* demostraron que el agente etiológico del D+SUH es una exotoxina, denominada actualmente toxina Shiga (Stx), producida por ciertas cepas de *E. coli* enterohemorrágicas, siendo el serotipo mayormente asociado al D+SUH el O157:H7 (Karmali *y col.*, 1983; Karmali *y col.*, 1985). Existen diversas variantes de la toxina (Stx1, Stx2,

Stx2c, d, e y v) que se encuentran codificadas en bacteriófagos integrados en el genoma bacteriano y una vez internalizadas en la célula blanco (por endocitosis vía receptor) causan, en general, inhibición de la síntesis proteica y/o muerte celular por apoptosis (Sandvig y van Deurs, 2000; Keusch y Acheson, 1997). La holotoxina se compone de una subunidad A catalíticamente activa de 32 kDa y cinco subunidades B involucradas en la unión al receptor de 7.7 kDa cada una. Si bien se han descrito distintos receptores glicolipídicos que poseen el disacárido terminal Gal α 1-4 Gal capaces de unir la Stx, el globotriosilceramida o Gb₃ es el que se encuentra en las CEs y el que posee mayor afinidad por la toxina (Kaplan y *col.*, 1990). Luego de la infección con *E. coli* productoras de toxina Shiga (STEC) sólo el 5-10% de los niños infectados desarrollan el SUH, presentándose un amplio rango de posibilidades con respecto al curso de la infección: portadores sanos, manifestaciones solamente intestinales o alteraciones parciales o formas incompletas de SUH (Sanchez Avalos, 2000; Lopez y *col.*, 1995). Esto implica que factores del huésped y de la bacteria podrían influir en el desarrollo de la enfermedad.

Existen diversas etapas entre la ingestión del alimento contaminado y el desarrollo del SUH. La primera involucra la colonización del intestino por la bacteria, la cual comienza a producir la Stx causando diarrea sanginolenta. Debido a que las STEC no son invasivas, el pasaje de la toxina a la circulación se realiza a través del epitelio intestinal (Acheson y *col.*, 1996; Hurley y *col.*, 1999). 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 (van Setten y *col.*, 1996; te Loo y *col.*, 2000; Cooling y *col.*, 1998). En el riñón la toxina causa destrucción de las células epiteliales tubulares y del endotelio glomerular (daño renal agudo) (Inward y *col.*, 1997a; Kaneko y *col.*, 2001). Durante todo este proceso existe activación de la cascada de coagulación, con la consecuente formación de trombos de plaquetas y fibrina, y liberación de mediadores inflamatorios. De esta forma se produce obstrucción de la microvasculatura con fragmentación mecánica de los glóbulos rojos (anemia hemolítica) y la característica trombocitopenia.

La relevancia de la respuesta inflamatoria en la fisiopatología del SUH es destacable. Existen diversas evidencias *in vivo* e *in vitro* que demuestran que mediadores inflamatorios como los lipopolisacáridos (LPS), el TNF- α y la IL1- β potencian el daño inducido por la toxina. Las CEs *in vitro* aumentan notablemente su susceptibilidad a la Stx luego de la incubación con los mediadores mencionados (Louise y Obrig, 1992; van de Kar y *col.*, 1992; van Setten y *col.*, 1997) y la mortalidad y el daño renal inducidos por la Stx *in vivo* son exacerbados por el pre-tratamiento con los LPS (Palermo y *col.*, 2000; Barrett y *col.*, 1989).

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

- ❖ Los polimorfonucleares neutrófilos (PMN) constituyen una célula central en la respuesta inflamatoria. Los pacientes con D+SUH presentan una marcada neutrofilia, que ha sido asociada a un mal pronóstico de la enfermedad (Walters y *col.*, 1989; Milford y *col.*, 1991). Más aún, en el suero de los pacientes se han encontrado niveles elevados de IL-8, una citoquina con conocidas propiedades moduladoras de la función de los PMN, y elastasa, una proteasa presente en los PMN que se libera luego de la activación de los mismos (Fitzpatrick y *col.*, 1992b; Westerholt y *col.*, 2000; Fitzpatrick y *col.*, 1992a; Ishikawa y *col.*, 2000).

- ❖ Las plaquetas participan activamente del proceso de coagulación en respuesta al daño endotelial. Además de la trombocitopenia anteriormente mencionada, los pacientes con D+SUH presentan su función plaquetaria defectuosa, con niveles reducidos de moléculas presentes en sus gránulos (Pareti y *col.*, 1980; Fong y Kaplan, 1982; Edefonti y *col.*, 1985).

- ❖ 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 PMN y plaquetas (Provost y *col.*, 1994; Provost y Merhi, 1997b; Provost y Merhi, 1997a; Radomski y *col.*, 1987). 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 (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 (Herlitz y *col.*, 1997).

2.2 ASPECTOS CLÍNICOS DEL D+SUH

El D+SUH se caracteriza por un prodromo del tracto digestivo con diarrea sanguinolenta, dolor abdominal y vómitos, aunque en ciertos casos existen manifestaciones prodrómicas del tracto respiratorio y fiebre. Las lesiones en el intestino se localizan principalmente en el colon, donde pueden aparecer infartos colónicos, hemorragias y necrosis intestinales (Gianantonio y *col.*, 1973).

La insuficiencia renal aguda se presenta, con diversos grados, en el 100% de los casos, siendo esta enfermedad la principal causa de insuficiencia renal en los pacientes pediátricos. A nivel microscópico la patología renal del D+SUH en la etapa aguda muestra que las lesiones observadas son debidas a la coagulación intravascular y daño tubular directo, mientras que las lesiones tardías están relacionadas con la isquemia producida por la trombosis vascular y la lisis de los depósitos de fibrina (Gianantonio y *col.*, 1973).

La diálisis peritoneal ha reducido en gran medida las complicaciones de los cuadros clínicos que afectan el sistema muscular, digestivo, nervioso o cardiovascular, como consecuencia de la hipervolemia y el desequilibrio hidro-electrolítico. Sin embargo, la hipertensión arterial y la acidosis metabólica debida a la insuficiencia renal, son factores importantes que pueden provocar fallo cardíaco y disminución de la contractibilidad cardíaca, respectivamente (Exeni, 1996).

Por otro lado, los trastornos neurológicos pueden ser leves (irritabilidad, somnolencia, desorientación y temblores) o severos (convulsiones, obnubilación, estupor, coma, hemiparesis y paro respiratorio) (Exeni, 1996; Gianantonio y *col.*, 1973).

La anemia hemolítica se encuentra presente en todos los casos agudos de D+SUH y se caracteriza por la presencia de eritrocitos morfológicamente anormales. La hemólisis intravascular se debe al daño mecánico que sufren los eritrocitos al atravesar la microvasculatura ocluida por redes de fibrina y plaquetas (Exeni, 1996; Gianantonio y *col.*, 1973).

El aumento en los niveles de leucocitos, particularmente la población de PMN y la disminución en el número de plaquetas son dos aspectos característicos del D+SUH. La trombocitopenia observada es causa del consumo intravascular de las plaquetas. Por otra parte, la función plaquetaria se encuentra inhibida (fenómeno denominado de plaquetas "exhaustas") y se ha demostrado la disminución de componentes intraplaquetarios (Walters y *col.*, 1988; Fong y Kaplan, 1982).

2.3 PRESENCIA DE CITOQUINAS EN LOS PACIENTES CON D+SUH

El proceso inflamatorio en el D+SUH puede ser evidenciado por la determinación de citoquinas presentes en el suero de los pacientes. Así, niveles elevados tanto de las citoquinas inflamatorias IL-6 e IL-8, como de las antiinflamatorias IL-10 y el antagonista del receptor para la IL-1 (IL-1Ra) han sido observados por diversos autores en el suero de pacientes cursando el período agudo del D+SUH comparado con niños normales (Murata y *col.*, 1998; Litalien y *col.*, 1999; Karpman y *col.*, 1995; Proulx y *col.*, 1998). Si bien los resultados referentes a la presencia de TNF- α son variables, se ha propuesto que podrían cumplir un rol en el desarrollo de la enfermedad.

Varios trabajos han reportado un aumento de IL-8, IL-6, TNF- α y de la proteína tipo 1 quimioattractante de monocitos (MCP-1) en la orina de los pacientes con D+SUH (Karpman y *col.*, 1995; Inward y *col.*, 1997b; van Setten y *col.*, 1998), lo que revela una producción local de estos mediadores en el riñón y su secreción en la orina.

2.3.1 FACTORES PRONÓSTICO DEL D+SUH

Debido a que el daño renal en el SUH es irreversible, cuanto mayor es el daño mayor es la probabilidad de que existan secuelas que deriven en

insuficiencia renal crónica, donde la única posibilidad de recuperación es el trasplante renal. Si bien diversos factores han sido asociados al peor pronóstico de la enfermedad (duración y severidad de la diarrea, daño neurológico severo, alto recuento inicial de neutrófilos), el criterio que mejor refleja el riesgo de presentar consecuencias desfavorables a largo plazo fue propuesto por Gianantonio y confirmado posteriormente por varios autores. Este criterio postula que la prognosis de la enfermedad es dependiente de la magnitud del daño renal asociado, cuyo marcador bioquímico sería la duración de la anuria en el período agudo (Gianantonio *y col.*, 1973; de Jong y Monnens, 1988; Spizzirri *y col.*, 1997a; Siegler *y col.*, 1991). La medición de la función renal al año o a los dos años del episodio agudo también es un buen factor de predicción del pronóstico a largo plazo (de Jong y Monnens, 1988; Spizzirri *y col.*, 1997b; Huseman *y col.*, 1999). Por lo tanto, el control de la magnitud del daño renal en el período agudo resulta crucial para la recuperación de las funciones del riñón a largo plazo.

2.4 PATOFISIOLOGÍA DEL SUH

La lesión de las CEs en la microvasculatura, con la subsiguiente agregación de las plaquetas y activación de la cascada de coagulación, es uno de los principales factores en la fisiopatología del SUH. En los casos de D+SUH, la Stx es considerada la iniciadora del daño endotelial, que sería luego amplificado por factores provenientes de plaquetas activadas o del sistema inflamatorio. En el plasma de los pacientes con D+SUH se encuentran diversos indicadores de daño endotelial y activación de la cascada de coagulación, como por ejemplo el factor von Willebrand (Galbusera *y col.*, 1999; Mannucci *y col.*, 1989).

2.4.1 TRATAMIENTO

La terapia utilizada actualmente para el D+SUH consiste en el manejo de los síntomas con el fin de mantener la homeostasis y eliminar los metabolitos tóxicos generados. Esto incluye restringir la ingesta de líquidos, sodio, potasio y proteínas y dializar el paciente si fuera necesario. La diálisis

peritoneal se inicia cuando los pacientes están oligoanúricos o anúricos por 72 horas. Por otra parte, la anemia es corregida por transfusiones de glóbulos rojos sedimentados.

Los antibióticos como herramienta para combatir la infección bacteriana no son recomendables ya que aumentan el riesgo de contraer el SUH por dos motivos. En primer lugar, se ha demostrado que algunos antibióticos aumentan la producción de la toxina por parte de la bacteria, y en segundo término, la lisis de la bacteria en el intestino provocaría una liberación masiva de Stx, y por lo tanto, aumentaría el pasaje de la misma a la circulación (Walterspiel *y col.*, 1992; Paton y Paton, 1998). De la misma forma, los agentes antimovilizantes 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 (Paton y Paton, 1998).

Tratamientos con resinas cubiertas con oligosacáridos administrados oralmente, que captan la toxina en el intestino (por ej, Chromosorb, Synsorb), están siendo estudiados (Armstrong *y col.*, 1995; Takeda *y col.*, 1999). La utilización de estos agentes limitaría la cantidad y el tiempo de exposición a la toxina y podrían ser útiles en epidemias para tratar la población de riesgo expuesta. Sin embargo, cabe destacar que este tipo de tratamiento no sería efectivo en los casos en los que la toxina ya ha sido absorbida al momento de ser administrada la resina y que la mayor eficacia del tratamiento dependería del comienzo temprano del mismo.

La inmunización pasiva o activa también se encuentra en investigación con resultados alentadores. Estudios en cerdos y conejos demostraron que la inmunización con el toxoide de la variante Stx2e protegió a los animales del desafío con una *E. coli* productora de Stx2e (Donohue-Rolfe *y col.*, 1999; Matisse *y col.*, 2001). Similarmente, se demostró que la inmunización de conejos con toxoides de la Stx1, Stx2 o la subunidad A o B, protege de la muerte e inhibe la toma de la toxina marcada con ¹²⁵I por los órganos blanco, siendo la misma depurada por el hígado y bazo (Boyd *y col.*, 1991; Bielaszewska *y col.*, 1997). Por otra parte, un estudio reciente en ratones muestra que un anticuerpo monoclonal anti-Stx, disminuye la mortalidad ante el desafío con STEC, inclusive cuando el mismo es administrado 24 horas luego de la inoculación de la bacteria (Yamagami *y col.*, 2001).

Agentes antiplaquetarios o antitrombóticos como heparina, prostaciclina, aspirina y estreptoquinasa no resultan beneficiosos y pueden provocar hemorragias (Van Damme-Lombaerts y *col.*, 1988; Remuzzi y Ruggenti, 1998). La infusión o intercambio de plasma fresco puede resultar efectivo en casos no típicos de SUH (Remuzzi y Ruggenti, 1998) mientras que la administración de gama globulinas endovenosas o glucocorticoides no son eficaces (Finazzi y *col.*, 1992; Perez y *col.*, 1998). Por último, la vitamina E como terapia antioxidante podría resultar beneficiosa aunque no ha sido probada en estudios controlados (Remuzzi y Ruggenti, 1998).

2.4.2 EPIDEMIOLOGÍA

El serotipo *E. coli* O157:H7 ha sido ampliamente asociado al desarrollo del D+SUH. Sin embargo, existen más de 100 serotipos capaces de causar la enfermedad en el humano (O26, O91, O111, O113, O121, O145, entre otros) (Verweyen y *col.*, 1999; Paton y Paton, 1998). Cabe destacar que la facilidad en el aislamiento del serotipo O157:H7, por su incapacidad de fermentar sorbitol, probablemente haya contribuido a una sobreestimación en la prevalencia del mismo. En Norte América y Europa aproximadamente el 70% de los casos ha sido atribuido a este serotipo (Remuzzi y Ruggenti, 1995). En nuestro país, sin embargo, la incidencia del O157:H7 es mucho menor (Lopez y *col.*, 1989; Rivas y *col.*, 1998).

La incidencia del D+SUH varía según el año y el país. En los últimos años se han reportado incidencias de 0.2-4 casos/100.000 habitantes en Sudáfrica, Europa y Norte América, mientras que nuestro país presenta la incidencia más alta con 7-20 casos/100.000 habitantes (Sanchez Avalos, 2000; Verweyen y *col.*, 1999). El modo más frecuente de transmisión es a través del consumo de comida o agua contaminada con cepas STEC, principalmente carne mal cocida o productos no pasteurizados. Sin embargo, la transmisión persona a persona también es posible (Paton y Paton, 1998). El ganado vacuno y el ovino son reservorios de *E. coli* O157:H7 y otras cepas patógenas (Wieler y *col.*, 1998; Beutin y *col.*, 1997; Kudva y *col.*, 1997). 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 (Beutin y *col.*, 1997). Por otra parte, diversas STEC han sido aisladas de las heces de otros animales domésticos como cerdos, perros y gatos, constituyendo una fuente adicional de posible transmisión (Beutin y *col.*, 1993; Beutin, 1999).

Luego de una infección con una STEC entre un 5-10% de los casos desarrollan D+SUH, mientras que el resto presenta distintos efectos como resultado de la infección: niños que permanecen sin síntomas, con manifestaciones exclusivamente intestinales o formas incompletas de SUH, como se mencionó anteriormente. Con el manejo de los síntomas y la introducción de la diálisis peritoneal, la mortalidad del D+SUH se ha reducido considerablemente y es, en la actualidad, del 0 al 5%. Sin embargo, existe una proporción importante de niños (hasta un 50%) que pueden presentar secuelas renales de distintos grados, o nerviosas (Spizzirri y *col.*, 1997b; Siegler y *col.*, 1994; Gagnadoux y *col.*, 1996).

2.5 INTERACCIÓN DE STX CON DISTINTOS TIPOS CELULARES

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

2.5.1 POLIMORFONUCLEARES NEUTRÓFILOS (PMN)

La mayoría de las evidencias que señalan a los PMN como células importantes en la patología del D+SUH provienen de la clínica. Los pacientes presentan una marcada neutrofilia en el período agudo de la enfermedad, que ha sido asociada, en algunos estudios, a un mal pronóstico (Walters y *col.*, 1989; Milford y *col.*, 1991). Además del aumento plasmático de la IL-8 observado en los niños con D+SUH anteriormente mencionado, los niveles de la proteasa proveniente de los PMN, la elastasa, también se encuentran

aumentados en el suero de los pacientes (Fitzpatrick *y col.*, 1992b; Westerholt *y col.*, 2000; Litalien *y col.*, 1999). Esta última observación evidencia un aumento en la liberación de esta proteasa, probablemente como consecuencia de la activación de los PMN (Fitzpatrick *y col.*, 1992a; Ishikawa *y col.*, 2000; Kaplan y Mills, 1988). En concordancia con estos datos, se demostró que los PMN de pacientes con D+SUH presentaron una mayor adhesión a CEs en cultivo, provocando daño endotelial (Forsyth *y col.*, 1989). Por otra parte, en secciones de riñón provenientes de autopsias de niños con D+SUH, se demostró la presencia de un infiltrado de PMN por inmunohistoquímica (Inward *y col.*, 1997a).

2.5.2 PLAQUETAS

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

Los pacientes con D+SUH presentan trombocitopenia y defectos en la función plaquetaria. Si bien diversos estudios no han encontrado una alteración de la agregación plaquetaria o de la secreción de gránulos en respuesta directa a la Stx (Viisoreanu *y col.*, 2000; Thorpe *y col.*, 1999; Yoshimura *y col.*, 1998), Karpman *y col.* demostraron recientemente, que tanto la Stx como el pentámero de subunidades B, son capaces de inducir activación plaquetaria, evidenciada como formación de agregados y cambios ultramorfológicos, así como también por ensayos funcionales de unión a fibrinógeno y retención plaquetaria (Karpman *y col.*, 2001).

2.5.3 CÉLULAS ENDOTELIALES

El efecto de la Stx sobre las CEs *in vitro* ha sido extensamente estudiado. En las CEs de cordón umbilical humanas (HUVEC) la toxicidad de la Stx, medida como viabilidad o como inhibición de la síntesis de proteínas, sólo se hace evidente luego de la pre-estimulación con factores pro-inflamatorios como TNF- α , IL-1 β , LPS, o con el factor de diferenciación butirato de sodio (Louise y Obrig, 1992; van de Kar *y col.*, 1992; Ohmi *y col.*, 1998; Keusch *y col.*, 1996). En todos los casos, la sensibilización hacia la Stx es consecuencia de un aumento de la expresión del Gb₃, aunque los mecanismos por los cuales este fenómeno se produce parece ser diferente para los distintos factores.

2.6 RELACIÓN CON OTROS COMPONENTES BACTERIANOS Y DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA

2.6.1 ÓXIDO NÍTRICO (ON)

La administración de LPS o citoquinas como TNF- α e IL1 β inducen la iNOS en endotelio, células del músculo liso de rata, macrófagos y PMN humanos, células parenquimales y mesangiales de riñón de rata (Wheeler *y col.*, 1997; Shultz *y col.*, 1991; MacMicking *y col.*, 1997).

El ON posee un amplio espectro de funciones: vasodilatación, neurotransmisión, alteración de la permeabilidad vascular, y mantenimiento de las propiedades antitrombogénicas del endotelio mediante la inhibición de la agregación plaquetaria e inhibición de la adhesión de PMN y plaquetas (Provost *y col.*, 1994; Provost y Merhi, 1997b; Provost y Merhi, 1997a; Radomski *y col.*, 1987). Por otra parte, el ON es muy inestable y reacciona en medio acuoso con el oxígeno o sus intermediarios para generar otros radicales (NO₂), aniones más estables como nitritos (NO₂⁻) y nitratos (NO₃⁻) u otras especies con funciones antimicrobianas. Estos mecanismos antimicrobianos pueden llevar al daño de las propias células, lo que confiere al ON una naturaleza dual de beneficio-perjuicio.

Los pacientes con sepsis presentan cuadros severos de hipotensión y vasodilatación con daño vascular y coagulación intravascular diseminada.

Considerando que estos fenómenos podrían involucrar una hiperproducción de ON producido por la iNOS en respuesta al proceso inflamatorio asociado a la presencia de los LPS, la administración de inhibidores del ON como posible terapia podría mejorar el cuadro de los pacientes.

2.6.2 LIPOPOLISACÁRIDOS

Los LPS son componentes naturales de la pared de las bacterias gram negativas que acompañan a la Stx en las infecciones por STEC, y son potentes mediadores inflamatorios. Distintos tipos celulares responden a los LPS con la producción de citoquinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6 como en el caso de monocitos o CEs (Guha y Mackman, 2001; Glauser, 1996), o con la activación de mecanismos citotóxicos y secreción de proteasas e IROs en el caso de los PMN (Wilson, 1985).

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, han sido ya reportados. Estos efectos pueden ser directos o indirectos, como consecuencia de la producción de citoquinas inflamatorias en respuesta a los LPS.

2.7 LA BARRERA HEMATO-ENCEFÁLICA (BHE)

La BHE es una barrera selectiva formada por CEs que constituyen los microvasos cerebrales. Esta actúa como una “barrera física” debido a que presentan complejos proteicos que forman uniones ocluyentes estrechas, denominadas en inglés *tight-junctions* (TJs), entre células adyacentes forzando a la mayoría del tráfico molecular a tomar una ruta transcelular a través de la barrera, en lugar de moverse de manera paracelular a través de las uniones, como ocurre en la mayoría de los endotelios periféricos. Pequeñas moléculas gaseosas como el O₂ y el CO₂ pueden difundir libremente a través de la membrana lipídica. Esta misma ruta es tomada por pequeños agentes lipofílicos que incluyen algunas drogas como el etanol y barbitúricos. Sumada a las TJs, existen sistemas de transportes especializados en la membrana que regulan el transporte transcelular de pequeñas sustancias hidrofílicas. Estos

sistemas una “barrera de transporte” selectivo, permitiendo o facilitando la entrada de los nutrientes requeridos o bien, el eflujo de compuestos potencialmente dañinos (Begley y Brightman, 2003). Finalmente, una combinación de enzimas intracelulares y extracelulares confieren una “barrera metabólica” que metabolizan péptidos y ATP, además de inactivar numerosos compuestos neuroactivos y tóxicos. Las moléculas grandes hidrofílicas y proteínas por lo general quedan excluidas, a menos que sean específicamente transferidas de mediante transcitosis mediada por receptor (Pardridge, 2003). Sin embargo, debe tenerse en cuenta, que el endotelio cerebral presenta un grado mucho menor de endocitosis/transcitosis en comparación a las CEs de la vasculatura periférica, hecho que contribuye con la propiedad de la barrera de transporte. De modo que el término BHE cubre un amplio rango de características activas y pasivas del endotelio cerebral que determinan la impermeabilidad de la barrera. Si bien la mayoría de los trabajos se han enfocado en endotelio capilar del cerebro, puesto que conforman el área de superficie más extensa para el intercambio sangre-cerebro, debe considerarse que similares propiedades se encuentran también en el endotelio de vénulas y arteriolas, aunque pueden ser medianamente más permeables.

2.8 FUNCIÓN DE LA BHE

La BHE cumple varios roles (Abbott, 2005; Abbott y Romero, 1996). Por un lado, provee al cerebro de nutrientes esenciales y media el eflujo de productos de desperdicio. Además, controla los movimientos de iones y fluidos, protegiendo al cerebro de las fluctuaciones en la composición iónicas como las que se dan luego de las comidas o ejercicios, las cuales podrían interferir con la señalización sináptica y axonal (Cserr y Bundgaard, 1984). Por otro lado la barrera ayuda a mantener separados el pool de neurotransmisores y agentes neuroactivos que actúan centralmente, en el SNC y en la sangre periférica y tejidos, de modo que agentes similares pueden ser utilizados en dos compartimentos de manera independiente y evitando el *crosstalk*. Por último, debe destacarse que las propiedades restrictivas de la BHE también impiden que células inmunes de la sangre ingresen al parénquima cerebral, resguardando así al SNC de los efectos adversos que estas células pudieran

causar. Debido a su gran superficie (aprox. 20 m² por 1.3 kg. de cerebro) y la corta distancia de difusión entre neuronas y capilares, el endotelio cumple un importante rol en la regulación del microambiente cerebral.

2.9 EL FENOTIPO DE LA BHE

En el endotelio cerebral las uniones ocluyentes (TJs) son más complejas que en los vasos periféricos, formando una red de partículas intramembrana que efectivamente ocluyen los espacios intercelulares más efectivamente que en los endotelios periféricos. Incluso impide la difusión de pequeños iones como Na⁺ y Cl⁻, de modo que la resistencia eléctrica transendotelial puede ser cientos de veces superior a las registradas en endotelios no cerebrales (Butt *y col.*, 1990).

2.10 COMPONENTES DE LA BHE

2.10.1 CELULAS ENDOTELIALES CEREBRALES

Las CEs del cerebro presentan características específicas que las diferencian de los endotelios periféricos. Estas características le confieren propiedades restrictivas que protegen al SNC de las afecciones que puedan causar los cambios en el sistema vascular y responden al mismo tiempo de las demandas nutricionales de SNC. Las CEs presentan complejos proteicos especializados que sellan los espacios intercelulares de CEs adyacentes. Las TJs determinan de este modo una barrera física para la difusión paracelular de iones, péptidos y células inmunes presentes en la sangre (Huber *y col.*, 2001).

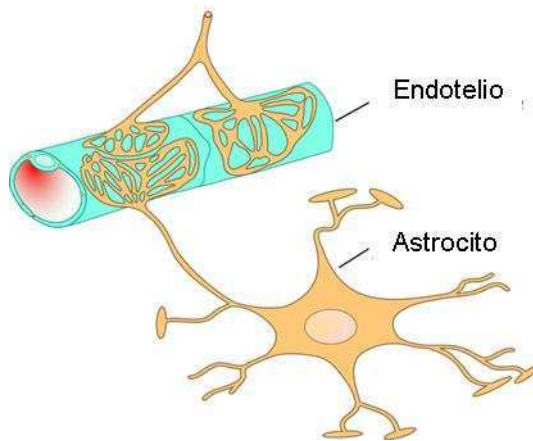
La impermeabilidad relativa de las células endoteliales cerebrales se debe a un muy bajo transporte transcelular y a la presencia de TJs continuas expresadas en la superficie formando uniones estrechas entre células adyacentes (Reese y Karnovsky, 1967). Las TJs intercelulares son altamente impermeables y son el elemento estructural más importante de la BHE.

2.10.2 ASTROCITOS

Los ASTs constituyen las células gliales más abundantes del SNC. Establecen un íntimo contacto con las CEs cerebrales mediante procesos terminales que envuelven más del 99 % del endotelio cerebral (Kacem y *col.*, 1998; Brightman y *col.*, 1970). Los ASTs establecen un íntimo contacto con las células endoteliales de BHE por medio de prolongaciones llamadas procesos terminales. Visualizaciones micro-anatómicas tridimensionales de las interacciones glial-endotelial, sugieren la existencia de “micro-dominios” en el que una célula endotelial se encuentra unida a un ASTs (Kacem y *col.*, 1998).

Además de la reconocida función estructural, los ASTs son responsables de numerosas funciones homeostáticas las cuales pueden influenciar directamente la viabilidad neuronal y la integridad del tejido. Por otro lado, existe gran cantidad de evidencias que indican que los ASTs ayudan a determinar la función de la BHE (Arthur y *col.*, 1987; Beck y *col.*, 1984; Butt, 1991; Hayashi y *col.*, 1997).

Los ASTs controlan la homeostasis iónica, metabólica y de neurotransmisores (Giaume y *col.*, 2007; Haydon y Carmignoto, 2006; Verkhratsky y Toescu, 2006). Por otro lado los ASTs también participan de la transferencia de información. Reciben la información entrante a través de una multitud de receptores para neurotransmisores que poseen en su membrana (Volterra y Meldolesi, 2005; Lalo y *col.*, 2006) a la vez que devuelven la información en virtud de la liberación regulada de gliotransmisores (Bezzi y *col.*, 2004; Volterra y Meldolesi, 2005). El procesamiento de la información dentro de la red astrocitaria, creada por uniones *gap* que conectan los procesos terminales, opera a nivel intercelular por el intercambio directo de segundos mensajeros, metabolitos y otras sustancias aún no del todo identificadas (Dermietzel, 1998; Scemes y Giaume, 2006).



Esquema que muestra vaso cerebral y los procesos terminales de ASTs perivascuales formando estructuras de tipo 'rosetas' en la superficie capilar del cerebro. Esta disposición es óptima para comunicación entre los ASTs y el endotelio.

2.10.3 UNIONES OCLUYENTES O TIGHT-JUNCTIONS (TJS)

Los factores más importantes responsables de la impermeabilidad de la BHE son los complejos de unión existentes entre las CEs de la microvasculatura cerebral que forman TJs, y rodean a las células como una cinta continua.

Varias proteínas de la membrana plasmática que forman las TJs han sido identificadas. Entre ellas se encuentran las claudinas, ocludinas y moléculas de adhesión de unión. Además, ZO (*zonula occludens*)-1, ZO-2, ZO-3, y cingulina constituyen proteínas citoplásmicas que conectan proteínas de transmembrana con la actina, una proteína del citoesqueleto responsable de la integridad estructural y funcional del endotelio (Ballabh y *col.*, 2004).

Las uniones claudina-claudina y ocludina-occludina entre CEs forman el "cierre primario" de las TJs, y sus dominio citoplasmático están estrechamente conectados con las proteínas ZO (Abbott y *col.*, 2006). A su vez, la función de ocludina es regulatoria y puede influir en el transporte paracelular (Hirase y *col.*, 1997). Ocludina y claudina pueden formar heteropolímeros y extensiones transcelulares que contienen canales para el transporte selectivo de iones y moléculas hidrofílicas (Matter y Balda, 2003). Por otra parte, ocludina puede estar implicada en el mantenimiento de la resistencia eléctrica de la BHE y la formación de poros acuosos (Tsukita y *col.*, 2001). Estos hechos, junto con las relaciones existentes entre ocludina y claudina, sugieren la contribución de estas proteínas a la selectiva difusión asociada a las TJs (Petty y Lo, 2002). Su

presencia parece ser esencial para el funcionamiento adecuado de las TJs y de la BHE.

Las moléculas de adhesión de unión (JAMs) pertenecen al tercer grupo de proteínas de membrana implicadas en la construcción de TJs. También pueden desempeñar un papel en la adhesión celular y la migración de monocitos a través de la BHE (Palmeri y *col.*, 2000).

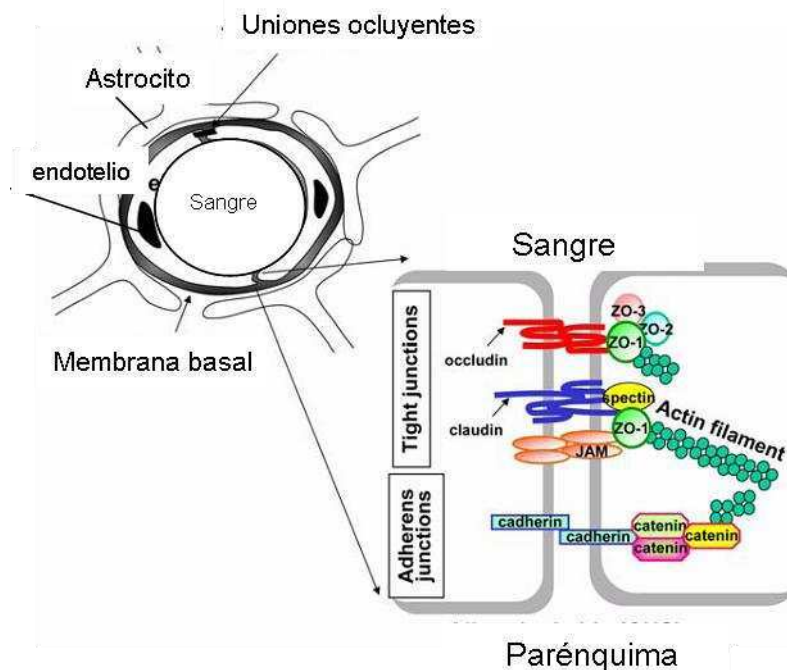
Las proteínas citoplasmáticas implicadas en las TJs incluyen las proteínas ZO (ZO-1, ZO-2, ZO-3), cingulina, y 7H6. ZO es una proteína asociada a membrana tipo guanina-kinasa. Las proteínas JAM se unen directamente a ZO-1. Por otra parte, las observaciones inmunocitoquímicas de Vorbrodt y *col.* revelaron una relación estructural estrecha entre ocludina inmunomarcada y ZO-1 (Vorbrodt y Dobrogowska, 2004). 7H6 es una fosfoproteína correlacionada con la impermeabilidad de TJs a los iones y moléculas de gran tamaño (Satoh y *col.*, 1996). En contraste con ZO-1, 7H6 puede desprenderse de las TJs cuando los niveles de ATP disminuyen; este desprendimiento genera el aumento de la permeabilidad paracelular (Mitic y Anderson, 1998). Cingulina es una fosfoproteína de 140-160 kDa localizada en el lado citoplasmático de las TJs. Se ha demostrado que se une a las proteínas ZO, a miosina y a AF-6, y esta unión determina su papel como un andamio entre las proteínas de membrana y el citoesqueleto (Cordenosi y *col.*, 1999).

Sobre la base de las observaciones anteriores, se desprende que el papel de las proteínas de las TJs, no sólo es mantener la integridad de la unión, sino también proporcionar apoyo estructural para el endotelio cerebral debido a las múltiples conexiones entre ellas. Las alteraciones en estos arreglos influyen en la estructura celular, y la integridad de las TJs, regulando las funciones de BHE y la homeostasis del SNC.

2.10.4 LAS UNIONES ADHERENTES (AJS)

Las uniones adherentes ofrecen un segundo ejemplo de los arreglos entre las estructuras de las CEs, en el que las proteínas de membrana son representadas por la gran familia de las caderinas. Las caderinas interactúan unas con otras homotípicamente en presencia de calcio (Takeichi, 1995). Por otra parte, en este tipo de uniones, las cateninas desempeñan un papel

análogo al de las ZOs en las TJs ya que determinan el anclaje al citoesqueleto de actina. La organización espacial próxima de las proteínas que abarcan a las AJs y TJs indican que ambos tipos de unión contribuyen a la BHE humana (Vorbrodt y Dobrogowska, 2004). Por otra parte, existe evidencia de que ZO-1 y cateninas cooperan, lo que sugiere que las TJs y AJs trabajan en conjunto (Matter y Balda, 2003).



Representación esquemática de una sección transversal de un capilar del CNS y los complejos presentes en las TJs entre CE. Las CE y pericitos están rodeados por una membrana compuesta de colágeno tipo IV, laminina, fibronectina y el proteoglicano heparina sulfato. Las TJs incluyen dos clases de moléculas transmembranales (occludinas y claudinas), que interactúan con proteínas de membrana en CE adyacentes. Las colas citoplasmáticas de los complejos ocludina y claudina están ligadas con el citoesqueleto de actina a través de un número de proteínas accesorias, incluidos los miembros de la familia de zonula ocludens, ZO-1, ZO-2 y ZO-3.

2.10.5 EL CITOESQUELETO

El citoesqueleto de las CE cerebrales juega un rol central en el establecimiento y organización de las TJs. El citoesqueleto está compuesto por tres elementos primarios: microfilamentos de actina, filamentos intermedios y microtúbulos. Si bien todos juegan un rol en el mantenimiento de las TJs de la BHE cabe destacar el papel de los filamentos de actina. Estos se encuentran focalmente conectados con múltiples proteínas de adhesión de membrana, como las ocludinas, caderinas, cateninas, componentes del glicocáliz y las proteínas funcionales intercelulares como las ZOs. (Tao y col., 1996; Small y col., 1999). Bandas radiales de F-actina, TJs y AJs se ensamblan para formar una estructura denominada "cinturón de adhesión rico en actina" (Tao y col., 1996; Harzheim y col., 2004; Small y col., 1999).

La noción de que los filamentos de actina cumplen un rol en la integridad de las TJs, y por tanto en la permeabilidad de la barrera surgen de experimentos en donde sustancias que perturban la actina Citochalasina D, citoquinas y faloidina, alteran la estructura de de las TJs y su función (Bentzel y *col.*, 1976; Stevenson y Begg, 1994). En este sentido, el pretratamiento de las células con drogas despolimerizante de F-actina sugieren un rol de la actina en el mantenimiento de las TJs (Meza y *col.*, 1980; Madara, 1987). De hecho, estas drogas han mostrado la inhibición del rearreglo de ZO-1 (Van Itallie y *col.*, 1995). Además, en un modelo de daño inflamatorio, Huber y *col.*, reportaron en ensayos de inmunoprecipitación que ZO-1 estaba menos asociada a la actina, sugiriendo una interrupción entre el complejo de uniones ocluyentes y el citoesqueleto (Huber y *col.*, 2002). Estos datos determinan que el citoesqueleto endotelial cumple una función crítica en la permeabilidad de la BHE.

Asimismo, el aumento de la permeabilidad endotelial se asoció con una redistribución de la actina y de las TJs ocludina, ZO-1, ZO-2 pasando de una disposición en la membrana a una disposición citosólica.

2.11 FACTORES QUE ALTERAN LA INTEGRIDAD DE LA BHE

Dependiendo de la patología, una variedad de factores pueden alterar la permeabilidad de la BHE estos incluyen grupos de agentes vasogénicos como la histamina, sustancia P, bradiquinina y factores de crecimiento como el factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF) y el factor básico de crecimiento de fibroblasto (bFGF). Además, un grupo importante de mediadores inflamatorios han revelado alterar la integridad endotelial, como factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α), interleuquina 1 (IL-1), interferón gamma (INF- γ), quimioquinas como (CCL2 y CXCL8); y especies reactivas de nitrógeno y de oxígeno (Argaw y *col.*, 2006; Dohgu y *col.*, 2004; Lum y Roebuck, 2001; Narushima y *col.*, 1999; Reuss y *col.*, 2003; Stamatovic y *col.*, 2005; Tsao y *col.*, 2001).

Es relevante mencionar que muchos de estos factores son liberados por ASTs en forma local, aunque sus consecuencias pueden alcanzar las células inmune circulante. Los leucocitos periféricos también son capaces de inducir la desregulación de la barrera. En este sentido se observó que la interacción de

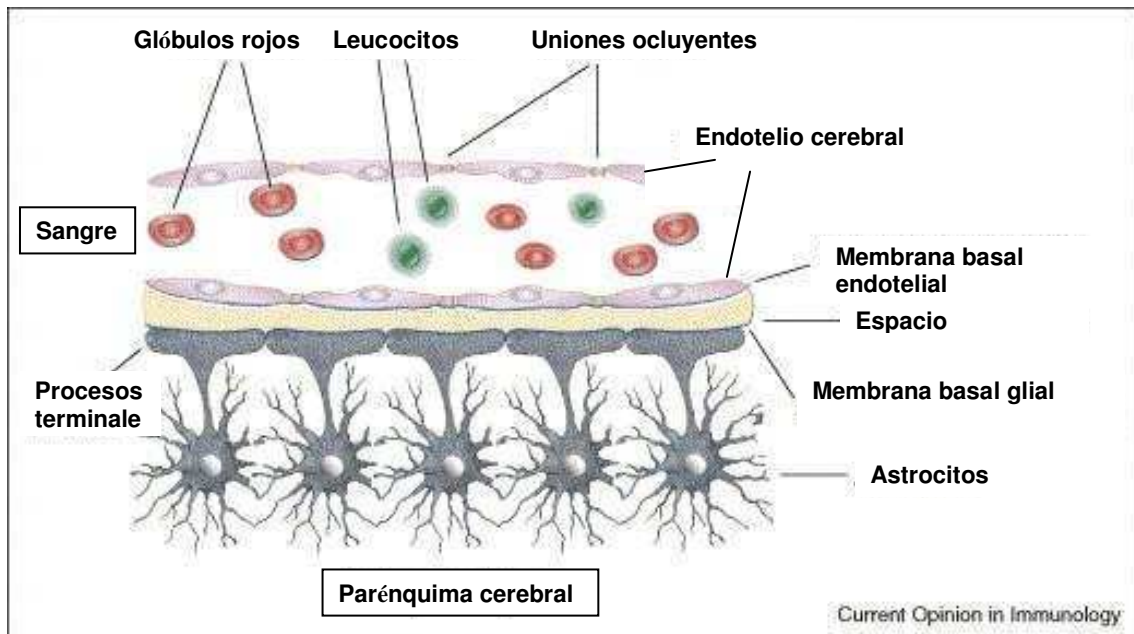
leucocitos con las CEs cerebrales causa un aumento de la permeabilidad (Lee y col., 2006; Mackic y col., 1998; Brown y col., 2004; Alvarez y Teale, 2006).

Por último agentes microbianos o sus componentes también pueden alterar la función de la barrera, viéndose afectada por tanto su impermeabilidad.

A pesar de la extensa investigación, aun existen numerosas controversias sobre cómo la mayoría de estos factores afectan la BHE. Algunos de estos factores parecen afectar exclusivamente la permeabilidad paracelular como la IL-1 y la CXCL8, mientras que otros, por el contrario, actúan aumentando la permeabilidad transcelular, como es el caso del TNF- α (Abbott, 2000).

Cabe destacar que la duración de la ruptura de la BHE es variable y difiere según el mediador involucrado. Por ejemplo la histamina puede causar una interrupción de la función de la barrera transitoria relacionada al aumento de calcio en el citoplasma de las CEs, mientras que agentes como la trombina causan un aumento de la permeabilidad prolongado relacionado a los cambios robustos en el citoesqueleto (van Hinsbergh y van Nieuw Amerongen, 2002).

La ruptura más sostenida de la barrera esta asociada con el rango de la condición inflamatoria que afecta al SNC. Ya sea que la inflamación sea primaria, como resultado de una infección (meningitis, HIV), o debida a un desorden autoinmune (esclerosis múltiple) o bien secundaria (sucede seguida de un infarto o de un trauma cerebral), es claro que la ruptura de la barrera esta asociada a diversos cambios en el fenotipo de las CEs (fenotipo inflamatorio), a la alteración de la organización o expresión de las moléculas de las TJs y al progresivo aumento de la infiltración leucocitaria.



La BHE está compuesta por venas parenquimales que presentan uniones interendoteliales estrechas (uniones ocluyentes). Las CE están asociadas a la membrana basal. Las membranas basal endotelial y glial delimitan el espacio perivascular. En condiciones normales, la BHE está intacta y en general las células de la circulación periférica no ingresan al tejido cerebral. En estados patológicos cuando la BHE es interrumpida células inmunes penetran el parénquima del SNC.

2.12 PAPEL DE LOS ASTROCITOS EN LA INDUCCIÓN DEL FENOTIPO CEREBRAL

Si bien muchas de las propiedades que caracterizan al endotelio cerebral se expresan en cierta medida en las células de los capilares periféricos, estas pueden ser incrementadas en el endotelio cerebral, a tal punto que pueden ser considerados “marcadores” de fenotipo y función de BHE. El examen anatómico de la microvasculatura cerebral muestra que los ASTs establecen un estrecho contacto con las CEs a través de prolongaciones terminales (Kacem y *col.*, 1998). Los vasos cerebrales se encuentran prácticamente en su totalidad cubiertos por las prolongaciones terminales de los ASTs.

Actualmente, se acepta que los ASTs factores solubles liberado por los ASTs son responsables del funcionamiento de la BHE mediante la inducción y mantención de estas propiedades en las CEs. Se ha reportado que son los ASTs los que establecen y regulan las propiedades a la barrera y restringen la difusión de elementos y sustancias de la sangre. De hecho, estas

características restrictivas no son inherentes a las células endoteliales cerebrales, ya que son inducidas por factores solubles liberados por los ASTs (Stewart y Wiley, 1981). Esta respuesta de las CEs ha sido demostrada en numerosos estudios *in vivo* y se ejemplifican por aquellos estudios en los que se muestran que ASTs transplantados inducen propiedades de BHE aun en CEs vasculares de origen no neural (Janzer y Raff, 1987; Tout *y col.*, 1993). Se ha comprobado que el medio condicionado de ASTs (MC-ASTs) es capaz de inducir muchas de las propiedades de la BHE en CEs primarias o líneas establecidas sean o no de origen cerebral. En este sentido, se ha reportado *in vitro*, que los ASTs pueden conferir características de BHE a células endoteliales no cerebrales (Stewart y Wiley, 1981; Maxwell *y col.*, 1987). En particular, se ha observado que el MC-ASTs de rata o bien de gliomas de rata (C6) es capaz de inducir un fenotipo cerebral en células endoteliales primarias o líneas establecidas obtenidas a partir de venas de cordón umbilical humano (HUVEC) (Hurst y Fritz, 1996; Kuchler-Bopp *y col.*, 1999).

La naturaleza química de estas señales inductivas secretadas por ASTs no está del todo definida, si bien se han encontrado diversos candidatos, las evidencias sugieren que diferentes agentes regularían diferentes aspectos del fenotipo de la BHE. En este sentido el factor de crecimiento TGF- β , bFGF e IL-6 pueden cada uno inducir aspectos particulares.

2.13 ASTROCITOS EN LA INFLAMACIÓN

2.13.1 ACTIVACIÓN

Los insultos cerebrales producen una reacción astrocitaria específica denominada astrogliosis reactiva. Los ASTs se activan, observándose un aumento de la proteína fibrilar ácida glial (GFAP). La astrogliosis es una reacción defensiva que resulta instrumental en la limitación de las áreas del cerebro dañadas (formando una cicatriz glial) y posteriormente el remodelado de los circuitos neuronales (Pekny y Nilsson, 2005). La activación de los ASTs se produce en respuesta a todo tipo de injuria al SNC. Por lo tanto, los ASTs actúan como microsensors de microambiente dañado independientemente de su localización en el SNC. La inmensa variedad de insultos a la que responden

sugiere que factores de injuria comunes serían responsables de disparar esta respuesta celular. En respuesta a este hecho en los últimos años se ha propuesto que citoquinas inflamatorias y quimioquinas actuarían como estímulos de esta reacción. La performance de los ASTs en condiciones patológicas determina la sobrevivencia del parénquima cerebral, el grado de daño y los defectos neurológicos. De modo que, la respuesta astrocitaria es dual y puede proveer defensa o destrucción del tejido neuronal. (Nedergaard y Dirnagl, 2005; Rossi *y col.*, 2007).

2.13.2 RESPUESTA INFLAMATORIA

Ante la injuria al SNC, la glia residente se activa, produce una respuesta inflamatoria y la consecuente expresión de moléculas inflamatorias puede cumplir un papel determinante en la neurodegeneración. Al respecto el TNF- α , el ON y quimioquinas son considerados factores etiológicos de diversas afecciones del SNC y enfermedades neurológicas (Fillit *y col.*, 1991; Merrill, 1992; Mogi *y col.*, 1996; Mogi *y col.*, 1994).

Estudios *in vitro* han mostrado que la activación astrocitaria en respuesta a estímulos inflamatorios resulta en la liberación de mediadores inflamatorios que inducen toxicidad neuronal (Deshpande *y col.*, 2005). Por otro lado, los ASTs activados pueden liberar mediadores inflamatorios como el ON, TNF- α que alteran la permeabilidad del endotelio cerebral (Zhang *y col.*, 2000).

2.13.3 PRODUCCIÓN DE QUIMIOQUINAS

La presencia de quimioquinas unidas a los receptores de las CEs cerebrales (Zach *y col.*, 1997) sugiere que quimioquinas producidas localmente por los ASTs perivasculares pueden difundir o bien, ser transportadas hacia la superficie de las CEs donde son inmovilizadas para su presentación a los leucocitos. Este proceso ha sido demostrado en la periferia para la IL-8 (Middleton *y col.*, 1997).

Por último, la respuesta inflamatoria astrocitaria puede a su vez generar una respuesta inflamatoria en las CEs de la barrera. En este sentido, se ha demostrado que en respuesta a citoquinas inflamatorias derivados de células

gliales, las CEs aumentan la expresión de quimioquinas (Shukaliak y Dorovini-Zis, 2000; Prat *y col.*, 2000). Además, quimioquinas derivadas de ASTs son capaces de estimular el sistema inmune periférico y promover la migración de leucocitos hacia el parénquima cerebral (Wang *y col.*, 2000).

2.13.4 FORMACIÓN DE LA CICATRIZ GLIAL

La capacidad de las células para migrar en general y, en particular para el caso de la migración de ASTs hacia el sitio de una lesión, refleja sus propiedades intrínsecas, así como interacción con el medio extracelular del nervio, incluyendo componentes asociados con la reacción inflamatoria local.

En el cerebro adulto, la migración de los ASTs se produce en respuesta a un trauma cerebral. Ellos migran hacia la región del cerebro dañada y posteriormente proliferan en el tejido cerebral que rodea la misma.

En mamíferos, la cicatriz glial tiene propiedades beneficiosas, así como nocivas: es una señal para la reparación de la barrera hematoencefálica, inhibe la entrada de células inflamatorias en el cerebro dañado y limita la muerte neuronal (Faulkner *y col.*, 2004; Bush *y col.*, 1999), pero también deteriora la regeneración axonal y la incorporación de injertos neuronales (McGraw *y col.*, 2001). Tras un foco de lesión en el SNC, un subconjunto de precursores astrogliales a lo largo del cerebro experimentan cambios morfológicos para producir astroglia reactiva y mitosis, con el fin de migrar hacia la lesión y organizar una densa cicatriz glial (Hampton *y col.*, 2004; Rhodes *y col.*, 2003; Zhou *y col.*, 1986). La migración de astroglia reactiva es un componente importante de la formación de la cicatriz glial alrededor del cerebro dañado.

2.14 EL ENDOTELIO CEREBRAL EN LA INFLAMACIÓN

El microambiente cerebral es un sitio inmuno-privilegiado, en los que, de manera muy regulada, circulan linfocitos “monitoreando” el SNC. Sin embargo, esto no excluye la capacidad de las CEs de alcanzar el parénquima en condiciones patológicas. Muchos de los procesos que resultan beneficiosos en el monitoreo resultan ser los mismos queque inician y/o potencian los efectos adversos de las reacciones inflamatorias (Hickey, 2001). Las CEs cerebrales

están comprometidas con los procesos inflamatorios en virtud de su capacidad de expresar moléculas de adhesión, quimioquinas y citoquinas. Además representan el punto de paso de las células inmunes desde la sangre hacia el ambiente cerebral.

2.14.1 EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

La interacción de leucocitos con el endotelio es un proceso secuencial de varios pasos que involucra el *rolling* de leucocitos sobre el endotelio mediante moléculas de adhesión que concluyen en la adhesión firme. Estos procesos están mediados por la interacción entre las moléculas de adhesión de la familia de las selectinas (E-selectina y P-selectina) y de la familia de las inmunoglobulinas (ICAM-1, VCAM-1) expresadas en la superficie de las CEs, y sus ligandos expresados por los leucocitos. En condiciones normales los niveles de expresión de estas moléculas son relativamente bajos, permitiendo sólo a un número reducido de células inmunes cruzar hacia el SNC (Hickey, 2001). Sin embargo, en condiciones patológicas y en particular en situaciones inflamatorias inducen un incremento en la expresión de estas moléculas de adhesión. En particular, los niveles de ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina pueden ser inducidos en el endotelio cerebral hasta 15 veces en respuesta a INF- γ , TNF- α e IL-1 (Wong y Dorovini-Zis, 1996; Wong y Dorovini-Zis, 1992).

Las moléculas que están involucradas en este proceso pertenecen a la familia de las Selectinas como la E-selectina (Alon y *col.*, 1994; Ley y *col.*, 1995; Lawrence y Springer, 1993; Abbassi y *col.*, 1993) y son expresadas por el endotelio tras la activación inducida por estímulos inflamatorios. La posterior adhesión firme del leucocito al endotelio implica la interacción de los receptores de integrina en los leucocitos con ligandos específicos en la superficie endotelial, entre ellas se encuentra ICAM-1 y VCAM-1 (Brady, 1994; Wuthrich, 1992).

El endotelio de los vasos cerebrales juega un rol importante en la entrada de células inflamatorias al cerebro. El aumento en el tráfico de neutrófilos hacia el SNC ha sido descrito en diversas enfermedades que afectan al SNC así como en distintos modelos de injuria. En particular el influjo

de PMN resulta un evento temprano y crucial en las patologías de inflamación del SNC, anoxia/isquemia y trauma.

2.14.2 PRODUCCIÓN DE QUIMIOQUINAS

Las quimioquinas constituyen importantes mediadores del reclutamiento leucocitario. Tras la activación endotelial por diversos estímulos, que incluyen mediadores inflamatorios, las CEs cerebrales producen quimioquinas que contribuyen a los procesos inflamatorios del SNC promoviendo la trans migración de células inmunes hacia el cerebro a través de la normalmente restrictiva BHE (Prat *y col.*, 2002; Liu y Dorovini-Zis, 2009). Numerosos estudios han determinado que este fenómeno se relaciona con la alteración de la integridad de la barrera.

2.15 FISIOPATOLOGÍA DEL SUH EN EL SISTEMA NERVIOSO

Las complicaciones afectando al sistema nervioso central (SNC) son determinantes importantes de la morbilidad y mortalidad en la fase aguda de las infecciones por STEC y constituyen el factor de riesgo más severo entre la mortalidad infantil (Eriksson *y col.*, 2001; Oakes *y col.*, 2006). La mortalidad en la etapa aguda es menor del 5% de los niños afectados en Argentina con la forma epidémica de SUH desde 1978 (Repetto, 2005).

Los signos más comunes de compromiso del SNC severo incluyen hemiplejía, ceguera, alucinaciones, alteraciones de la conciencia. Las complicaciones neurológicas en los pacientes que sufren de coma, hemiplejía, temblores y convulsiones, entre otros, incluyen desórdenes en el ganglio basal (Barnett *y col.*, 1995), un área que regula la iniciación del movimiento (Steinborn *y col.*, 2004). Los estudios de tomografía computarizada pueden mostrar anomalías que revelan edema cerebral difuso, infarto de los grandes vasos, infartos pequeños difusos y hemorragias múltiples (Gallo y Gianantonio, 1995; Siegler, 1994). Más aún, material de autopsia en pacientes con SUH reveló trombosis de capilares en cerebro similares a los que se observan en riñón (Rasoulpour *y col.*, 1985).

Por otro lado, se ha reportado en casos clínicos que los análisis de presión sanguínea, y parámetros metabólicos al momento de admisión de los pacientes no predicen qué niño puede desarrollar alteraciones nerviosas. Sin embargo, durante el curso de la enfermedad, los niños con disfunción nerviosa presentan concentraciones mínima de sodio sérico más baja, y azotemia más graves y fueron más propensos a requerir diálisis que los niños sin signos de alteración en el SNC (Bale y *col.*, 1980).

Los modelos utilizados en el estudio de encefalopatías causadas por Stx incluyen infecciones con cepas productoras de toxina (Fujii y *col.*, 1994);(Tzipori y *col.*, 1988), vías de administración sistémica de la toxina: intragástrica (Fujii y *col.*, 1994; Fujii y *col.*, 1996) o endovenosa (Fujii y *col.*, 1996); (Mizuguchi y *col.*, 1996; Yamada y *col.*, 1999), o administración intracerebral (Goldstein y *col.*, 2007). La infección con STEC en cerdos, desarrolló complicaciones en el SNC y mostró daño vascular e infartos cerebrales que representaban lo observado en pacientes (Tzipori y *col.*, 1988). Los primeros estudios realizados en conejo, por resonancia magnética de imágenes, mostraron lesiones al SNC luego de la administración endovenosa de la Stx2 (Fujii y *col.*, 1996). Si bien las lesiones pudieron ser registradas por esta metodología, la acción celular de la toxina y su distribución topográfica no pudo ser determinada. Sin embargo, estudios posteriores tras la administración intraperitoneal en ratones han logrado localizar la toxina y/o su receptor en neuronas (Obata y *col.*, 2008) y recientemente también en ASTs (Goldstein y *col.*, 2007) tras la administración intracerebral.

La patogénesis del deterioro del SNC aún no ha sido comprendida plenamente. En lo referente al origen de la patogénesis causada por Stx en el SNC, las opiniones son diversas. Ciertos autores atribuyen a los desórdenes sistémicos proinflamatorios (aumento de TNF- α , IL-1 β , etc.) En este sentido, se ha propuesto que la propagación de la trombosis microvascular causado por los efectos combinados de LPS, citoquinas, y el aumento en tensión arterial y la toxina jugaría un papel importante en el desarrollo de la disfunción del sistema nervioso central (Takagi y Naruse, 1997). Por otro lado, otros autores han sugerido que la patogénesis en SUH es secundario a cambios metabólicos: hiponatremia, uremia, trastornos de la hidratación o la hipertensión (Gallo y Gianantonio, 1995; Siegler, 1994). Otros sustentan que se produce por las

afecciones originadas en la microvasculatura cerebral por Stx (Mizuguchi *y col.*, 1996; Yamada *y col.*, 1999; Taylor *y col.*, 1999);(Ergonul *y col.*, 2003). Finalmente algunos estudios proponen que es la acción directa de la toxina sobre las neuronas (Obata *y col.*, 2008);(Goldstein *y col.*, 2007) En lo referente al efecto de Stx2 sobre células neuronales y células gliales, estudios donde se realizó una administración intracerebroventricular de la toxina determinaron que ambas sufren las consecuencias tóxicas de las mismas (Goldstein *y col.*, 2007)(Boccoli *y col.*, 2008).

Cualquiera sea el origen, lo que resulta claro es que la alteración y/o incremento en la permeabilidad de la BHE, consecuente al daño de las CEs cerebrales, son eventos centrales durante la fase aguda del SUH (Zoja *y col.*, 1992). Estudios clínicos han determinado un incremento de proteínas en el líquido cerebro-espinal (Sheth *y col.*, 1986). Así mismo, numerosos estudios animales han evidenciado que Stx es capaz de alterar la función de la BHE e inducir un incremento en la permeabilidad de la BHE. La Stx es una macromolécula y como tal, en condiciones normales, no debería ser capaz de ingresar al parénquima cerebral. Sin embargo, estudios en modelos animales han demostrado que la toxina atraviesa la barrera (Fujii *y col.*, 1996; Fujii *y col.*, 1994; Goldstein *y col.*, 2007).

Sin embargo, un interrogante sin elucidar constituye el rol que cumplen los agentes inflamatorios localizados en el SNC. Existen evidencias sobre la participación de las citoquinas TNF- α y la IL-1 β en la acción de Stx sobre el SNC. El tratamiento con TNF- α de células endotelio-cerebrales humanas produce un aumento de la inhibición de la síntesis proteica provocada por la toxina y un aumento en la toxicidad mediada por Stx (Eisenhauer *y col.*, 2004). Además, la producción local de TNF- α fue encontrada en cerebros de ratones luego de la infección con STEC, aunque la fuente celular no fue determinada (Okayama *y col.*, 2004).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Evaluación de los efectos de Stx1 sobre ASTs

3.1.1 Estudios de la reacción astrocitaria e interacción con Stx1

3.1.1.1 Preparación de la Stx.

La Stx1 fue provista por el Dr. Sugiyama Junichi de Denka Seiken CO Ltd. (Nigata, Japan). La pureza fue determinada por el proveedor mostrando un sólo pico por HPLC. La preparación de ambas variantes de la toxina fue analizada para determinar contaminación con endotoxina (LPS) por el ensayo de "Limulus amoebocyte lysate", por el cual 1 IU/ml es igual a 0.1 ng/ml de LPS estándar de E. coli (Duner, 1993). Los resultados de este ensayo determinaron que la preparación de toxina utilizada para los experimentos contenía menos de 40 pg LPS/ug de proteína de Stx.

3.1.1.2 Obtención de cultivos primarios de ASTs.

Cultivos primarios de ASTs fueron obtenidos como describe McCarthy y De Vellis (McCarthy and de Vellis, 1980) . Hemisferios cerebrales de embriones de ratas fueron disecados. Las meninges fueron descartadas, y los córtex fueron disociados suavemente por pipeteo en una mezcla de DMEM y Ham's F12 (1:1 v/v) (GIBCO, Invitrogen, Argentina) con 5 µg/ml de estreptomicina, 5 U/ml penicilina, y suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, GIBCO). La suspensión celular fue sembrada en botellas de cultivo (Corning, New York, NY) cubierta con poli-L-lisina, Luego de 14 días de cultivo, la microglía y los oligodendrocitos fueron eliminados mediante agitación continua de las botellas por 24 horas en un agitador orbital a 240 rpm/min. Para asegurar la total remoción de microglía y los oligodendrocitos, la agitación fue repetida tres veces más cada uno o dos días. Las células adheridas recolectadas mediante tratamiento con un 0,25 % y 0,02 % de tripsina EDTA durante 1 minuto, y luego de neutralizar la tripsina con SFB las células fueron resuspendidas en medio DMEM (GIBCO) con 5 µg/ml de estreptomicina, 5 U/ml penicilina, y

suplementado con 10% de SFB y sembradas a subconfluencia ($0,8 \times 10^6$ células por well) en placas de cultivo (Corning) de 24 wells o sobre cubreobjetos (según los experimentos) por 24 hs. antes utilizarlas. La pureza de los ASTS fue evaluada por citometría de flujo utilizando anticuerpo contra marcador astrocitario anti-GFAP. (Pureza de 90-95% células positivas para el marcador astrocitario GFAP).

3.1.1.3 Cultivos y tratamientos de ASTs.

Cultivos primarios de ASTs fueron levantados por tratamiento con Tripsina – EDTA y luego de inactivar con SFB la tripsina fueron lavados y sembrados en placas de 24 wells (7×10^4) en DMEM suplementado con 10% de SFB y $5 \mu\text{g/ml}$ estreptomicina y 5U/ml penicilina (medio completo). Los cultivos se mantuvieron en estufa a 37°C en atmosfera húmeda y 5% CO_2 .

Los ASTs fueron no tratados o tratados con LPS ($0.5 \mu\text{g/ml}$); Stx1 (10 ng/ml) o LPS+Stx1 (Stx1 agregada 18h luego LPS). Se utilizó LPS purificado derivado de *E. coli* O111:B4 (Sigma).

Dependiendo del experimento las células fueron recolectadas a 24, 48 o 72 hs. después del momento en que se agregó la toxina. El medio condicionado libre de células de ASTs (MC-ASTs) sin tratar (Control) o tratados (LPS, Stx1 o LPS+Stx1) fue recolectado a las 24 hs. de agregada la toxina.

Para los experimentos de inhibición del factor de transcripción NF- κ B se usó E)-3-[4-methylphenylsulfonyl]-2-propenenitril (BAY 11-7082; Biomol, Plymouth Meeting, PA, USA) un supresor irreversible de la activación del NF- κ B. $40 \mu\text{M}$ de BAY 11-7082 fue adicionado a los cultivos 30 min. antes de iniciar los tratamientos.

En los experimentos de inhibición de la actividad del TNF- α secretado por los ASTs se utilizó un receptor soluble del TNF- α (Etanercept; Enbrel, Wyeth Inc., Collegeville, PA). 5 ng/ml fue adicionado a los cultivos 10 min. antes de iniciar los tratamientos.

3.1.1.4 Análisis de muerte celular.

La muerte de ASTs fue evaluada a 24, 48 y 72 horas luego del agregado de la toxina. Se empleó un Kit comercial Annexina V-FITC (Calbiochem) el cual fue

empleado según las instrucciones. Brevemente, ASTs se incubaron durante 30 min. en oscuridad a temperatura ambiente con reactivo “binding” y Anexina V marcada con FITC(AV-FITC, 1µg/ml), Luego las células fueron lavadas y resuspendidas en Buffer “binding” y se agregó ioduro de propicio (PI, 15 µg/ml). El porcentaje de PI⁺ y PI⁻ AV⁺ fue determinado por citometría de flujo (clitómetro FACScan, Becton Dickinson) tomando la región correspondiente según tamaño y complejidad celular (forward vs. side scatter). Los análisis fueron realizados empleando los programas CellQuest (Becton Dickinson) o FCS Express (De Novo Software, Los Angeles, CA). Al menos 30 000 eventos fueron evaluados por muestra.

3.1.1.5 Expresión de la Proteína fibrilar glial ácida (GFAP).

Los niveles de expresión de GFAP fueron determinados por citometría de flujo a 24, 48 y 72 hs. luego del agregado de la toxina. Los ASTs fueron lavados previa recolección para descartar las células muertas. Los ASTs recolectados fueron fijados con una solución 2% de paraformaldehído y permeabilizados con 0.25% Tritón X100 a temperatura ambiente por 20 min. Para minimizar el pegado inespecífico de los anticuerpos las células se bloquearon (3% BSA, 0.25% Tritón X100 in PBS) durante una hora. Las muestras se incubaron durante dos horas con IgY chicken anti-GFAP (Neuromics, Edina, MN) con una dilución final 1:300 a partir del stock comercial preparada en solución de bloqueo o con el control de isotipo correspondiente.. Luego las células fueron lavadas e incubadas durante 1 h con el anticuerpo secundario correspondiente FITC- goat anti-chicken IgY (Neuromics, Edina, MN) en una dilución final de 1:250 a partir del stock comercial preparada en solución de bloqueo. La región de análisis fue establecida en la región de células GFAP positivas. Al menos 30. 000 eventos fueron evaluados por muestra.

Para estudios microscópicos la inmunomarcación se realizó siguiendo el mismo protocolo sobre ASTs crecidos en cubreobjetos.

3.1.1.6 Evaluación de la expresión del receptor de la toxina (Gb3).

La expresión en superficie del receptor Gb3 (CD77) fue evaluada por citometría de flujo en ASTs no tratados o tratados (LPS; Stx1; LPS+Stx1). El análisis se realizó a las 24 hs. luego de agregada la Stx1. Luego los ASTs fueron

recolectados y se bloqueó con 3% BSA por 20 min. y expuestos a un anticuerpo monoclonal anti-CD77 humano (dilución 1:100, Immunotech) durante 45 min. a 4°C. ASTs no estimulados fueron incubados con el isotipo correspondiente anti- humano isotipo murino IgM para usar como control negativo. Las células fueron lavadas e incubadas con un anticuerpo secundario marcado con FITC F(ab)₂ cabra anti-ratón IgM (dilución 1:250, BD Pharmingen). Finalmente las células fueron lavadas e inmediatamente analizadas por citometría de flujo.

3.1.1.7 Ensayo de unión e internalización de Stx1.

ASTs tratados por 18hs. con LPS (0,5 ug/ml) fueron no tratados o tratados con 30ng/ml de Stx1 por 30 minutos a 37C, o a 4C como control de unión sin internalización. Luego rápidamente las células y cosechadas con tripsina EDTA y lavadas con PBS frío con 10% SFB para inactivar la tripsina. Los ASTs recolectados fueron fijados con una solución 2% de paraformaldehído y permeabilizados con 0.25% Tritón X100 a temperatura ambiente por 20 min. Para minimizar el pegado inespecífico de los anticuerpos las células se bloquearon (3% BSA, 0.25% Tritón X100 in PBS) durante una hora a 4C- Las muestras fueron incubadas durante 2 hs. con un anticuerpo anti-toxina, mouse IgG1 anti-Stx1 (Toxin Technology, Sarasota, Florida, USA) en una dilución final de 1:200 del stock comercial en solución de bloqueo o con el isotipo correspondiente. Los ASTs fueron lavados con PBS e incubados con el anticuerpo secundario FITC anti-mouse (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) en una dilución final de 1:100 del stock comercial en solución de bloqueo por 40min a 4C. en oscuridad. El índice de internalización fue determinado por citometría de flujo normalizando los valores de intensidad de fluorescencia media (IFM) de los ASTs tratados a 37C (unión/internalización) respecto a los valores IFM del control de unión a 4C.

3.1.2 Estudio de la respuesta inflamatoria se ASTs

3.1.2.1 Recolección de Medio condicionado de ASTs

Los ASTs no tratados (control) o tratados según cada experimento fueron cultivados a 37°C en una atmósfera a 5% CO₂ durante 24 luego de agregada

la Stx1. Luego de este periodo, el medio condicionado de ASTs fue recolectado, centrifugado para eliminar células y restos celulares (10 min. a 6000 rpm) y guardados a -70°C hasta su uso.

3.1.2.2 Determinación de la secreción de TNF- α

Para cuantificar la actividad del TNF- α se realizó un bioensayo de citotoxicidad de L929 modificado como se describe (Shiau *et al.*, 2001). Se utilizó la línea L929 de fibroblastos murinos sensibles a la acción citotóxica del TNF- α , mantenida en crecimiento en presencia de medio completo, 2 mM de L-glutamina y 5 μ g/ml estreptomina y 5U/ml penicilina. Las células L-929 en crecimiento exponencial fueron tratadas con tripsina (0,25%-EDTA). Luego, de inactivar la tripsina con 10%de SFB, las células se lavaron. Se sembraron 2x10⁴ por well en placas de 96 pocillos a razón de 100 μ l por pocillo y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 18 hs. para permitir la formación de una monocapa de células en la superficie de cada pocillo. Luego, se agregaron 100 μ l de medio sólo (control células viables) o medio condicionado de ASTS tratados. A cada pocillo se le adicionó 1 μ g/ml de Actinomicina D. Paralelamente, se realizaron controles positivos de citotoxicidad con TNF- α de rata recombinante a partir de una concentración de 1 ng/ml de la cual se realizaron diluciones seriadas 1:2. Cada condición se evaluó por triplicado. Las placas fueron incubadas durante 24 hs a 37°C y 5% de CO₂. Transcurrido ese tiempo, se removieron las muestras, las células muertas fueron eliminadas por lavado y se tiñeron las monocapas con Violeta de Genciana 0,2 % en metanol 20%. Las placas se incubaron durante 10 min. a temperatura ambiente en presencia del colorante. El exceso de colorante se eliminó por repetidos lavados con agua. Posteriormente, las células teñidas se despegaron por el agregado de 50 μ l de ácido acético 33% y una leve agitación. Finalmente, la absorbancia de las placas se leyeron a 550 nm en un espectrofotómetro (Organon Tecnika, Argentina). El TNF- α bioactivo fue expresado como porcentaje de citotoxicidad de L929. El % de citotoxicidad L929 fue calculado según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Citotoxicidad L929} = 100 \times (\text{Abs de 100\% células viables control} - \text{abs medio de ASTs tratados}) / (\text{Abs de 100\% células viables en control}).$$

3.1.2.3 Determinación de óxido nítrico (NO)

Para cuantificar la producción de NO se utiliza la concentración de los aniones derivados del NO, nitrito y nitrato (NO_2^- y NO_3^-) en el medio condicionado de ASTs no tratados o tratados (LPS, Stx1, LPS+Stx1) recolectados 24hs. luego del agregado de la toxina. Para ello se utilizó la reacción de Griess que determina la cantidad total de NO basado en la conversión enzimática de nitrato a nitrito por la acción de la nitrito-reductasa. Brevemente, 50 μl de las muestras de ASTs se mezclaron con 50 μl de reactivo de Griess (1% sulfanilamid/0.1% ácido naftiletileno diamino dihidroclorido 2% fosfórico) en placa de 96 *wells*. El producto de esta reacción se detectó colorimétricamente a 540 nm utilizando la reacción de Griess NaNO_2 fue utilizado para hacer una curva de concentración *standard* para calcular la concentración de NO en las muestras. La absorbancia a 540 fue leída en un lector de placa.

3.1.2.4 Ensayo de quimiotáxis de PMN

La quimiotáxis de PMN fue cuantificada por una técnica modificada en cámara Boyden (5). Una suspensión (50 μl) de 2×10^6 PMN /ml in DMEM con 0.5% BSA fue sembrada en la parte superior de una cámara de quimiotaxis de 48 *wells*. Una membrana de policarbonato libre de PVP (tamaño de poro 3 μm ; Neuro Probe Inc.) separa los PMN de los *wells* inferior que contienen o bien DMEM solo o el medio condicionado de ASTs por triplicado. La cámara fue incubada 90 min. a 37°C in atmosfera húmeda 5% CO_2 para permitir la migración de PMN. Luego de la incubación el la membrana fue enjuagada para retirar PMN superiores y teñida con (Biopur SRL, Argentina) y el número de PMN en la superficie inferior de la membrana (PMN migrados) fue cuantificada por microscopio en 5 campos elegidos al azar, a un aumento x400 en aceite de inmersión.

3.1.3 Estudio de la interacción de ASTs con PMN

3.1.3.1 Obtención de PMN de rata.

PMN fueron aislados a partir de sangre heparinizada de ratas adultas obtenidas por punción cardíaca previa anestesia de los animales. La sangre fue diluida al medio con solución fisiológica y sembrada sobre una solución de Ficoll - Triosom formando un sistema bifásico, el cual fue centrifugado a 350 x g durante 30 min. a 4°C. Luego de la centrifugación, se obtuvo una interfase conteniendo las células mononucleares periféricas y un sedimento de eritrocitos y granulocitos. Este último fue diluido al medio con solución fisiológica. Luego se agregó dextrán al 6%, en una proporción de tres volúmenes de suspensión celular diluida a un volumen de dextrán. Se dejó sedimentar durante 30 min. a temperatura ambiente, se retiró el sobrenadante rico en granulocitos y se lavó con solución fisiológica. Los eritrocitos contaminantes fueron eliminados por shock osmótico con agua bidestilada durante 1 min. a 4°C, restituyendo inmediatamente la isotonicidad. Las preparaciones contuvieron más de 94% de granulocitos, de los cuales el 95-98% fueron PMN. Las células fueron resuspendidas en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de SFB y con 5 µg/ml de estreptomicina, 5 U/ml penicilina. La viabilidad fue determinada utilizando el colorante de exclusión Azul de Trypan y la pureza fue determinada por tinción de los núcleos con colorante de Turk's. Solo las fracciones con una pureza mayor a 85 % fueron utilizadas en los experimentos.

3.1.3.2 Ensayo de adhesión y citotoxicidad por PMN

PMN purificados se sembraron sobre ASTs tratados en una relación PMN / AST de 1:20 y se cultivaron por 3 hs. para la adhesión u 8 hs para el análisis de la citotoxicidad de ASTs. Los PMN no adherentes fueron cuidadosamente retirados de las placas y las células adheridas se lavaron y se tiñen con May Grunwald-Giemsa. Tres campos por tratamiento elegidos al azar fueron fotografiados (Nikon, la cámara digital Coolpix 4500) bajo un aumento de X600 (Nikon, Eclipse TE2000-S, microscopio invertido). El número de adherentes PMN (para la adhesión de ensayo) o el número de ASTs remanentes (para el ensayo de citotoxicidad mediada por PMN) en cada fotografía se contaron utilizando el software ImageJ (EE.UU. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland). Número de ASTs con PMN adheridos se cuantifico en tres campos microscópicos elegidos al azar se anotó en tres campos seleccionados al azar

microscopio (~ 50 ASTs, n = 3). Los datos se agruparon como el número de ASTs con <3, 3 a 6 o > 7 PMN adheridos. Análisis estratificado de distribución de estos datos se utilizan para el análisis estadístico.

El porcentaje de citotoxicidad de ASTs mediada PMN fue calculado como:
% Citotoxicidad= $100 - [(\text{Num. ASTs tratados} / \text{Num. ASTs sin tratar}) \times 100]$.

3.1.4 Estudio de la función Astrocitaria

3.1.4.1 Ensayo de lesión y cicatrización.

ASTs fueron sembrados en cubre objetos puestos en una placa de 24 *wells* y mantenidos en medio completo hasta que llegaron a confluencia (de 24-48 hs). Luego fueron tratados con LPS y/o Stx1. Transcurridas 24 hs. después de agregada la toxina, se produjo una herida en las monocapas confluentes, pasando cuidadosamente una aguja estéril por el cultivo de modo de conseguir una herida lineal libre de células. Para conservar durante todo el ensayo el estímulo y los factores astrocitarios secretados, los MC-ASTs fueron recolectados y centrifugados descartando las células sueltas producto del uso de la aguja. Antes de volver a sembrar los MC-ASTs, las monocapas lesionadas fueron asegurando remover todas las células no adheridas que pudieran interferir con la evaluación de la migración. Solo se emplearon los cultivos en donde las heridas fueran comparables. A las 72 hs. los cultivos fueron fijados y se realizó una inmunomarcación con anticuerpo contra GFAP para evaluar mediante inmunofluorescencia la repoblación de la lesión. La migración de ASTs hacia la herida fue determinada microscópicamente. Para estimar el grado de cierre de la herida se tomaron microfotografías a lo largo de la herida y se trazaron dos líneas paralelas arbitrarias que mejor ajustan a la cicatriz de los ASTs sin tratar (control), y las mismas fueron colocadas en las zonas donde ocurrieron las lesiones en las microfotografías de los ASTs tratados y utilizadas como referencia para comparar la capacidad de ASTs de repoblar de la lesión

3.1.4.2 Evaluación de la proliferación celular

La proliferación de ASTs se termino mediante el ensayo de incorporación de timidina tritiada (20 Ci/mmol) a lo largo del tiempo (24, 48 y 72 hs.). Para ello

los cultivos fueron pulsados por un período de 18 hs con timidina tritiada, luego de los cuales tras lisar las células con agua, los núcleos celulares son retenidos por filtración de papel de fibra de vidrio (Whatmann). La timidina radioactiva incorporada al ADN fue cuantificada en contador de centelleo líquido

3.2 Evaluación de los efectos de factores astrocitarios inducidos por Stx1 en células endoteliales de fenotipo cerebral

3.2.1 Obtención y cultivo de células endoteliales

3.2.1.1 Obtención de células endoteliales primarias de cordón umbilical

Las células endoteliales fueron obtenidas a partir de la vena de cordones umbilicales (HUVEC) por digestión enzimática con colagenasa según el método descrito por Jaffe y colaboradores. (Jaffe *et al.*, 1973). Los cultivos primarios de HUVEC crecieron hasta llegar a confluencia en frascos de cultivo de 25 cm² cubiertos con gelatina 2 % (m/v) y en medio RPMI 1640 suplementado con SFB (10%), heparina (90 ug/ml), suplemento de crecimiento para células endoteliales (50 ug/ml), piruvato (1 mM), glutamina (2 mM), penicilina (100 UI/ml), estreptomocina (50 ug/ml), pH 7.4, en estufa con ambiente húmedo, 5 % de CO₂ a 37°C . Las células fueron identificadas por su morfología y por marcación con anticuerpo anticuerpos anti-FvW por inmunocitoquímica.

3.2.1.2 Pasaje de las células HUVEC

Las células endoteliales fueron despegadas de la monocapa con una solución 0.25% tripsina-0.02% EDTA. Luego de inactivar la enzima con una solución PBS/SFB 10% se pasaron a placas de cultivo en monocapas subconfluentes. Para los ensayos se utilizaron HUVEC de entre 1 y 3pasajes

3.2.2 Obtención de células endoteliales con fenotipo de endotelio cerebral.

3.2.2.1 Preparación de MC-ASTs para diferenciación de HUVEC.

Para obtener el MC-ASTs para inducir un fenotipo cerebral en las HUVEC y obtener células diferenciadas que representen las células endoteliales constituyentes de la BHE (HUVECd) los ASTs fueron crecidos en DMEM suplementado con 10% de SFB y 5µg/ml estreptomicina y 5U/ml penicilina en botellas de cultivo de 75 cm hasta alcanzar confluencia. Luego, cada 48 hs el medio de estos cultivos (Mc-ASTs) fue recolectado y remplazado por medio completos fresco. El MC-ASTs fue centrifugado para eliminar células y restos celulares y esterilizados por filtración. El MC-ASTs fue dividido en volúmenes pequeños y mantenidos a -70°C hasta su uso.

3.2.2.2 Inducción del fenotipo cerebral en HUVEC

Para inducir el fenotipo cerebral en HUVEC (HUVEC diferenciadas, HUVECd) las células fueron sembradas y mantenidas en DMEM suplementado con 10% de SFB y 5µg/ml estreptomicina y 5U/ml penicilina durante 24 hs. para alcanzar confluencia de trabajo. Luego el medio de cultivo fue reemplazado por medio condicionado de ASTs. A las 24 hs. ya se expresaban propiedades presentes en los endotelios cerebrales.

3.2.2.3 Obtención de MC-ASTs tratados para ensayos celulares

Los ASTs fueron no tratados o tratados con LPS (0.5 µg/ml), Stx1 (10 ng/ml) o LPS+Stx1 (Stx1 agregada 18h luego LPS) y cultivados a 37°C en una atmósfera a 5% CO₂ durante 24 luego de agregada la Stx1. Luego de este periodo, el medio condicionado de ASTs tratados con LPS (MC-LPS), Stx1 (MC-Stx1) o LPS+Stx1 (MC-LPS+Stx1) fue recolectado, centrifugados para elimina células y restos celulares y guardados a -70°C hasta su uso.

Antes de utilizar los MC-ASTs para evaluar los efectos de factores solubles derivados de ASTs tratados sobre HUVECd, PMN o plaquetas se adicionó a los distintos MC-ASTs polimixina (Px) en una concentración final de 7 µg/ml y anticuerpo anti-Stx (dilución final 1:100, Sigma). De este modo se bloquean los efectos del LPS o de Stx1 respectivamente que pudieran quedar remanentes en los MC-ASTs de ASTs luego del tratamiento y así asegurar que los efectos

inducidos en HUVECd se deban exclusivamente a los factores solubles de ASTs.

3.2.3 Estudios del fenotipo cerebral en HUVECd

3.2.3.1 Determinación de la actividad fosfatasa alcalina endotelial.

Células HUVEC fueron cultivadas durante 24 hs. en medio DMEM con 5 µg/ml de estreptomicina, 5 U/ml penicilina, y suplementado con 10% de SFB

La actividad de la fosfatasa alcalina en HUVEC y HUVECd fue determinada siguiendo el protocolo descrito por Meyer y colegas (Meyer y col., 1990). La actividad enzimática de la FAN fue evaluada utilizando como sustrato p-nitrofenyl fosfato (Sigma) en un buffer 1 mM MgCl₂ en 100 mM 2-amino-2-methyl-1-propanol durante 1 h. La actividad fue monitoreada a 450nm.

3.2.3.2 Evaluación de la expresión y distribución celular de ZO-1

La expresión de ZO-1 fue determinada por citometría de flujo, mientras que la distribución celular fue evaluada microscópicamente sobre las HUVEC crecidas en un cubreobjetos. Las células fueron fijadas con una solución 2% de paraformaldehído y permeabilizadas con 0.25% Tritón X100 a temperatura ambiente por 20 min. Para minimizar el pegado inespecífico de los anticuerpos las células se bloquearon (3% BSA, 0.25% Tritón X100 en PBS) durante una hora a 4°C. Las muestras fueron incubadas durante 1 h. con el anticuerpo primario anti ZO-1 IgG de conejo (dilución 1:200, Invitrogen) a temperatura ambiente. Luego de lavar las células se las incubó con un anti-conejo conjugado a FITC durante 1 h. En paralelo se llevó a cabo el control de isotipo. Las HUVEC finalmente fueron montadas con medio de montaje y la distribución de la ZO-1 se evaluó mediante microscopia confocal utilizando un microscopio Olympus Fluoview 1000 equipado con el software FV10-ASW.

3.2.3.3 Evaluación de la reorganización de la actina

Las HUVECd se crecieron en cubreobjetos y fueron tratadas con los MC-ASTs tratados con LPS y/o Stx1. A las 24 hs. las células fueron fijadas con PFA 1% durante 20 min., lavadas y permeabilizadas con 0,25% Tritón X100 en PBS. Finalmente, y luego de lavar los preparados, se agregó TRITC-faloidina 10 µM

(Sigma) durante 1 h a temperatura ambiente. Luego de lavar la marca los preparados fueron montados en medio de montaje. Para la evaluación de la distribución de actina se tomaron micrografías de todo el volumen celular en el eje Z, se apilaron las micrografías y se realizó una proyección de la máxima intensidad de fluorescencia.

3.2.4 Estudio de la permeabilidad endotelial

3.2.4.1 Ensayo de translocación transendotelial de Stx1

Células HUVEC fueron sembradas a confluencia en el inserto de un sistema de bi-cámara *transwell* (Corning®, Costar Corporation, Cambridge, MA) y diferenciadas con MC-ASTs. HUVECs fueron estimuladas con los MC-ASTs tratados con LPS y/o Stx1 por 24 hs. El aumento de la permeabilidad se determinó midiendo el pasaje transendotelial de la Stx1 desde la cámara superior hacia el inferior. Para ello, tras retirar el MC-de ASTs, las monocapas fueron lavadas y expuestas 30 ng/ml de Stx1 mientras que en la en la cámara inferior se adiciono 200 de medio completo. Luego de una incubación de 30 min. a 37°C los 200 µl fueron utilizados para cuantificar la cantidad de Stx1 que atravesó la monocapa celular mediante la determinación de citotoxicidad mediada por Stx1 en células Vero.

3.2.4.2 Ensayo de Citotoxicidad en células Vero

Las células Vero resultan muy útiles para el estudio de la toxicidad de la Stx debido a su alta sensibilidad a la toxina. Brevemente, se crecieron las células Vero en placas de 96 pozos con medio RPMI 1640 (Sigma) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB, GIBCO) y 1% de penicilina-estreptomicina (GIBCO). Alícuotas (100 µl) de la suspensión de Stx1 se adicionó y se incubó por 24 hs. a 37°C en 5% CO₂. Transcurrido ese tiempo, se removieron las muestras, las células muertas fueron eliminadas por lavado y se tiñeron las monocapas con Violeta de Genciana 0,2 % en metanol 20%. Las placas se incubaron durante 10 min. a temperatura ambiente en presencia del colorante. El exceso de colorante se eliminó por repetidos lavados con agua. Posteriormente, las células teñidas se despegaron por el agregado de 50 µl de ácido acético 33% y una leve agitación. Finalmente, la absorbancia de las

placas se leyeron a 550 nm en un espectrofotómetro. La actividad citotóxica de Stx1 fue expresada como porcentaje de citotoxicidad de Vero. El % de citotoxicidad Vero fue calculado según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Citotoxicidad Vero} = 100 \times (\text{Abs de 100\% células viables control} - \text{abs suspensión de Stx1}) / (\text{Abs de 100\% células viables en control})$$

Para los ensayos de neutralización, 10 ng/ml de Stx1 y el medio condicionado de ASTs tratados con LPS y Stx1 se incubaron previamente con los anticuerpos anti-Stx correspondientes (1 µg/ml) por 5 min a 37°C. La mezcla se adicionó a las células Vero y se procedió de la misma forma descripta para los ensayos de toxicidad de células Vero.

3.2.5 Estudio de expresión del receptor e interacción con la Stx1

3.2.5.1 Evaluación de la expresión del receptor de la toxina (Gb3).

La expresión en superficie del receptor Gb3 (fue evaluada por citometría de flujo en HUVECd no tratadas o estimuladas con el MC de ASTs tratados con (LPS; Stx1; LPS+Stx1 según se detalló arriba). Como control positivo de modulación del receptor se empleo LPS (0,5 µg/ml) para estimular HUVECd. El análisis se realizó a las 24 hs, siguiendo el mismo protocolo que se utilizó para ASTs.

3.2.5.2 Evaluación de la sensibilidad a la Stx1.

Para determinar la sensibilización al daño mediado por Stx1 de los MC-ASTs tratados con LPS y/o Stx1 las HUVECd fueron estimuladas con ellos durante 24 hs. Luego las células fueron lavadas y se adicionó una dosis subtóxica de Stx1 (2 ng/ml). A las 24 hs. Las células fueron recolectadas cuidando de conservar las células muertas que se despegaron de la placa de cultivo. La muerte celular fue evaluada utilizando un kit de AnexinaV/IP siguiendo el protocolo empleado para los ASTs.

3.2.6 Estudio de la Activación de endotelial

3.2.6.1 Expresión de ICAM-1 y E-selectina en HUVEC diferenciadas

HUVECd fueron estimuladas con el MC-ASTs sin tratar o tratados con LPS y/o Stx1. durante 12 hs. para los ensayos de medición de ICAM-1 durante 6 hs. para los ensayos de medición de E-selectina. Las células fueron recolectadas mediante tratamiento con un 0,25 % y 0,02 % de tripsina EDTA. Para la expresión de ICAM-1 las células fueron incubadas durante 30 min. en oscuridad con un anticuerpo marcado con ficoeritrina PE-ratón anti-humano CD54 (dilución final 1:50, clon HA58, BD Pharmingen). La expresión de E-selectina se realizó marcando las células con anticuerpo primario monoclonal anti-CD62E (dilución final 1:150, clon 1.2B6 Immunotech) durante 30 min. a 4C. Luego de lavar las células, se incubó con el anticuerpo secundario conjugado F(ab')₂ anti-ratón FITC-IgG (dilución final 1:100 Immunotech). Para descartar el pegado inespecífico anti-CD62E se reemplazo por la concentración correspondiente de isotipo irrelevante IgG1. Luego de marcar las células fueron lavadas y fijadas con 0,5% de paraformaldehído y analizadas por citómetro de flujo. Las regiones apropiadas (según *forward* y *side scatter*) fueron seleccionadas para analizar 20.000 células por experimento.

3.2.6.2 Evaluación de Factor Von Willebrand (FvW) liberado.

El FvW liberado fue determinado en los sobrenadantes de HUVECd estimuladas con el MC-ASTs sin tratar o tratados con LPS y/o Stx1 durante 24 hs. Finalizado el tratamiento los sobrenadantes fueron recolectados, centrifugados 10 min, 1500 rpm, 4 C°, y congelados a -20°C hasta la posterior determinación de FvW. El FvW liberado por las HUVECd fue cuantificado utilizando un kit de ELISA comercial. Para ello, microplacas fueron tratadas toda la noche a 4 °C con 100 ul de un anticuerpo anti FvW humano, purificado de cabra (diluido en buffer bicarbonato 50 mM, pH 9.6). Los sitios de unión a proteínas restantes fueron bloqueados durante 1 hora con una solución con 8.0 g/L NaCl, 2.92 g/L Na₂HPO₄-12H₂O, 0.2 g/L KH₂PO₄, 0.2 g/L KCl y 20 g/L de seroalbúmina bovina (SAB), pH 7.4. Luego de lavar 3 veces con una solución de PBS-tween, se adicionaron las muestras y la curva estándar diluidas en una solución de HEPES (28.3 g/L), Tween 20 (0.1%) y SAB (10 g/L), fueron incubadas por 120 min. a 22 °C. Un segundo anticuerpo anti-FvW conjugado a peroxidasa de rábano fue adherido durante 90 minutos. La unión

de este segundo anticuerpo fue detectada por el agregado de 100 μ l de ABTS y la absorbancia a 405 nm fue leída 20 min. después. Los resultados son expresados en ng/ml y fueron extrapolados de una curva construida con diluciones seriadas de un pool de plasmas normales asumiendo que la concentración de FvW era 6.7 μ g/ml (como referencia de un estándar internacional del National Institute for Biological Standards and Control, UK)

3.2.7 Estudio de PMN y su interacción con el endotelio

3.2.7.1 Obtención de leucocitos PMN humanos

Sangre de donadores normales voluntarios (Sección Hemoterapia-CEMIC) fue recolectada en citrato / dextrosa / adenina. La sangre fue diluida al medio con solución fisiológica y sembrada sobre una solución de Ficoll - Triyosom formando un sistema bifásico, el cual fue centrifugado a 350 x g durante 30 min a 4°C [38]. Luego de la centrifugación, se obtuvo una interfase conteniendo las células mononucleares periféricas y un sedimento de eritrocitos y granulocitos. Este último fue diluido al medio con solución fisiológica. Luego se agregó dextran al 6%, en una proporción de tres volúmenes de suspensión celular diluida a un volumen de dextrán. Se dejó sedimentar durante 30 min a temperatura ambiente, se retiró el sobrenadante rico en granulocitos y se lavó con solución fisiológica. Los eritrocitos contaminantes fueron eliminados por shock osmótico con agua bidestilada durante 1 min a 4°C, restituyendo inmediatamente la isotonicidad. Las preparaciones contuvieron más de 94% de granulocitos, de los cuales el 95-98% eran PMN. Las células fueron resuspendidas en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 1% de SFB inactivado por calentamiento a 56°C durante 30 min y con el agregado de gentamicina (50 μ g/ml).

3.2.7.2 Evaluación de la activación de PMN

PMN purificados fueron estimulados con el MC-ASTs sin tratar o tratados con LPS y/o Stx1. durante 40 min. Para la medición de CD11b o durante 1,5 hs. para los ensayos de medición de CD66. La expresión de CD11b y CD66 se realizó marcando las células con anticuerpo asociado a ficoeritrina rat anti-

CD11b (dilución final 1:150, Immunotech) o con anticuerpo conjugado a FITC rat anti.CD66 respectivamente durante 30 min. a 4°C. Para descartar el pegado inespecífico de los anticuerpos se utilizó un control de isotipo adecuado. Luego las células fueron lavadas y fijadas con 0,5% de paraformaldehído y analizadas por citómetro de flujo. Las regiones apropiadas (según *forward* y *side scatter*) fueron seleccionadas para analizar 30.000 células por experimento.

3.2.7.3 Migración transendotelial de PMN

Para determinar la migración de PMN a través del endotelio se sembraron a confluencia células HUVECd en la cámara superior de un inserto (*Transwell* Corning) con poro de 3 micrones, un tamaño que no permite el pasaje de HUVECd. Las células fueron cultivadas con el medio condicionado de ASTs tratados durante 24 hs. (el medio estaba en ambas cámaras) El medio del compartimento inferior fue reemplazado por MC de ASTs tratados fresco para que aportara factores quimiotácticos para la atracción de PMN. En el compartimento superior, se agrega una suspensión en medio DMEM suplementado de PMN humanos purificados (relación HUVECd:PMN 1/20) y 1,5 h más tarde los PMN migrados al compartimento inferior fueron recolectados y cuantificados por recuento en cámara de Neubauer.

3.2.7.4 Ensayo de adhesión de PMN a HUVECd.

HUVECd fueron estimuladas con el MC-ASTs sin tratar o tratados con LPS y/o Stx1 durante 24 hs. Luego las células fueron lavadas y adicionaron PMN en una relación HUVECd:PMN de 1:20). A las 3 hs los PMN no adheridos fueron removidos tras lavar vigorosamente las monocapas. Como control de cien por ciento de adhesión un *well* con PMN no recibió los lavados. Con el fin de evaluar la adhesión de PMN a HUVECd se midió la actividad de la fosfatasa alcalina de los neutrófilos (FAN) remanentes adheridos a las células endoteliales. Brevemente, la actividad enzimática de la FAN fue evaluada utilizando como sustrato p-nitrofenyl fosfato (Sigma) en un buffer 1 mM MgCl₂ en 100 mM 2-amino-2-methyl-1-propanol. La actividad fue monitoreada a 420nm. La adhesión de PMN fue determinada según la siguiente fórmula: % de PMN adheridos = $100 \times (\text{Abs PMN adheridos a HUVECd} - \text{Abs HUVEC sin PMN}) / (\text{Abs de 100\% PMN adheridos} - \text{Abs HUVEC sin PMN})$

3.2.7.5 Ensayo de citotoxicidad mediada por PMN

HUVECd fueron estimuladas con el MC-ASTs sin tratar o tratados con LPS y/o Stx1 durante 24 hs. Luego las células fueron lavadas y se adicionaron PMN en una relación HUVECd:PMN de 1:20). Para los ensayos de citotoxicidad independiente de contacto, los PMN fueron sembrados en la cámara superior del inserto *transwell* con un poro de 0,3 μ m. Para determinar la citotoxicidad mediada por PMN, luego de 8 hs. los PMN y las HUVECd fueron lavadas y se tiñeron las células remanentes con el colorante cristal violeta. El porcentaje de citotoxicidad se determinó microscópicamente mediante el recuento de las HUVECd. El porcentaje de citotoxicidad de ASTs mediada PMN fue calculado como: % Citotoxicidad= $100 - [(\text{Num. HUVECd tratados} / \text{Num. HUVECd sin tratar}) \times 100]$.

3.2.8 Estudios realizados en plaquetas y su interacción con el endotelio

3.2.8.1 Preparación de plaquetas

Las plaquetas fueron obtenidas a partir de dadores normales que no hubieran usado antiinflamatorios no esteroideo al menos diez días antes de la toma de sangre. La sangre fue recolectada en tubos plásticos con citrato acido de dextrosa. Los plasmas rico sen plaqueta fueron obtenidos por centrifugación de la muestra (800 r.p.m por 10 min) y las células fueron ajustadas ala concentración de trabajo. La suspensión de plaqueta típicamente presenta una contaminación con leucocitos de $\leq 0.003\%$

3.2.8.2 Evaluación de la activación de plaquetas

Para determinar la activación de plaquetas se determinó la expresión en superficie de P-selectina por citometría de flujo. Las plaquetas fueron incubadas durante 20 min. con el MC-ASTs tratados con LPS y /o Stx1. Luego las plaquetas fueron fijadas con paraformaldehido 1% y se incubaron durante 15 min. con anticuerpo monoclonal IgG anti P-selectina humana o con el correspondiente control de isotipo IgG. Luego fueron lavadas e inmediatamente analizadas por citometría de flujo.

3.2.8.3 Evaluación de la adhesión de plaquetas a HUVECd

HUVECd fueron sembradas en una placa de 96 wells tratadas durante 24 hs. con el sobrenadante de ASTs tratados con LPS y/o Stx1. Luego, sin remover los sobrenadante, plaquetas purificadas de dadores normales con 1 mM de calcio fueron sembradas sobre las HUVECd (Relación HUVECd:plaquetas 1:20). Luego de incubar 1,5 h en estufa con ambiente húmedo, 5 % de CO₂ a 37°C las plaquetas no adheridas fueron removidas por repetidos lavados. La adhesión de plaquetas a HUVECd fue evaluada indirectamente mediante la determinación del porcentaje de actividad específica de la enzima fosfatasa acida plaquetaria (FAN). Brevemente, la actividad enzimática de la FAN fue evaluada (Sigma) agregando 150 ul por well del sustrato (p-nitrofenil fosfato 5 mM en citrato 0,1 M y 0,1 % Triton pH 5,4). Luego de incubar 1 hora a RT en oscuridad se detiene la reacción con 100 ul de una solución 2 N de NaOH en cada well. La actividad fue monitoreada a 405 nm. Como control de cien por ciento de adhesión un *well* con plaquetas no recibió los lavados. El % de adhesión plaquetaria fue calculado según la siguiente fórmula: % de Plaquetas (PL) adheridos=100 x (Abs PL adheridos a HUVECd-Abs HUVEC sin PL) / (Abs de 100% PL adheridos-Abs HUVEC sin PL).

3.3 Análisis estadístico

Las diferencias estadística entre tratamientos fueron determinados usando t-test pareado para comparaciones entre dos grupos y análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido del post test Bonferroni para comparaciones múltiples. El test Chi cuadrado (χ^2) de tendencia fue utilizado para los ensayos de adhesión PMN en ASTs . Un valor de p <0.05 fue considerado significativo. Todos los tests fueron llevados acabo con el software Prism 5.0 (Graph Pad Software, La Jolla, CA).

4. RESULTADOS

4.1 Efectos inducidos por Stx1 en Astrocitos (ASTs) sensibilizados por LPS.

4.1.1 Los ASTs son blanco de la Stx1

4.1.1.1 El pre-tratamiento con LPS sensibiliza a los ASTs a los efectos mediados por Stx1.

La actividad biológica de Stx1 involucra la inhibición de la síntesis proteica, conduciendo a la muerte celular (Endo *et al.*, 1988). Por lo tanto, se evaluó si los ASTs son células blanco para la citotoxicidad inducida por Stx1, y se determinó la modulación del LPS sobre los efectos inducidos por Stx1. Para ello, ASTs fueron sensibilizados por 18 hs. con LPS antes de adicionar Stx1. La muerte celular inducida fue determinada mediante citometría de flujo, realizando una marcación con Anexina V-FITC(AV)/ Ioduro de propidio (PI) a diferentes tiempos de cultivo. Se grafica el porcentaje total de muerte como la sumatoria de células que marcaron sólo AV (IP⁻/AV⁺), lo cual refiere a la muerte temprana, y las células que incorporaron IP (IP⁺/AV^{+/-}), refiriendo a células muertas que han perdido la integridad de membrana. Como se observa en la Figura 4.1.1A, LPS y Stx1 solos no indujeron muerte celular en forma significativa. Sin embargo, cuando los ASTs fueron pre-tratados con LPS, Stx1 indujo un incremento significativo en el porcentaje de ASTs muertos a las 48 y 72 hs. Efectos tóxicos mayores y similares fueron obtenidos usando 25 y 100 ng/ml de Stx1 (% de muerte aproximadamente de 30%) en ASTs tratados con LPS (datos no mostrados, ver Apéndice).

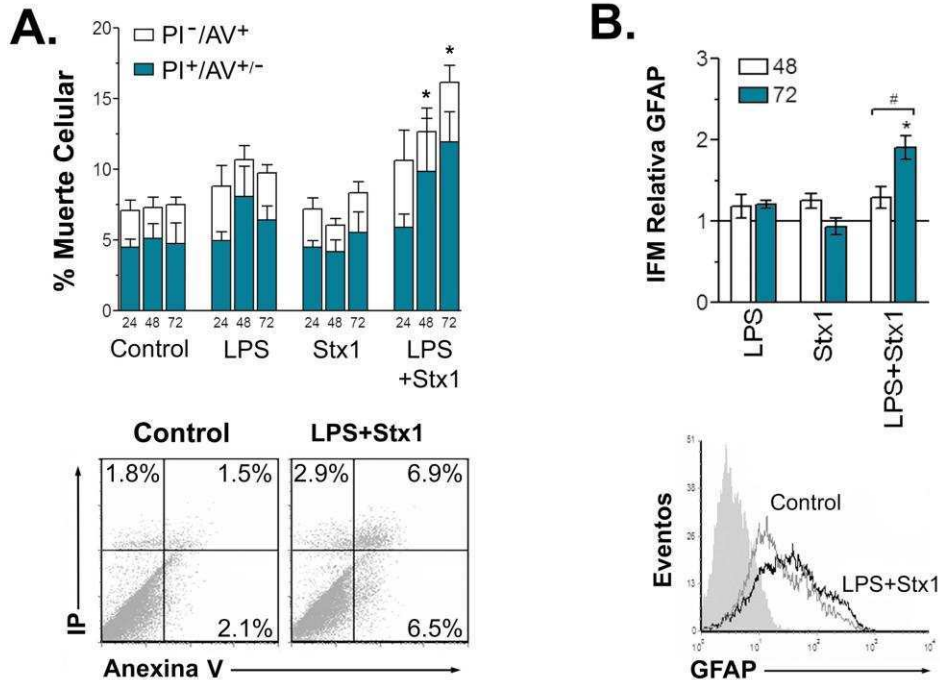


Figura 4.1.1 Los efectos inducidos por Stx1 en ASTs son potenciados por LPS. Los ASTs fueron cultivados en medio completo (control) o en presencia de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ LPS (0 a 72 hs.) y/o 10 ng/ml Stx1 (18 hs. luego del pretratamiento con LPS). El análisis de la muerte celular (**A**) y la inmunomarcación de GFAP intracelular (**B**) fueron realizadas mediante citometría de flujo. (**A**) Los porcentajes de muerte celular (media \pm error estándar de las medias [ES]) se midieron como porcentajes de células IP⁺/AV^{+/-} (IP⁺/AV⁺ más IP⁺/AV⁻) e IP⁻/AV⁺ luego de 24, 48 y 72 hs. de tratamiento con Stx1. * $p < 0,01$ (LPS+Stx1 vs. Control, $n=4$). (Panel inferior izquierdo) Análisis de Dot plot de un experimento representativo a las 72 hs. (**B**) Mediana de la Intensidad de fluorescencia (IFM) relativa al Control de la inmunomarcación para GFAP intracelular (media \pm ES) medida a las 48 hs. (barras blancas) y 72 hs. (barras azules) luego del tratamiento con Stx1. * $p < 0,01$ (LPS+Stx1 vs. control); # $p < 0,05$ (LPS+Stx1 a 48 hs. vs. LPS+Stx1 a 72 hs.; $n=5$). (Panel inferior derecho) Histogramas de un experimento representativo a las 72 hs. mostrando la IFM de GFAP en ASTs no tratados (Control) y tratados con LPS+Stx1. El histograma relleno en gris representa el Control de isotipo.

Los ASTs activados participan prácticamente en todas las reacciones inflamatorias del cerebro. Por otro lado, la expresión aumentada de la proteína de filamentos intermedios mayor, proteína fibrilar glial ácida (GFAP), constituye el principal marcador de activación de los ASTs (Eng and Ghirnikar, 1994). Como se observa en la Figura 4.1.1B, Stx1 estimuló la expresión de GFAP a las 72 h en ASTs previamente sensibilizados con LPS. Sin embargo, Stx1 sola no fue suficiente para aumentar la expresión de GFAP. Estos datos fueron corroborados por la observación paralela mediante microscopía de epifluorescencia (datos no mostrados). En conjunto, estos resultados señalan que Stx1 induce citotoxicidad y activa a los ASTs que fueron

previamente sensibilizados con LPS. Los mismos resultados fueron obtenidos cuando dosis mayores de Stx1 fueron utilizadas (25ng/ml y 100ng/ml) sola o en combinación con LPS. (Datos no mostrados, ver apéndice).

Dado los resultados obtenidos, para los siguientes experimentos se decidió utilizar la mínima dosis de Stx1 (10 ng/ml) con la cual en combinación con LPS, induce máxima activación con menor efecto tóxico.

4.1.1.2 La expresión del receptor de Stx1 y la internalización de Stx1 está aumentada en ASTs sensibilizados con LPS.

Los estímulos proinflamatorios son capaces de aumentar la expresión del receptor de Stx1, Gb₃, en la superficie de diferentes células blanco *in vitro* (Ramegowda *et al.*, 1999). Para evaluar si en ASTs el LPS también modula el receptor de la toxina, se determinaron los niveles de Gb₃ en ASTs tratados con LPS y/o Stx1. La Figura 4.1.2A, muestra que el LPS estimuló la expresión del Gb₃ en los ASTs. Por otra parte, aunque Stx1 no indujo un aumento en la expresión de Gb₃, Stx1 indujo la máxima expresión de Gb₃ en los ASTs sensibilizados con LPS. Para determinar si la expresión exacerbada de Gb₃ se correlaciona con una internalización aumentada de la toxina, se evaluó la incorporación de Stx1 (30 ng/ml), luego de 30 min. de incubación a 37 o a 4°C (para estimar el pegado a la superficie celular), en los ASTs sensibilizados con LPS por citometría de flujo. Como se observa en la Figura 4.1.2B, una incorporación significativamente aumentada se demostró en los ASTs sensibilizados con LPS (p=0.04). Estos resultados indican que el pretratamiento de los ASTs con LPS induce una expresión incrementada del receptor de superficie Gb₃, y esto se asocia a una mayor internalización de Stx1.

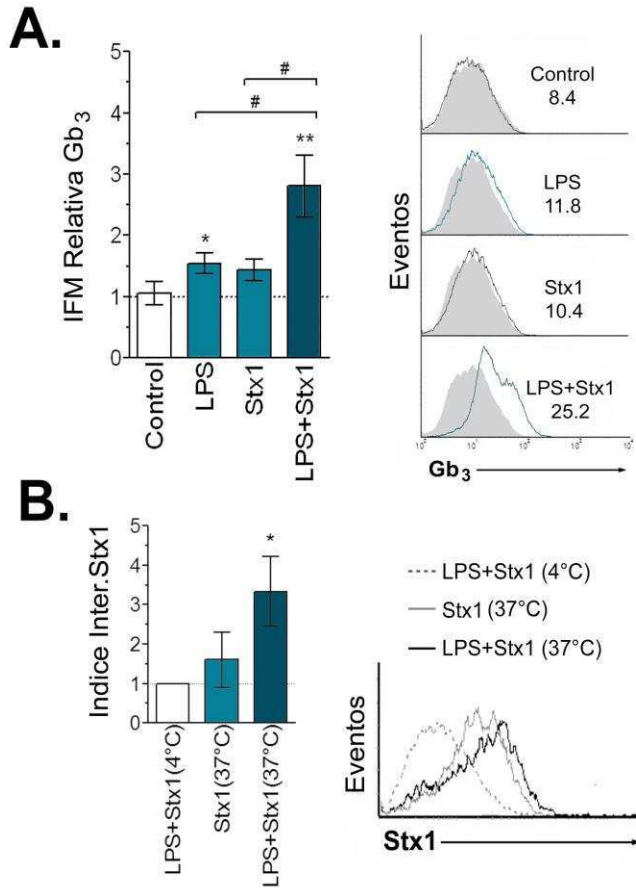


Figura 4.1.2 LPS aumenta los niveles de expresión de Gb₃ y la internalización de Stx1 en ASTs.

Los ASTs fueron cultivados en medio completo (control) o en presencia de 0,5 µg/ml LPS (0 a 42 hs) y/o 10 ng/ml Stx1 (18 hs. luego del pretratamiento con LPS). La evaluación de los niveles de Gb₃ (**A**) y la internalización de Stx1 (**B**) fueron realizados mediante citometría de flujo. (**A**) IFM (relativo al isotipo) del receptor Gb₃ en ASTs (media ± ES) medido a las 24 hs luego del tratamiento con Stx1. **p<0,005 (LPS+Stx1 vs. control); *p<0,05 (LPS vs. Control); #p<0,01 (LPS+Stx1 vs. LPS o Stx1, n=4). (Panel superior derecho) Histogramas de un experimento representativo. Histograma relleno en gris representa el control de isotipo. (**B**) La internalización diferencial de Stx1 entre ASTs sin tratar (Control) y los ASTs sensibilizados con LPS fue determinado mediante incubación de los cultivos con Stx1 por 30 min. a 37°C previo a la marcación intracelular y análisis por citometría de flujo. En paralelo, se realizó una incubación a 4°C para estimar el pegado a la superficie celular de Stx1. El índice de internalización (Ind. Int. Stx1) fue calculado luego de normalizar la IFM de los ASTs tratados a 37°C con los valores obtenidos en aquellos tratados a 4°C. *p<0,05 (LPS vs. control, n=3). (Panel inferior derecho) Histogramas representativos de un experimento.

4.1.2 Stx1 induce una respuesta inflamatoria en ASTs

4.1.2.1 La respuesta inflamatoria inducida por Stx1 está potenciada en los ASTs sensibilizados por LPS

Los ASTs son una fuente importante de citoquinas y quimioquinas que participan en la respuesta inflamatoria en el cerebro. Por lo tanto, se determinó si Stx1 solo o luego del pre-tratamiento con LPS es capaz de producir una respuesta inflamatoria en los ASTs. Para ello, se determinó en medios condicionados de ASTs la secreción de TNF-α y la producción de ON, los cuales están implicados en condiciones neuroinflamatorias y neurodegenerativas (Fan *et al.*, 1996). Como se observa en la Figura 4.1.3A, los ASTs tratados con Stx1 o LPS solos, secretaron cantidades significativas de TNF-α comparado al medio condicionado de ASTs sin tratar. Sin

embargo, la actividad máxima de TNF- α fue detectada en los medios condicionados de ASTs sensibilizados con LPS y tratados con Stx1. En la Figura 4.1.3B se observa que la producción de ON fue aumentada significativamente por el tratamiento con LPS. Sin embargo, la mayor producción de ON fue obtenida cuando Stx1 se adicionó a los ASTs previamente sensibilizados con LPS.

Consistente con una estimulación de genes proinflamatorios, la infiltración de células de sangre periférica es un evento preponderante luego de la injuria en las patologías cerebrales. Por otra parte, se ha sugerido un rol deletéreo de los PMN en SUH (Exeni *et al.*, 2007). Por lo tanto, se determinó si los ASTs tratados son capaces de liberar factores quimioattractantes para PMN. Para ello, los medios condicionados de ASTs tratados fueron usados como estímulo quimiotáctico y se determinó el número de PMN migrados en una cámara de quimiotáxis. La Figura 4.1.3C muestra que los medios condicionados de ASTs tratados con LPS o Stx1 indujeron una quimiotáxis de PMN estadísticamente significativa en comparación al medio condicionado de los ASTs no tratados. La mayor migración fue observada en los medios condicionados de ASTs pre-tratados con LPS y tratados con Stx1. Stx1 y LPS, no fueron quimioattractantes por si solos (datos no mostrados).

En conjunto, estos resultados sugieren que Stx1 induce una respuesta inflamatoria que está potenciada en los ASTs sensibilizados con LPS.

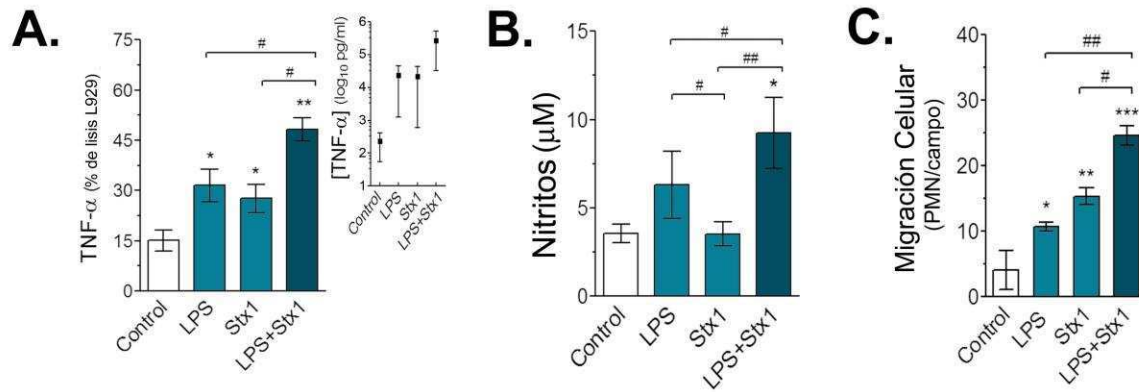


Figura 4.1.3 Stx1 induce una respuesta inflamatoria sobre los ASTs. Los ASTs fueron cultivados en medio completo (control) o en presencia de 0,5 μg/ml LPS (0 a 42 hs) y/o 10 ng/ml Stx1 por 24 hs. (adicionado 18 hs. luego del pretratamiento con LPS). El medio condicionado fue colectado 24 hs. luego del tratamiento con Stx1 para el bioensayo de TNF-α **(A)**, producción de oxido nítrico **(B)**, o para el ensayo de migración quimiotáctica de PMN **(C)**. **(A)** La actividad de TNF-α fue estimada por el ensayo de citotoxicidad en células L929 como porcentaje de lisis celular (media ± ES). **p<0,001 (LPS+Stx1 vs. control); *p<0,05 (LPS o Stx1 vs. control); #p<0,05 (LPS+Stx1 vs. Stx1 o LPS, n=9). (Gráfico menor) La concentración de TNF-α (media ± SEM, n=5) fue estimada en el mismo bioensayo por interpolación a las curvas estándares de TNF-α de rata. **(B)** La producción de oxido nítrico fue estimada mediante la concentración de nitritos (media ± SEM). *p<0,02 (LPS+Stx1 vs. control); ##p<0,01 (LPS+Stx1 vs Stx1); #p<0,05 (LPS+Stx1 o Stx1 vs. LPS, n=6). **(C)** La migración celular fue determinada mediante ensayo de quimiotaxis de PMN. El número de PMN migrados fue medido mediante análisis microscópico (aumento 400X) de cinco campos elegidos al azar (media ± SEM). ***p<0,005 (LPS+Stx1 vs. control); **p<0,01 (Stx1 vs. control); *p<0,01 (LPS vs. control); #p<0,02 (LPS+Stx1 vs. Stx1); ##p<0,005 (LPS+Stx1 vs. LPS) (n=4).

4.1.2.2 La adhesión y la citotoxicidad mediada por PMN e inducida por Stx1 está aumentada en ASTs sensibilizados con LPS.

Ya que los PMN liberan varios mediadores tóxicos que tienen el potencial de dañar el tejido cerebral (Barone *et al.*, 1991), se evaluó la interacción y los efectos de PMN sobre ASTs tratados. En primer lugar, se analizó la adhesión de PMN a los ASTs estimulados (relación PMN/ASTs=20:1) mediante el recuento del número de PMN asociados físicamente a los ASTs por microscopía óptica. En la Figura 4.1.4A se observa que la mayoría de los ASTs no tratados presentan bajas cantidades de PMN adheridos (adhesión media ~2.1 PMN/ASTs); mientras que los ASTs tratados con Stx1 o LPS adhieren cantidades bajas o intermedias de PMN (Stx1: adhesión media ~3.5 PMN/ASTs y LPS: adhesión media ~4.2 PMN/ASTs). La adhesión máxima fue observada en ASTs tratados con LPS+Stx1 (adhesión media ~7.4 PMN/ASTs).

Para evaluar el daño potencial inducido por los PMN, se evaluó la citotoxicidad en ASTs co-cultivados con PMN (relación PMN/ASTs=20:1). Los resultados mostrados en la Figura 4.1.4B indican que la adición de PMN luego de la estimulación con LPS o Stx1 resulta en un aumento significativo de la toxicidad de ASTs comparado a los PMN solos. Sin embargo, la máxima citotoxicidad mediada por PMN fue observada en los ASTs tratados con LPS y Stx1.

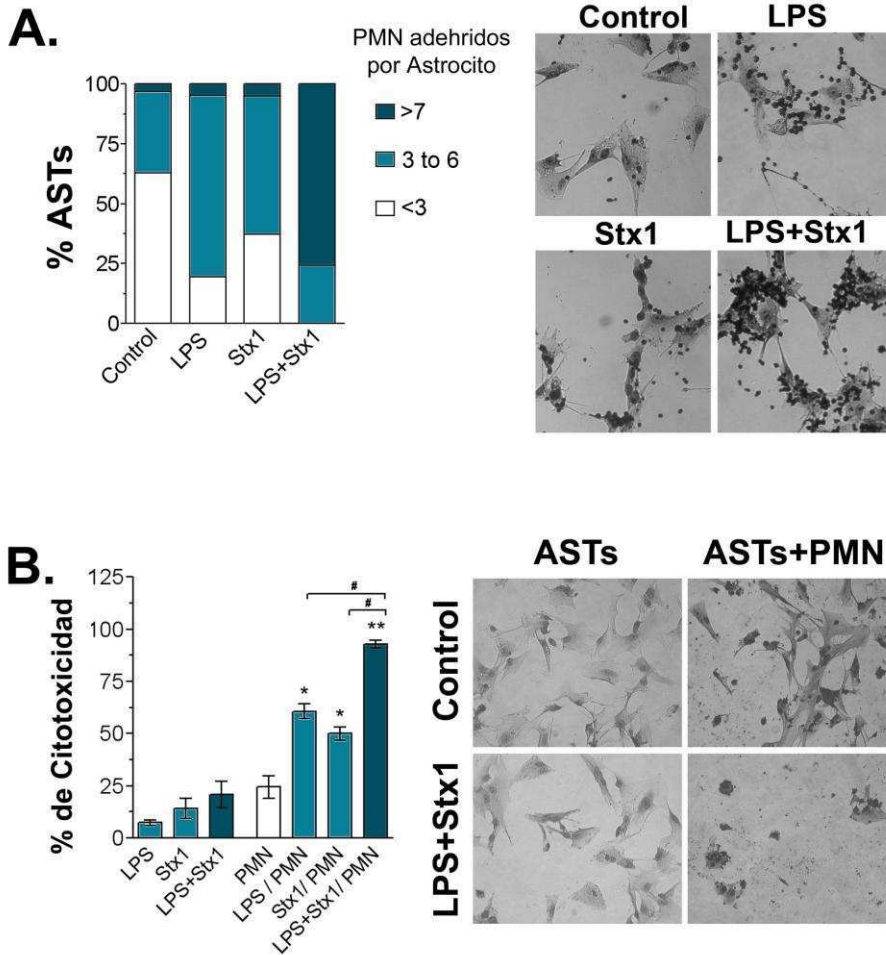


Figura 4.1.4 Stx1 aumenta la adhesión de PMN y la sensibilidad a la citotoxicidad mediada por PMN en los ASTs sensibilizados con LPS. Los ASTs fueron cultivados en medio completo (control) o en presencia de 0,5 µg/ml LPS (0 a 42 hs) y/o 10 ng/ml Stx1 (adicionado 18 hs luego del pretratamiento con LPS). Los ASTs fueron co-incubados con PMN singenéticos (24 hs luego de la adición de Stx1). Los ASTs con PMN adheridos fueron analizados a las 3 hs. **(A)** y la citotoxicidad determinada a las 8 hs. **(B)** mediante microscopía óptica (aumento 600X). **(A)** Porcentaje de ASTs con PMN adheridos. El número de ASTs con PMN adheridos fue analizado en tres campos seleccionados al azar (50 ASTs, n=3) y los datos fueron agrupados como el número de ASTs con <3, 3 a 6, o ≥7 PMN adheridos. La distribución estratificada se utilizó para realizar el análisis

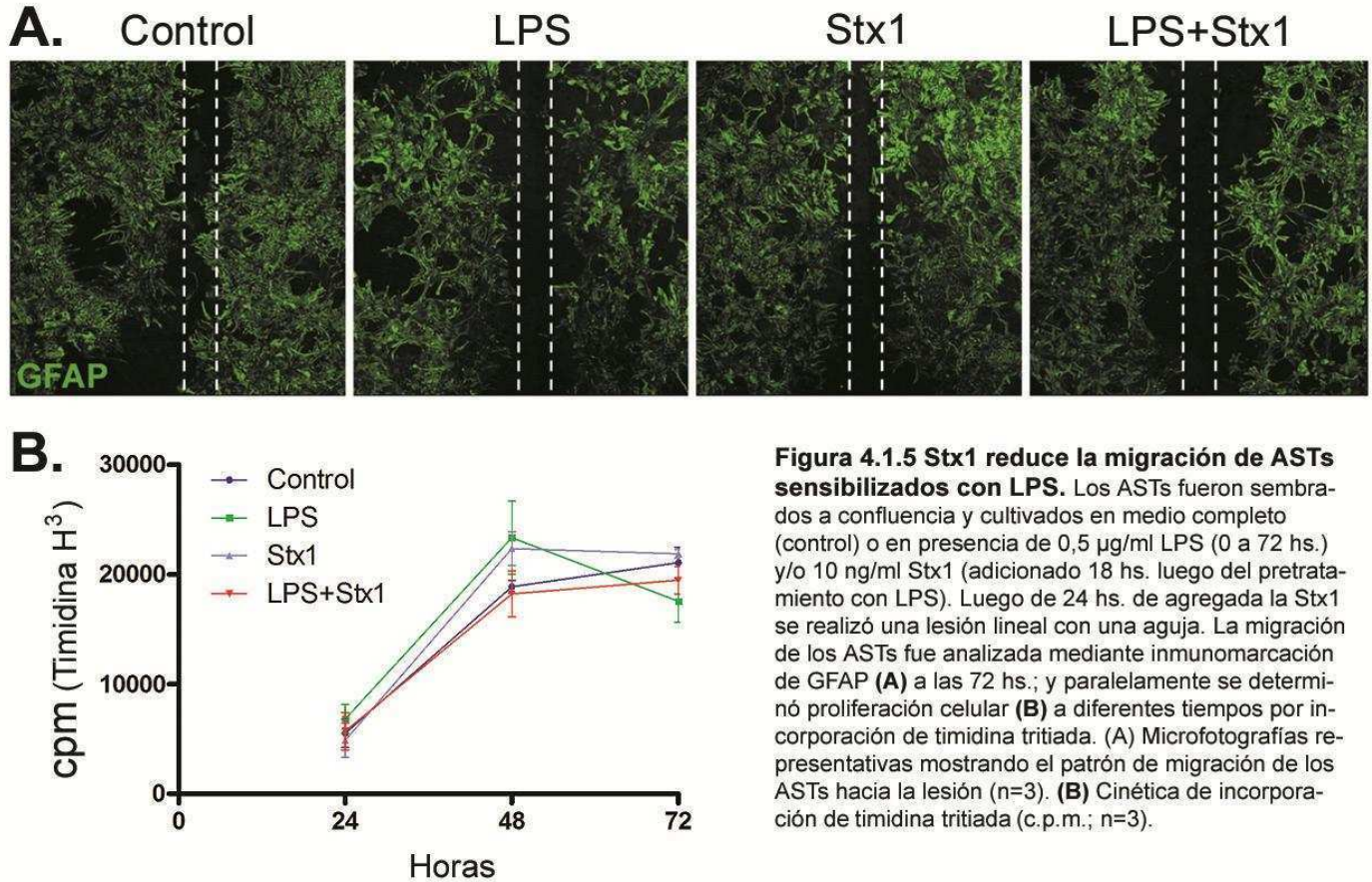
estadístico (test χ^2). $p < 0,01$ (control vs. LPS o Stx1); $p < 0,001$ (control vs. LPS+Stx1); $p < 0,01$ (LPS+Stx1 vs. LPS o Stx1). (Panel superior derecho) Se muestran microfotografías representativas (escala de grises) de un experimento independiente. **(B)** El porcentaje de citotoxicidad específica fue cuantificado mediante análisis microscópico. El gráfico de barras (media \pm SEM) resume los datos obtenidos de cuatro experimentos independientes. * $p < 0,05$ (LPS o Stx1/PMN vs. PMN); ** $p < 0,001$ (LPS+Stx1/PMN vs. PMN); # $p < 0,005$ (LPS+Stx1/PMN vs. LPS o Stx1/PMN). (Panel inferior derecho) Se muestran microfotografías representativas de un experimento independiente.

4.1.3 Stx1 reduce la función de cicatrización de ASTs sensibilizados con LPS.

En respuesta a eventos patológicos en el cerebro los ASTs se activan y migran hacia el sitio de la lesión y participan activamente del proceso de cicatrización del tejido dañado. Considerando esto se evaluó si Stx1 afecta la capacidad de migrar de los ASTs en respuesta a señales de daño. Para ello, se empleó el ensayo *in vitro* de lesión-cicatrización (*wound-healing*) para evaluar repoblación del sitio de injuria en el proceso de cicatrización. Cultivos confluentes de ASTs fueron tratados con LPS y/o Stx1. Tras 24 hs. de agregada la toxina, y sin retirar los estímulos, se pasó cuidadosamente una aguja por el cultivo de modo de generar un espacio libre de células representando el sitio de injuria. La respuesta astrocitaria normal es la de migrar hacia la zona libre de células para “cerrar la herida” mediante la generación de una cicatriz. A las 72 hs. se evaluó microscópicamente el grado de migración de los AST inmunomarcados con GFAP hacia la lesión generada. En la Figura 5B se observan las microfotografías obtenidas a 72 hs. Para estimar el grado de cierre de la herida, se trazaron dos líneas paralelas arbitrarias que mejor ajustan a la cicatriz de los ASTs sin tratar (control), y las mismas fueron colocadas en las zonas donde ocurrieron las lesiones en las microfotografías de los ASTs tratados con LPS o Stx1 o bien la combinación LPS y Stx1. Las imágenes indican que ASTs tratados con Stx1 no muestra diferencias en la capacidad de cierre de la herida respecto a ASTs control. Si bien los ASTs tratados con LPS muestran cierto grado de impedimento, las diferencias más notorias se observan en ASTs tratados con LPS y Stx1, en los que la migración de los ASTs sobre la región lesionada es marcadamente menor que en el control. Estos resultados señalan que Stx1 en ASTs sensibilizados con LPS impide la migración de los ASTs hacia la zona de injuria.

Para determinar la posible contribución de la proliferación en el cierre de la herida, se evaluó también la incorporación de timidina a distintos tiempos de generada la lesión. La figura 4.1.5 muestra la cinética de proliferación de los ASTs a lo largo del tiempo de cultivo y revela que la proliferación inducida por la herida fue similar para los distintos tratamientos. De esta forma se puede concluir que la falla en la cicatrización en los cultivos tratados con LPS+Stx1 se debe a defectos en la migración de los ASTs.

En conjunto, estos resultados revelan que Stx1 reduce la capacidad migratoria en respuesta al daño de los ASTs sensibilizados con LPS, interfiriendo con la función de cicatrización.



4.1.4 La inhibición de NF- κ B o el bloqueo de la actividad de TNF- α evita los efectos mediados por Stx1 en ASTs sensibilizados con LPS.

El LPS dispara una cascada de señales que resulta en la activación y la translocación nuclear del factor de transcripción NF- κ B que regula genes proinflamatorios, incluyendo a los miembros de la familia TNF- α (O'Neill y Kaltschmidt, 1997). Además, luego del daño al SNC, varios de los procesos que ocurren en los

ASTs reactivos son regulados por NF- κ B. Para determinar si los efectos potenciados observados en los ASTs tratados con Stx1+LPS son mediados por la activación de NF- κ B, los experimentos descritos en las Figuras 1, 2 y 3 fueron realizados en presencia de BAY 11-7082 (inhibidor de la activación de NF- κ B). Paralelamente, la contribución de TNF- α endógeno secretado fue además evaluado por la adición de un receptor soluble de TNF- α (Etanercept) antes de la sensibilización de los ASTs con LPS. La Figura 4.1.6A muestra que la supresión del NF- κ B por 40 μ M BAY 11-7082 o el bloque del TNF- α con 5 ng/ml Etanercept en ASTs tratados con LPS+Stx1 resulta en una completa inhibición de la actividad TNF- α cuando el medio condicionado se utiliza para determinar la secreción de TNF- α por el bioensayo L929. En la Figura 4.1.6B se observa que la muerte celular mediada por Stx1 en ASTs sensibilizados con LPS fue evitada tras el tratamiento con BAY11-7082 o Etanercept. De manera similar, la activación de ASTs (Figura 4.1.6C), y la secreción de factores quimioattractantes de PMN (Figura 4.1.6F), fueron inhibidos significativamente por BAY11-7082 o Etanercept. Además, la expresión de Gb₃ inducida por Stx1 en ASTs sensibilizados con LPS (Figura 4.1.6D), y la internalización de Stx1 (Figura 4.1.6E) fueron reducidas por el bloqueo de TNF- α o la inhibición de la activación de NF- κ B.

En conjunto, estos resultados demuestran que la activación de NF- κ B y en particular el TNF- α derivado de ASTs son necesarios para potenciar la respuesta inducida por Stx1 en ASTs sensibilizados con LPS.

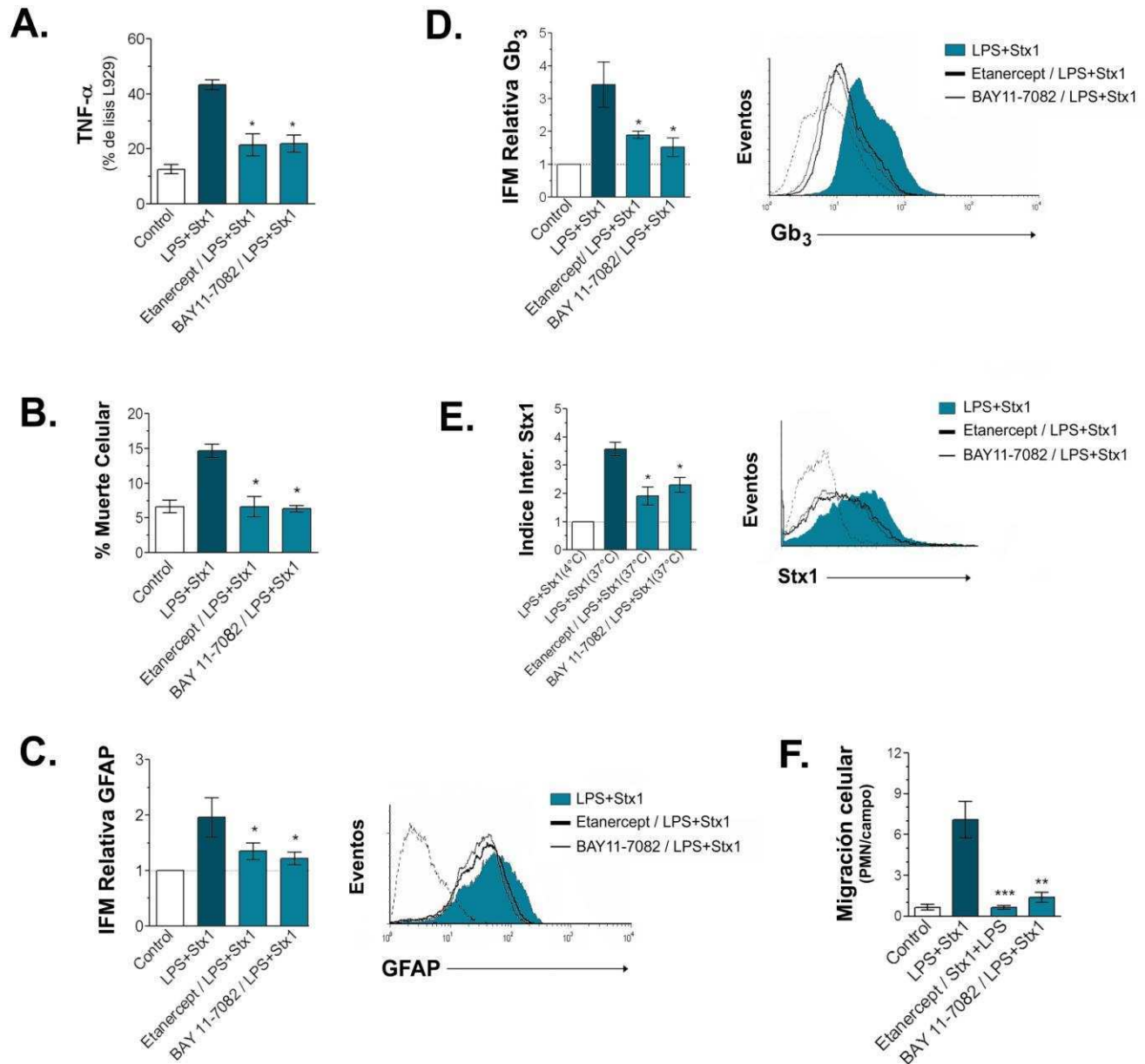


Figura 4.1.6 Los efectos de Stx1 sobre los ASTs sensibilizados con LPS son bloqueados por la inhibición de NF κ B o TNF- α . Los ASTs fueron tratados con el bloqueante de unión del TNF- α Etanercept o el inhibidor de NF κ B BAY11-7082 antes del tratamiento con LPS y Stx1. Los ASTs (**B, C, D y E**) o el medio condicionado de ASTs (**A y F**) fueron ensayados como se describe en las leyendas de Figuras anteriores. (**A**) Bioactividad de TNF- α (media \pm ES). * $p < 0,05$ (LPS+Stx1 vs. Etanercept o BAY11-7082/LPS+Stx1, $n=4$). (**B**) Porcentaje de muerte celular (media \pm ES). * $p < 0,05$ (LPS+Stx1 vs Etanercept o BAY11-7082 /LPS+Stx1, $n=4$). (**C**) IFM relativa de GFAP intracelular (media \pm ES). * $p < 0,05$ (LPS+Stx1 vs etanercept o BAY11-7082/LPS+Stx1, $n=4$). (Panel derecho) Se observan histogramas representativos. (**D**) IFM relativa del receptor Gb₃ (media \pm ES, $n=4$). (Panel derecho) Se muestran histogramas representativos. (**E**) Índice de internalización de Stx1 (media \pm ES). $p < 0,05$ (LPS vs. Etanercept o BAY11-7082/LPS, $n=4$). (Panel derecho) Se muestran histogramas representativos. (**F**) Evaluación de la migración celular (media \pm ES, $n=5$). *** $p < 0,005$ (LPS+Stx1 vs. Etanercept/LPS+Stx1); * $p < 0,01$ (LPS+Stx1 vs. BAY11-7082/LPS+Stx1).

Resumen Sección 4.1

- ✿ Stx1 induce activación de ASTs sensibilizados por LPS.
- ✿ Stx1 induce toxicidad de ASTs sensibilizados por LPS.
- ✿ Stx1 induce una respuesta inflamatoria temprana caracterizada por la liberación de ON, TNF- α y factores quimioattractantes de PMN.
- ✿ LPS y/o Stx1 promueve la adhesión de PMN a ASTs.
- ✿ ASTs estimulados con LPS y/o Stx1 son susceptibles al daño mediado por PMN.
- ✿ Stx1 y LPS disminuyen la migración de ASTs en el proceso de reparación por cicatrización
- ✿ Los efectos inducidos por Stx1 son máximos al sensibilizar a los ASTs con LPS presumiblemente por aumentar la expresión del receptor de Stx1 y su internalización de la toxina.
- ✿ La potenciación mediada por LPS de los efectos inducidos por Stx1 es dependiente de la activación de NF- κ B y en particular de la secreción endógena de TNF- α .

4.2 Efecto de los factores solubles liberados por ASTs en respuesta a LPS y/o Stx1 sobre CEs diferenciadas con propiedades de endotelio cerebral.

4.2.1 El medio condicionado de ASTs induce la diferenciación de CEs periféricas estimulando propiedades de endotelio cerebral.

Las proteínas que participan en las uniones intercelulares ocluyentes (TJs) (como ocludinas y claudinas), y otras proteínas asociadas (como ZO-1 y ZO-2), están presentes en las CEs de los vasos del SNC. Estas uniones son altamente impermeables y constituyen el elemento estructural más importante de la BHE, ya que restringe la migración de células inmunes y la difusión de moléculas nocivas desde el compartimento sistémico hacia el SNC. Estos vasos se encuentran casi en su totalidad cubiertos por los procesos terminales de los ASTs. De hecho, la propiedad restrictiva de las CEs del SNC no es intrínseca a estas células, sino que es inducida por su microambiente (Stewart y Wiley, 1981). Actualmente se acepta que los ASTs son responsables del funcionamiento de la BHE, mediante la liberación de factores solubles, que median la inducción y mantención de estas propiedades en las CEs cerebrales.

En un esfuerzo por obtener un modelo *in vitro* que represente la BHE, se ha comprobado que el medio condicionado de ASTs (MC-ASTs) es capaz de inducir muchas de las propiedades de la BHE en CEs. Aun más, se han establecidos modelos en que el MC-ASTs induce un fenotipo de endotelio cerebral en CEs periféricas de origen no cerebral.

Para modelar en forma más cercana la BHE humana, se emplearon CEs obtenidas de venas de cordón umbilical humano (HUVEC) diferenciadas a CEs con propiedades de endotelio cerebral por incubación con el MC-ASTs (HUVECd). Con el objetivo de validar el modelo de BHE *in vitro* se evaluó la inducción de diversas propiedades características del endotelio cerebral que constituye la BHE. Entre ellas,

se consideró el aumento de actividad fosfatasa alcalina, la expresión de moléculas TJs, los cambios morfológicos y la reorganización de actina. Para ello, células HUVEC fueron cultivadas durante 24 hs. en medio de cultivo completo (DMEM) o en presencia de MC-ASTs. En este sentido, la Figura 4.2.1A muestra un incremento significativo de la actividad de fosfatasa alcalina en HUVECd en presencia de MC-ASTs respecto a HUVEC mantenidas en medio DMEM. La actividad de esta enzima se mantuvo elevada durante 72 hs. aún cuando el MC-ASTs se retira tras 24 hs. de incubación (datos no mostrados).

Por otra parte, se evaluó por citometría de flujo y por inmunofluorescencia, la expresión de la proteína asociada a TJs ZO-1. En la Figura 4.2.1B se observa que el MC-ASTs induce un aumento significativo de la expresión basal de ZO-1 respecto a HUVEC mantenidas en medio DMEM. Estos resultados fueron corroborados en paralelo por microscopia confocal. En las microfotografías presentadas en la Figura 4.2.1C sólo en las HUVECd se evidencia un patrón intenso de expresión de ZO-1 (panel derecho), en particular en las zonas de contacto entre células adyacentes. Estos resultados concuerdan con el hecho de que estas proteínas confieren una unión intercelular estrecha. En este sentido, en la Figura 4.2.1E puede observarse que la disposición de las células HUVECd (panel derecho) aparenta estar en más estrecha unión, con un incremento en la interacción intercelular comparada a HUVEC, las cuales muestran espacios intercelulares entre ellas a pesar de estar conectadas. Al final del cultivo, el número de HUVEC y HUVECd no mostró diferencias (dato no mostrado).

Finalmente, dado que ZO-1 es una proteína asociada a la actina, la disposición de las fibras de actina se asocia a la localización de ZO-1. Teniendo esto en consideración, se investigó si el patrón de distribución de actina en HUVECd difiere de las de HUVEC. Para ello se tiñeron los filamentos de actina con faloidina marcada con rodamina y se observó la distribución de la f-actina mediante microscopia confocal. En las microfotografías de la Figura 4.2.1D puede observarse que en HUVEC (panel izquierdo) se observa una disposición de la f-actina más intensa en la periferia celular (disposición “tipo cinturón”); mientras que en HUVECd la disposición de los filamentos de f-actina se encuentra mayoritariamente organizada en haces paralelos intensos

transcitoplasmáticos de fibras de estrés, si bien aún mantiene cierto grado de distribución periférica.

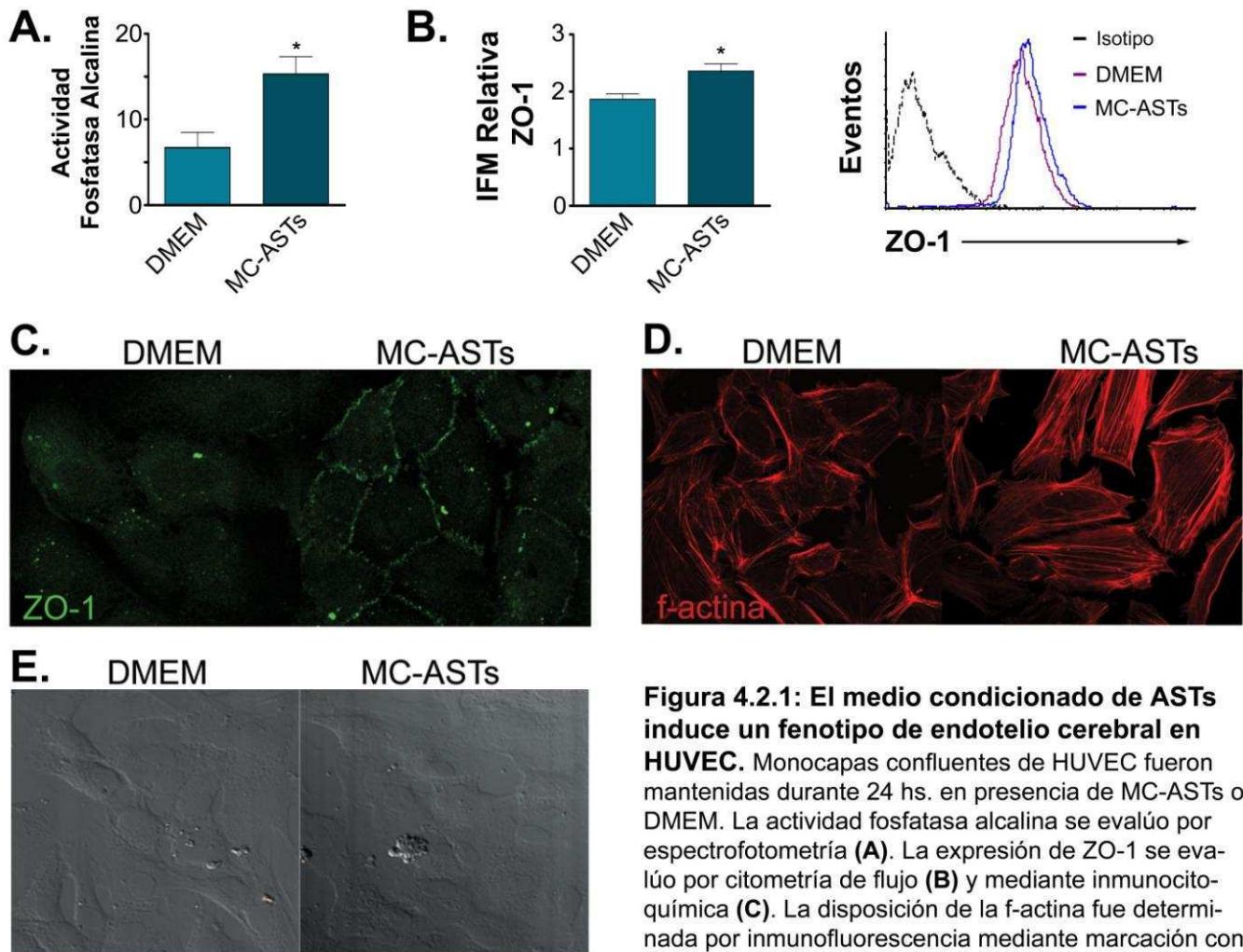


Figura 4.2.1: El medio condicionado de ASTs induce un fenotipo de endotelio cerebral en HUVEC. Monocapas confluentes de HUVEC fueron mantenidas durante 24 hs. en presencia de MC-ASTs o DMEM. La actividad fosfatasa alcalina se evaluó por espectrofotometría (A). La expresión de ZO-1 se evaluó por citometría de flujo (B) y mediante inmunocitoquímica (C). La disposición de la f-actina fue determinada por inmunofluorescencia mediante marcación con faloidina-rodamina (D). La disposición de las células en los cultivos se observó mediante contraste por interferencia diferencial (E). (A) Actividad específica de fosfatasa alcalina (Media \pm ES,). * $p < 0.05$ (MC-ASTs vs. DMEM, $n=4$). (B) Intensidad de fluorescencia media (IFM) relativa al isotipo de ZO-1 (Media ES). * $p < 0,05$ (MC-ASTs vs. DMEM, $n=3$). (C) Microfotografías mostrando el patrón de expresión de ZO-1 en HUVEC (panel izquierdo) y HUVECd (panel derecho) ($n=2$). (D) Microfotografías (proyección en Z de máxima intensidad), mostrando distribución de f-actina en HUVEC (panel izquierdo) y HUVECd (panel derecho) ($n=4$). (E) Microfotografías, mostrando las interacciones célula-célula de HUVEC (panel izquierdo) y HUVECd (panel derecho) ($n=4$). En todos los casos se muestran microfotografías de un experimento representativo.

Estos resultados demuestran que en las condiciones experimentales utilizadas la incubación de HUVEC en MC-ASTs permite obtener HUVECd con características propias de CEs cerebrales. Por lo tanto, este modelo permite simular el endotelio que

componen la BHE y evaluar los efectos de los factor/es liberados por ASTs tratados con LPS y/o Stx1.

Nota: A continuación se muestran los resultados obtenidos al evaluar los efectos de los MC-ASTs tratados con LPS y/o Stx1 sobre las HUVECs. Para evitar efectos directos de LPS y/o Stx1 remanentes en los MC en todos los experimentos se adicionó polimixina (Px) y anti-Stx a los MC-ASTs. En el Apéndice (sección 5) se incluyen los resultados que muestran la efectividad de la Px y el anti-Stx1 para bloquear los efectos del LPS y Stx1, respectivamente.

4.2.2 Stx1 induce en AST sensibilizados con LPS la liberación de factores tóxicos para HUVECs.

La respuesta inflamatoria observada en ASTs expuestos a LPS y/o Stx1 (sección 4.1.3) podría involucrar la secreción de factores tóxicos para las CEs a las que envuelven, independientemente de que estas fueran afectadas por la toxina que alcanza el SNC. Ante esta situación, y dada la estrecha interacción entre las células gliales y el endotelio, la respuesta astrocitaria podría contribuir con el daño al endotelio cerebral observado en SUH. Para evaluar esta hipótesis, se determinó la citotoxicidad inducida por MC-ASTs tratados en HUVECs. A partir de las 24 hs. los cultivos confluentes de HUVECs fueron observados al microscopio para registrar cualquier cambio en la apariencia celular (forma, refringencia o desprendimiento celular) que indicara toxicidad. Aunque ningún cambio aparente fue observado durante las primeras 48 hs., señales de toxicidad fueron evidentes a las 72hs., momento en el cual las HUVECs fueron teñidas con cristal violeta y el porcentaje de citotoxicidad fue determinado mediante recuento microscópico de células remanentes.

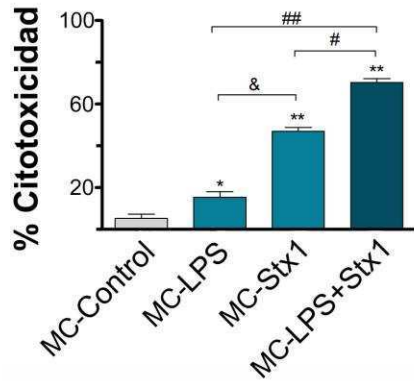
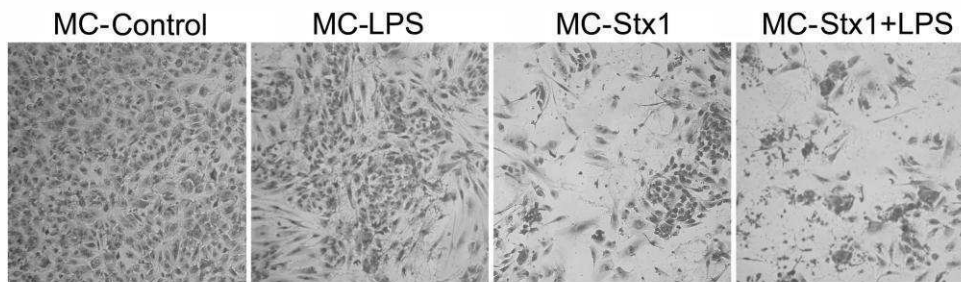


Figura 4.2.2: Aumento de la toxicidad sobre HUVECd inducida por factores liberados por ASTs tratados con LPS + Stx1. Las HUVECd fueron estimuladas por 72 hs con MC de ASTs sin tratar (MC-Control) o tratados con LPS (MC-LPS), Stx1 (MC-Stx1) o Stx1 luego de la sensibilización con LPS (MC-LPS+Stx1). Luego las HUVECd muertas fueron lavadas y las adheridas fueron teñidas para evaluar la toxicidad por recuento microscópico. Porcentaje de Citotoxicidad respecto a HUVECd sin estimular (Mean±SEM; n=5) *p<0,01 (MC-LPS o MC-Stx1 o MC-LPS+Stx1 vs. MC-Control); & p<0,01 (MC-LPS o MC-LPS+Stx1 vs. MC-Stx1); ## p<0,01 (MC-LPS+Stx1 vs. MC-LPS).



(Panel inferior) Imagen representativa mostrando HUVECd teñidas con Cristal violeta (panel inferior). Se muestran microfotografías representativas de un experimento independiente (n=5).

En la Figura 4.2.2 se observa que el MC- ASTs tratados con LPS induce una leve pero significativa citotoxicidad respecto al medio de ASTs sin tratar (MC-Control); mientras que Stx1 induce la liberación de factores que incrementan aun más la toxicidad de las HUVECd. Sin embargo, el MC-ASTs sensibilizado con LPS y expuesto a la toxina induce la mayor citotoxicidad sobre HUVECd. Microfotografías de un experimento representativo se exponen en el panel inferior. Estos resultados sugieren que la toxina induce en ASTs sensibilizados con LPS la secreción de factores que contribuyen al daño del endotelio con fenotipo cerebral.

A partir de este hallazgo, se decidió evaluar los efectos directos de los factores liberados por los ASTs tratados con LPS y/o Stx1 sobre HUVECd dentro de las primeras 24 hs. De este modo, es posible determinar que cualquier efecto sobre las HUVECd, se debe únicamente los factores secretados por los ASTs y no a la toxicidad que los mismos puedan inducir sobre las CEs.

4.2.3 Stx1 induce en ASTs sensibilizados por LPS la liberación de factores que aumentan la expresión de Gb₃ y la sensibilidad al daño por Stx1 en HUVECd.

Si bien las CEs cerebrales humanas son relativamente resistentes a Stx, la sensibilidad es incrementada en respuesta a citoquinas (Ramegowda *et al.*, 1999). Los estímulos inflamatorios como el TNF- α , sensibilizan a las CEs a los efectos tóxicos de las Stx. Estos estímulos actuarían aumentando la expresión del Gb₃ en dichas células. Considerando esto, y teniendo en cuenta que Stx1 indujo una respuesta inflamatoria en ASTs que es potenciada por la sensibilización de los ASTs con LPS (sección 4.1), se determinó si los factores liberados por los ASTs tratados con LPS y/o Stx1 modulan la expresión del receptor de la toxina en HUVECd. Para ello se evaluó por citometría de flujo la expresión de Gb₃ en HUVECd expuestas durante 24 hs. a los MC-ASTs tratados. Además, como control de regulación del Gb₃ por estímulos pro-inflamatorios, HUVECd fueron tratadas directamente con LPS. En la Figura 4.2.3A se observa que el LPS aumenta la expresión de Gb₃ en HUVECd. Por otro lado, HUVECd estimuladas con el MC-ASTs tratado con LPS induce un aumento significativo de la expresión del receptor, respecto a HUVECd estimuladas con MC-ASTs sin tratar. El máximo incremento de Gb₃ se obtuvo al tratar HUVECd con MC-ASTs de sensibilizados por LPS y tratados con Stx1.

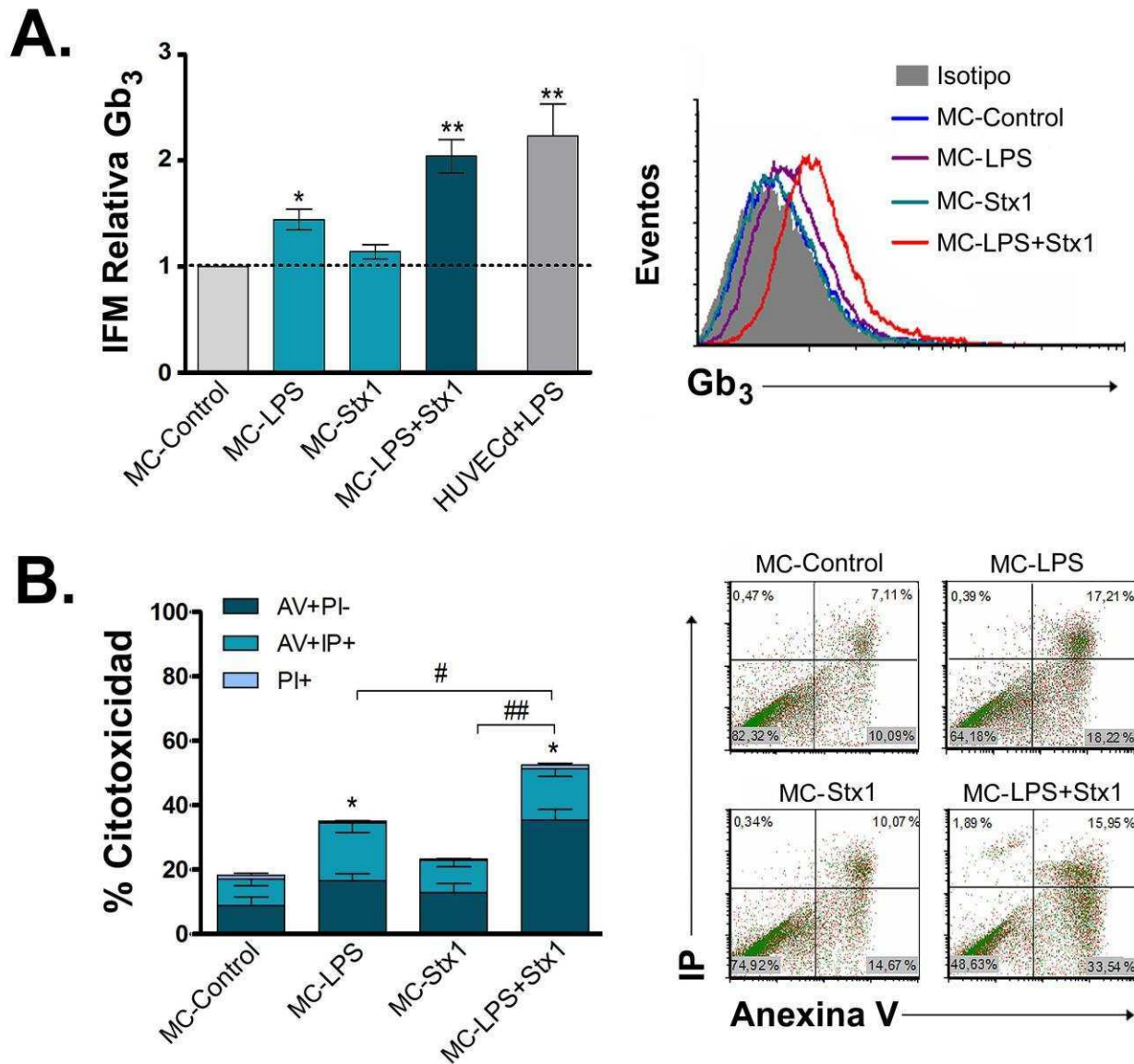


Figura 4.2.3: Aumento de la expresión de Gb₃ y la citotoxicidad mediada por Stx1 en HUVECd estimuladas con factores liberados por ASTs tratados con LPS y/o Stx1. Las HUVECd fueron estimuladas con MC-ASTs sin tratar (MC-Control) o tratados con LPS (MC-LPS), Stx1 (MC-Stx1) o Stx1 luego de la sensibilización con LPS (MC-LPS+Stx1) o con 0,5 µg/ml de LPS (HUVECd+LPS) por 24 hs. El aumento en la expresión del receptor de la toxina Gb₃ y la citotoxicidad (B) inducida por Stx1 agregada durante 18 hs. luego de remover el estímulo fueron evaluados por citometría de flujo. (A) Intensidad de fluorescencia media (IFM) de Gb₃ relativa a HUVECd sin estimular. (Media±ES). *p < 0,05 (MC-Control vs. MC-LPS); **p < 0,0002 (MC-Control vs. MC-LPS+Stx1 o HUVECd+LPS, n=3). (Panel derecho) Histograma representativo de un experimento independiente. (B) Porcentaje de citotoxicidad medido como % células PI-/Anexina V+ más % de células PI+/Anexina V+ más % células PI+/Anexina V- (n=3). (Panel derecho) Dot plot representativo de un experimento independiente.

Dado que la expresión de Gb₃ en CE_s está relacionada a su susceptibilidad a la toxina, se determinó si los MC-ASTs tratados con LPS y/o Stx1 aumentaban la toxicidad de HUVECd inducida por acción directa de Stx1. Para ello, las HUVECd fueron tratadas con los MC-ASTs. Luego de 24 hs. se retiró el estímulo y se agregó

Stx1 a una concentración subtóxica (2 ng/ml, Ver apéndice). A las 18 hs. se evaluó la toxicidad mediante el análisis de Anexina V/Ioduro de Propidio (AV/IP) por citometría de flujo. La figura 4.2.3B muestra que el porcentaje de citotoxicidad inducido por Stx1 se incrementa en HUVECd tratadas con el MC-ASTs estimulados con LPS en comparación con las HUVECd expuestas al MC-ASTs sin tratar. Sin embargo, el MC-ASTs tratados con LPS+Stx1 indujo la mayor susceptibilidad a la Stx1, observándose un incremento considerable de la muerte inducida por la Stx1.

Lo resultados presentados en la Figura 4.2.3 indican que Stx1 induce en ASTs sensibilizados por LPS la liberación de factores que sensibilizan a HUVECd a los efectos tóxicos de la Stx1, lo cual se correlaciona con el aumento en la expresión del Gb₃ en HUVECd.

4.2.4 Stx1 induce en ASTs sensibilizados con LPS la liberación de factores que disminuyen las propiedades de endotelio cerebral.

4.2.4.1 Stx1 induce en ASTs sensibilizados con LPS la liberación de factores que disminuyen la expresión de ZO-1 y modifican la disposición de los filamentos de actina en HUVECd.

La disrupción de la BHE está asociada a numerosas neuropatías, y el daño sobre las CEs que la componen puede comprometer las TJs, y por tanto, alterar las funciones de la misma causando una pérdida de la homeostasia del SNC. Además, el aumento de la permeabilidad de la BHE constituye un factor clave en la neuropatía asociada al SUH. Además, varias líneas de evidencia sugieren que alteraciones en TJs, o las proteínas asociadas a ellas como la ZO-1, actuarían como un posible mecanismo que conduce al aumento de la permeabilidad endotelial (Tai *et al.*, 2009). Por tal motivo, se determinó el efecto de los MC-ASTs tratados con LPS y/o Stx1 sobre la expresión de ZO-1 en HUVECd. Para ello, se analizó por citometría de flujo los niveles de expresión de ZO-1. La figura 4.2.4A muestra que tanto el MC-ASTs tratados

con LPS como con Stx1 induce una disminución significativa de la expresión de ZO-1. Sin embargo, esta reducción fue aún más evidente cuando las HUVECD fueron estimuladas con MC-ASTs tratados con la combinación de LPS y Stx1. La alteración de la expresión de ZO-1 fue corroborado mediante análisis microscópico por inmunofluorescencia. En las micrografías expuestas en la Figura 4.2.4B puede observarse que el patrón de marcación de ZO-1 intenso en la periferia de células HUVECD adyacentes estimuladas con MC-ASTs sin tratar se reduce significativamente en HUVECD estimuladas con MC-ASTs tratados con LPS o Stx1, en las que se distinguen escasas zonas de expresión de ZO-1. En la microfotografía de HUVECD cultivadas con MC-ASTs tratados con LPS y Stx1, ZO-1 está ausente aún en la zona de contacto entre células adyacentes.

La actina del citoesqueleto en CEs cerebrales también desempeña un papel importante en la regulación del mantenimiento de la forma celular y la integridad de membrana, mediante la interacción con componentes de las uniones intercelulares (Lee y Gotlieb, 2003; Vandenbroucke *et al.*, 2008). Por lo tanto, la modificación en la expresión y/o reorganización de la actina es considerada una de las causas de alteraciones de la permeabilidad dependiente de TJs. Teniendo en cuenta el rol de la actina en la regulación de las TJs, y dada la disminución de la expresión de ZO-1 observada con los MC-ASTs tratados, se evaluó la organización de la actina en HUVECD estimuladas 24 hs. con los MC-ASTs. Los filamentos de actina fueron visualizados con faloidina marcada con rodamina mediante microscopia confocal. Las microfotografías expuestas en la Figura 4.2.4C muestra que la actina en HUVECD en presencia de MC-ASTs sin tratar (Control) está dispuesta como fibras de estrés transcitoplasmáticas bien definidas, aunque se mantiene cierto grado de disposición periférica. Por el contrario, en las HUVECD estimuladas con MC-ASTs tratados con LPS y/o Stx1, las fibras de estrés se vuelven menos evidentes y aumenta la disposición periférica de la actina. Acompañando a la reorganización de la f-actina se observa una retracción de las CEs, con espacios intercelulares más pronunciados.

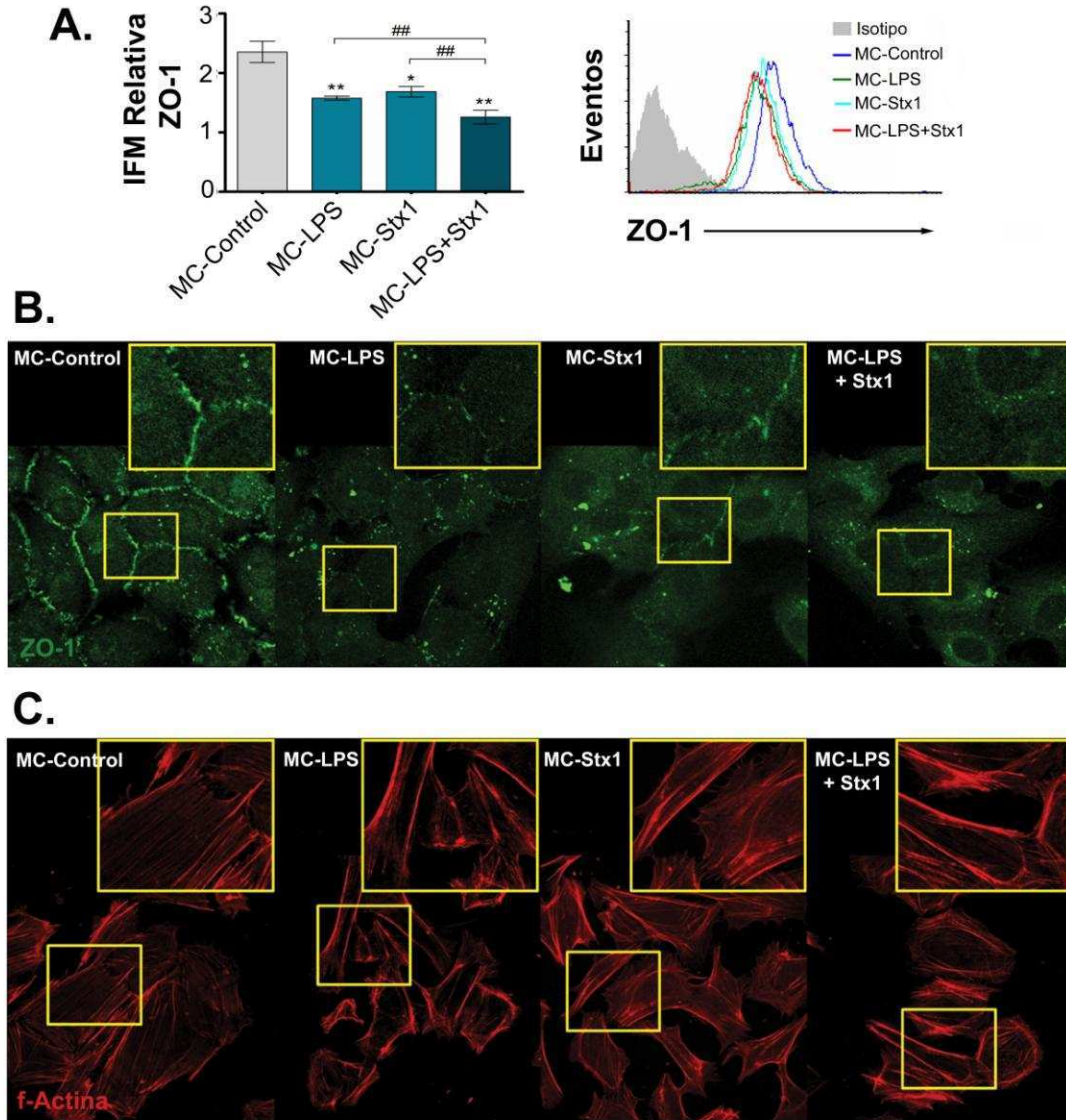


Figura 4.2.4. Disminución de la expresión de ZO-1 y remodelación de actina inducida por factor /es liberados por ASTs tratados con LPS y/o Stx1. HUVECs fueron estimuladas durante 24 hs. con sobrenadante de ASTs sin tratar (MC-Control) o tratados con LPS (MC-LPS), Stx1 (MC-Stx1) o Stx1 luego de la sensibilización con LPS (MC-LPS+Stx1). La expresión de ZO-1 se evaluó por citometría de flujo **(A)** y mediante inmunocitoquímica **(B)**. La disposición de la actina fue determinada por microscopía por marcación con faloidina asociada a rodamina **(C)**. **(A)** Intensidad de fluorescencia media (IFM) relativa al isotipo de ZO-1 (Media±ES). * $p < 0,05$ (Stx1 vs. Control); * $p < 0,0001$ (MC-LPS o MC-LPS+Stx1 vs. MC-Control); ## $p < 0,001$ (MC-LPS+Stx1 vs. MC-LPS o MC-Stx1). (n=4). **(B)** Microfotografías representativa de un experimento independiente indicando patrón de expresión de ZO-1 (n=3). **(C)** Microfotografías (proyección en Z de máxima intensidad) de un experimento independiente, mostrando distribución de actina (n=4).

Estos resultados sugieren que factores liberados por los ASTs tratados con LPS y/o Stx1 alteran la integridad de la barrera constituida por HUVECd disminuyendo la expresión ZO-1 y modificando la disposición de las fibras de actina.

4.2.4.2 Stx1 en ASTs sensibilizados con LPS induce la liberación de factores que aumentan la translocación de Stx1 a través de HUVECd.

Numerosos estudios en modelos animales han demostrado que la Stx (Fujii *et al.*, 1994; Fujii *et al.*, 1996; Goldstein *et al.*, 2007) atraviesa la BHE y se encuentra asociado al aumento de la permeabilidad paracelular de las CEs de la BHE. Considerando la disminución de la expresión de ZO-1 observada en la Figura 4.2.4 y teniendo en cuenta que Stx atraviesa la BHE *in vivo*, factores liberados por los ASTs tratados podrían aumentar la permeabilidad permitiendo el pasaje de la Stx1 a través del endotelio. Para corroborar esta hipótesis se evaluó la translocación de la Stx1 a través de HUVECd. Para ello, se realizaron experimentos en *transwell* donde HUVECd fueron sembradas en la cámara superior del inserto e incubadas durante 24 hs. con el medio condicionado de ASTS tratados con LPS y/o Stx1. Luego de retirar el estímulo, se adicionó medio completo en la cámara inferior y una solución de 30 ng/ml de Stx1 en medio completo fue cargada en la cámara superior del inserto. Transcurridos 30 min. el medio del compartimento inferior fue recuperado y la presencia de Stx1 en él fue evaluada por el ensayo de toxicidad de células Vero, una línea celular altamente sensible a la toxina. En la Figura 4.2.5 se observa un aumento significativo en el porcentaje de citotoxicidad en las células Vero inducido por la Stx1 presente en el volumen recuperado luego de que las HUVECd fueran estimuladas con MC-ASTs tratados con LPS o Stx1. Este aumento fue significativamente mayor para las HUVECd incubadas con MC-ASTs tratados con la combinación de LPS yStx1.

Estos resultados indican que factores liberados por ASTs sensibilizados con LPS y tratados con Stx1 inducen máximo aumento de la permeabilidad endotelial permitiendo la translocación la Stx1 a través del endotelio.

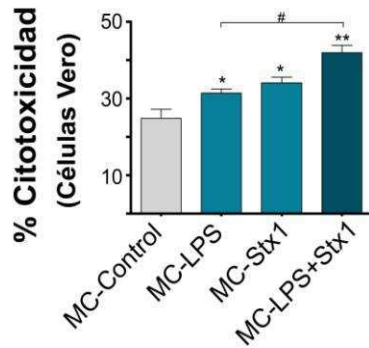


Figura 4.2.5 Aumento de la translocación de Stx1 a través de HUVECd inducida por factores liberados por ASTs tratados con LPS y/o Stx1. HUVEC fueron sembradas y diferenciadas con MC-ASTs hasta alcanzar confluencia en la cámara superior de un transwell. HUVECd fueron estimuladas durante 24 hs. con MC-ASTs sin tratar (MC-Control) o tratados con LPS (MC-LPS), Stx1 (MC-Stx1) o Stx1 luego de la sensibilización con LPS (MC-LPS+Stx1). Luego de lavar el estímulo, se agregó medio completo en la cámara inferior y una suspensión de Stx1 (30 ng/ml). A los 30 min. se realizó un bioensayo de citotoxicidad de células VERO empleando el medio de la cámara inferior para evaluar la presencia de Stx1 como porcentaje de citotoxicidad respecto a células VERO sin tratar. * $p < 0,05$ (MC-LPS+Stx1 vs. MC-Control); # $p < 0,05$ (MC-LPS+Stx1 vs. MC-LPS; $n=3$).

4.2.5 Stx1 induce en ASTs sensibilizados con LPS la liberación de factores que activan HUVECd.

Se sostiene que la activación endotelial es central en las anomalías hematológicas del SUH. Con el objetivo de determinar si factores liberados por ASTs tratados con LPS y/o Stx1 inducen activación de HUVECd, se evaluó la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y E-selectina por citometría de flujo. Para ello, HUVECd fueron incubadas con MC-ASTs tratados por 6 hs. (para el análisis de E-selectina) o 12 hs. (para el análisis de ICAM-1). Además, HUVECd fueron tratadas con LPS como control positivo del incremento de estas moléculas. En la Figura 4.2.6 se observa un incremento significativo de la expresión ICAM-1 (4.2.6A) y E-selectina (4.2.6B) exclusivamente al estimular las HUVECd con el MC-ASTs tratados con LPS+Stx1. La estimulación en la expresión de estas moléculas de adhesión fue similar a la obtenida por el estímulo de HUVECd con directamente con LPS.

Estos resultados sugieren que factores liberados por ASTs tratados con LPS y Stx1 inducen la activación de HUVECd.

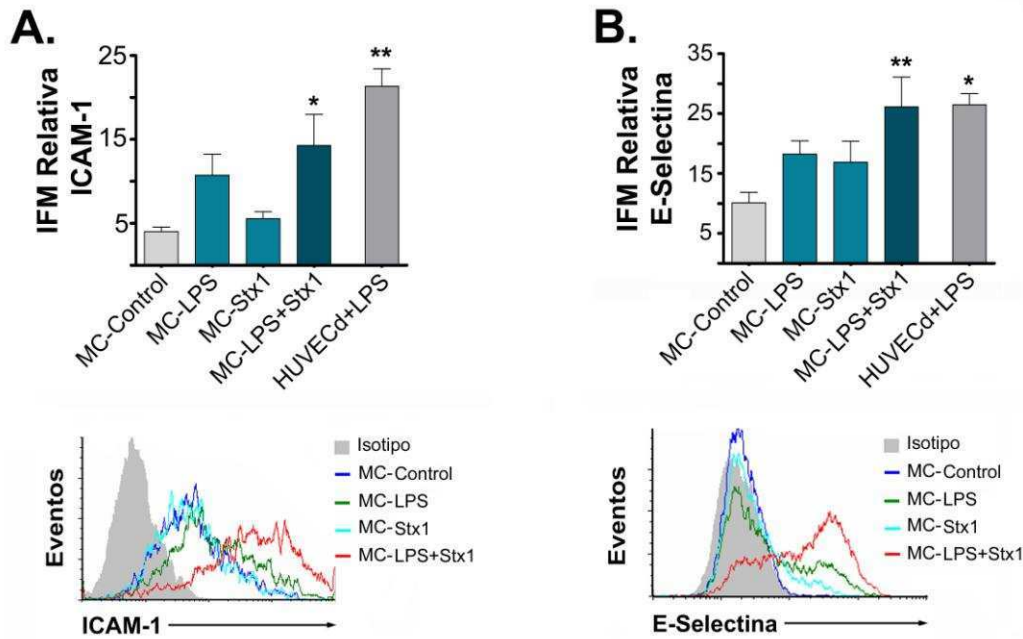


Figura 4.2.6 Aumento en la expresión de ICAM-1 y E-selectina inducida por factores liberados por ASTs tratados con LPS y Stx1 en HUVECd. HUVECd fueron incubadas en presencia de MC-ASTs no tratados (MC-Control), tratados con LPS o con Stx1 (MC-Stx1) o con Stx1 luego de la sensibilización con LPS (MC-LPS+Stx1) o con 0,5 µg/ml de LPS (MC-HUVECd+LPS). La expresión ICAM-1 (A) luego de 12 hs. y E-selectina (B) luego de 3 hs. fue evaluado por citometría de flujo. (A) Intensidad de fluorescencia media (IFM) relativa al isotipo de ICAM-1 (Media ± ES). * $p < 0,05$ (LPS+Stx1 vs. Control); $p < 0,001$ (HUVECd+LPS vs. MC-Control, $n=3$). (Panel inferior izquierdo) Se muestra un histograma representativo de un experimento independiente. (B) Intensidad de fluorescencia media (IFM) relativa al isotipo de E-selectina (Media ± ES). ** $p < 0,005$ (MC-LPS+Stx1 vs. Control); * $p < 0,05$ (MC-HUVECd+LPS vs. MC-Control, $n=3$). (Panel inferior derecho) Se muestra un histograma representativo de un experimento independiente.

4.2.6 Interacción de PMN con HUVECd inducida por factores liberados por ASTs expuestos a Stx1 y LPS.

4.2.6.1 Stx1 induce en ASTs sensibilizados con LPS la liberación de factores que estimulan la activación de PMN.

Numerosos estudios han sugerido que la activación de leucocitos es crítica en el daño endotelial. Además, en modelos animales de SUH se observó una activación de PMN tras la administración de la toxina (Fernandez *et al.*, 2000; Fernandez *et al.*, 2006). Considerando esto se determinó si los factores liberados por ASTs tratados con LPS y/o Stx1 inducen la activación de PMN. Para ello, los PMN fueron incubados

durante 40 min. o 1,5 hs con MC-ASTs para determinar por citometría de flujo la expresión de CD11b y CD66 respectivamente, dos moléculas involucradas en la adhesión a endotelio activado. La Figura 4.2.7A muestra un aumento en la expresión de CD11b en PMN estimulados con MC-ASTs tratados con LPS y Stx1. Así mismo, la Figura 4.2.7 B muestra un aumento en la expresión de CD66 en PMN estimulados con MC-ASTs tratados con LPS y Stx1. Estos resultados indican que en respuesta a Stx1 los ASTs sensibilizados con LPS liberan factores capaces de activar PMN.

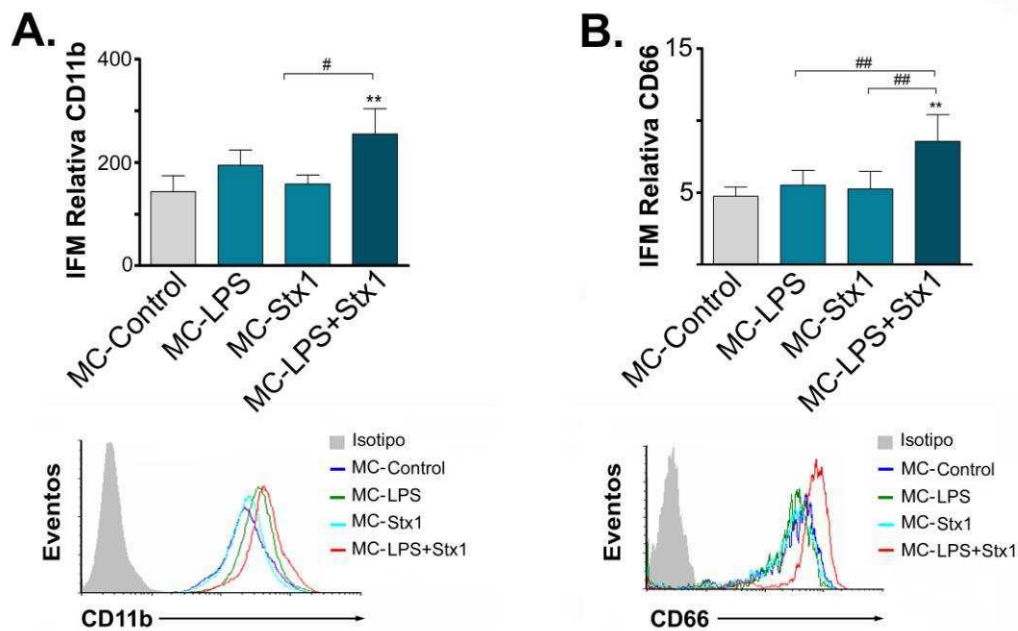


Figura 4.2.7 Aumento de la expresión CD11b y CD66 en PMN inducido por factores liberados por ASTs tratados con LPS y Stx1. PMN purificados de sangre periférica humana fueron estimulados con MC-ASTs no tratados (MC-Control), tratados con LPS o con Stx1 (MC-Stx1) o con Stx1 luego de la sensibilización con LPS (MC-LPS+Stx1) durante 40 min. o 1,5 hs. y se determinó la expresión de CD11b (**A**) y CD66 (**B**), respectivamente, por citometría de flujo. (**A**) Intensidad de fluorescencia media (IFM) relativa al isotipo de CD11b (Media±ES). ** $p < 0,005$ (MC-LPS+Stx1 vs. MC-Control); # $p < 0,05$ (MC-LPS+Stx1 vs. MC-Stx1). (Panel inferior izquierdo) Se muestra un histograma representativo de un experimento independiente ($n=4$). (**B**) Intensidad de fluorescencia media (IFM) relativa al isotipo de CD66 (Media±ES). ** $p < 0,01$ (LPS + Stx1 vs. Control); ## $p < 0,005$ (MC-LPS+Stx1 vs. MC-Stx1). (Panel inferior derecho) Se muestra un histograma representativo de un experimento independiente ($n=4$).

4.2.6.2 *Stx1* en ASTs sensibilizados con LPS induce la liberación de factores que aumentan la migración transendotelial de PMN

El endotelio de los vasos cerebrales juega un rol importante en la regulación de la entrada de células inflamatorias al cerebro. En condiciones patológicas, la BHE se vuelve permeable y permite, a la vez que facilita, el pasaje de leucocitos hacia el SNC (Williams y Hickey, 1995). Además, se ha propuesto que la producción de citoquinas (Lee *et al.*, 1993; Chung y Benveniste, 1990) y quimioquinas (Rollins *et al.*, 1990; Dixit *et al.*, 1990; Hurwitz *et al.*, 1995) por las CEs y por los ASTs son responsables tanto del reclutamiento como de la activación de leucocitos. En la sección 4.1.6 se demostró que LPS y/o *Stx1* inducen la liberación de factores quimiotácticos para PMN. Además, en las figuras 4.2.6 y 4.2.7 se observó que factores astrocitarios liberados en respuesta a LPS y *Stx1*, son capaces de inducir la activación de HUVECd y PMN. Estos resultados sugieren que estarían dadas las condiciones para la interacción entre CEs-PMN promoviendo la migración a través del endotelio. Para evaluar si factores solubles de ASTs tratados promueven la capacidad de PMN de migrar a través del endotelio, HUVECd fueron sembradas en la cámara superior de *transwell* y expuestas a los MC-ASTs tratados con LPS y/o *Stx1* por 24 hs. PMN en medio fresco fueron adicionados en el compartimento superior durante 1,5 hs. y el número de PMN migrados a la cámara inferior fue determinado. En la Figura 4.2.8A, se observa que la concentración de PMN migrados a través de la monocapa endotelial aumenta significativamente con los MC-ASTs tratados con LPS o *Stx1*. Sin embargo, la máxima trasmigración de PMN se observa con el MC-ASTs tratados con LPS+*Stx1*.

Por otro lado, se ha descrito que el pasaje de PMN a través de CEs contribuye a la ruptura de la monocapa celular. Para determinar si esto ocurrió en nuestro sistema, luego de lavar vigorosamente las HUVECd de la cámara superior para eliminar los PMN no migrados se tiñeron las monocapas. En las microfotografías de la Figura 4.2.8B puede observarse una ruptura de la monocapa luego de la migración de PMN en HUVECd tratadas con MC-ASTs tratados con LPS o con *Stx1* respecto a HUVECd mantenidas en MC-AST sin tratar. La mayor ruptura fue obtenida por la migración inducida por el MC-ASTs tratados con LPS y *Stx1*. Estos efectos no fueron observados

en tinciones de HUVECd estimuladas, sin la adición de PMN, (datos no mostrados), descartando la posibilidad de que los MC-ASTs tratados causaran estos efectos.

En resumen, estos resultados sugieren que Stx1 induce en AST sensibilizados con LPS la liberación de factores que producen máxima trans migración endotelial de PMN, causando a su vez alteración macroscópica de la linealidad endotelial.

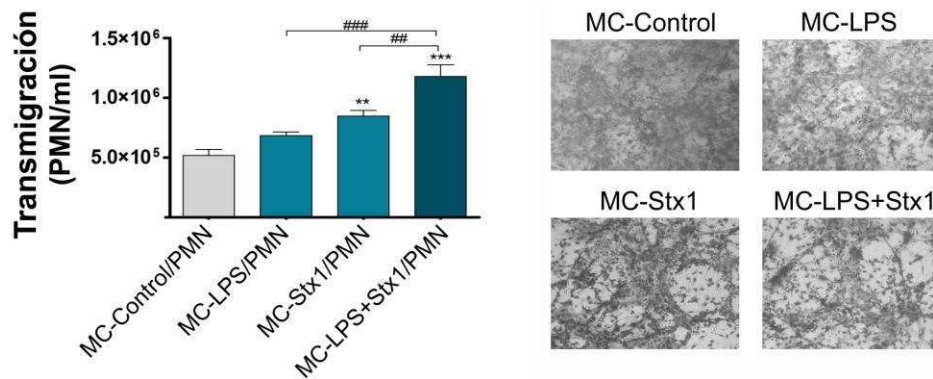


Figura 4.2.8 Aumento de la migración transendotelial de PMN y disrupción de la integridad de HUVECd inducida por MC-ASTs tratados con LPS y/o Stx1. HUVEC fueron sembradas y diferenciadas con MC-ASTs en la cámara superior de un transwell. Luego fue

ron tratadas con el MC-ASTs no tratados (MC-Control), tratados con LPS o con Stx1 (MC-Stx1) o con Stx1 luego de la sensibilización con LPS (MC-LPS+Stx1) durante 24 h previo a la adición de PMN purificados de sangre periférica humana. Tras 1,5 h los PMN migrados a la cámara inferior fueron recolectados y cuantificados en cámara de Neubauer (A) y las HUVECd fueron teñidas con Tinción 15 para evaluar por microscopia la integridad de la monocapa luego de la trans migración de PMN (B). Concentración de PMN migrados a través del endotelio. (Media±SEM, n=3). *p<0,05 (MC-LPS vs. MC-Control); **p<0.01 (MC-Stx1 o MC-LPS+Stx1 vs MC-Control); # p<0.01 (MC-LPS+Stx1 vs. MC-Stx1); ### p<0.001. (MC-LPS+Stx1 vs MC-LPS, n=3). (Panel derecho) Microfotografías representativa de un experimento independiente mostrando ruptura de la monocapa de HUVEC (n=3).

4.2.6.3 Stx1 induce en ASTs sensibilizados con LPS la liberación de factores que aumentan la adhesión de PMN y la sensibilidad al daño mediado por PMN en HUVECd.

El daño endotelial mediado por PMN puede comprometer seriamente la función de la vasculatura y los tejidos asociados. Si bien es clara la injuria del endotelio cerebral, tanto en pacientes como en modelos animales de SUH, la contribución a

dicho daño por PMN no ha sido documentada aún. Sin embargo, se ha reportado que el daño endotelial en SUH es crucial para el desarrollo de lesiones microangiopáticas y evidencias al respecto muestran que la interacción entre leucocitos y las CEs magnifica la extensión de la injuria endotelial (Andreoli, 1999; Ruggenenti *et al.*, 2001; Obrig *et al.*, 1987).

La adhesión de PMN al endotelio y la consecuente acción citotóxica es favorecida por la expresión endotelial de ICAM-1 y E-selectina. Considerando esto y dado que los factores liberados por los ASTs tratados con LPS y Stx1 son capaces de inducir la expresión de moléculas de adhesión en las HUVECd (Figura 4.2.6) se planteó la hipótesis que los ASTs expuestos a la toxina podrían promover la adhesión de PMN y consecuentemente dañar el endotelio cerebral. Con ese objetivo, las HUVECd fueron estimuladas durante 24 hs. con el MC-ASTs tratados con LPS y/o Stx1; luego el estímulo fue lavado y PMN purificados fueron añadidos al cultivo (en una relación HUVECd:PMN de 1:20). A las 3 hs. los PMN no adheridos fueron removidos tras lavar vigorosamente las monocapas. Con el fin de evaluar la adhesión de PMN a HUVECd se midió la actividad de la fosfatasa alcalina de los neutrófilos (FAN) remanentes adheridos a las CEs. Como control de cien por ciento de adhesión un *well* con PMN no recibió los lavados. Por otro lado, para determinar la citotoxicidad mediada por PMN, luego de 8 hs., los co-cultivo fueron lavados para descartar PMN y HUVECd sueltas y teñidos con el colorante cristal violeta. El porcentaje de citotoxicidad se determinó microscópicamente mediante el recuento de las HUVECd remanentes. Los resultados de la Figura 4.2.9A muestran un aumento en la adhesión de PMN en HUVECd estimuladas con MC-ASTs tratados con LPS y Stx1. Si bien parece haber una tendencia en la adhesión de PMN inducida por el MC-ASTs tratados con LPS o Stx1, esta no mostró diferencias significativas respecto al control.

En la Figura 4.2.9B se observa que los MC-ASTs tratados con LPS o con Stx1 inducen una sensibilización a la toxicidad mediada por PMN respecto a las HUVECd en presencia de MC-ASTs sin tratar. Sin embargo, esta sensibilización se vio aumentada en mayor medida cuando las HUVECd fueron pre-incubadas con el MC-ASTs tratado con la combinación de LPS y Stx1.

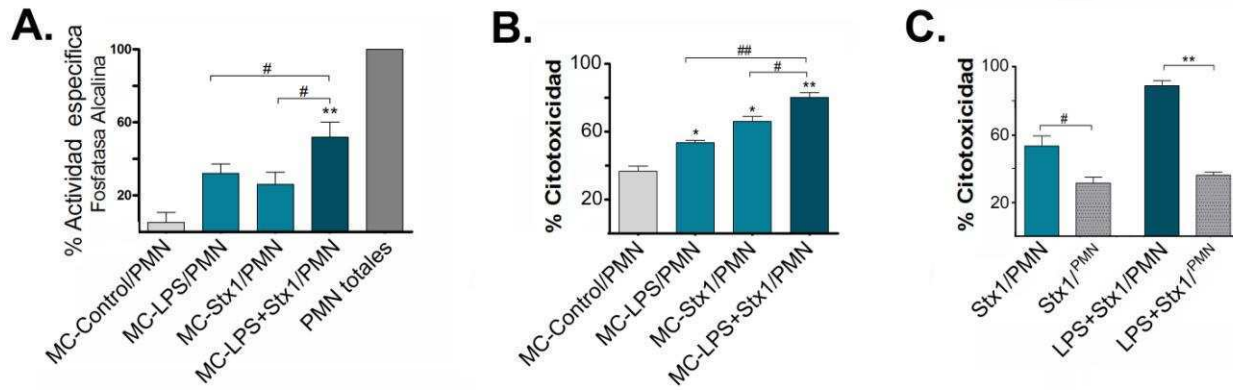


Figura 4.2.9 Aumento de la adhesión y de la citotoxicidad mediada por PMN en HUVECd inducida por factores liberados por ASTs tratados con LPS y/o Stx1. PMN fueron co-incubados con HUVEC estimuladas con MC-ASTs no tratados (MC-Control) o tratados con LPS (MC-LPS/PMN), Stx1 (MC-Stx1/PMN) o con Stx1 luego de la sensibilización con LPS (MC-LPS+Stx1/PMN). Para la adhesión, las 3 hs. se lavaron los PMN no adheridos, dejando un well sin lavar (PMN total) para evaluar la adhesión de PMN total. La actividad fosfatasa alcalina de los PMN adheridos se midió por espectrofotometría **(A)**. A las 8 hs. se lavaron los PMN y por recuento microscópico de HUVECd remanentes teñidos con cristal violeta se determinó la citotoxicidad **(B)**. Para evaluar la dependencia de contacto en la citotoxicidad **(C)**, PMN fueron cultivados 8 hs. en contacto (^{PMN}) o sin contacto en un sistema transwell (^{PMN}) con HUVECd estimuladas durante 24 hs. con MC-ASTs no tratados (MC-Control/PMN) o tratados con LPS y Stx1. **(A)** Porcentaje de actividad específica de FAP respecto a PMN no lavados. ** $p < 0.001$ (MC-LPS+Stx1/PMN vs. MC-Control/PMN); # $p < 0.05$ (MC-LPS+Stx1/PMN vs. MC-LPS o MC-Stx1/PMN, $n=6$). **(B)** Porcentaje de Citotoxicidad respecto a HUVECd sin PMN. * $p < 0.05$ (LPS o Stx1 vs Control); ** $p < 0.001$ (MC-LPS+Stx1/PMN vs. MC-Control/PMN); # $p < 0.01$ (MC-LPS+Stx1/PMN vs MC-Stx1/PMN); ## $p < 0.01$ (MC-LPS+Stx1/PMN vs MC-LPS/PMN), ($n=3$). **(C)** Porcentaje de Citotoxicidad respecto a HUVECd sin PMN. ** $p < 0.0001$ (MC-LPS+Stx1/PMN vs. MC-LPS+Stx1/^{PMN}); # $p < 0.01$ (MC-Stx1/PMN vs- MC-Stx1/^{PMN}), ($n=2$).

Para determinar si la citotoxicidad mediada por PMN es dependiente de la interacción con las HUVECd, se realizó el experimento descrito en figura 4.2.9B en HUVECd estimuladas con MC-ASTs tratados, permitiendo la interacción entre PMN y HUVECd, e impidiendo el contacto sembrando los PMN en la cámara superior de *transwell*. La Figura 4.2.9C muestra que la citotoxicidad mediada por PMN cuando los PMN interactúan con las HUVECd tratadas es evitada si los PMN se encuentran aislados en la cámara superior del *transwell*.

Estos resultados indican que Stx1 induce en ASTs sensibilizados con LPS la liberación de factores que favorecen la adhesión de PMN e incrementan la susceptibilidad de las HUVECd al daño mediado por PMN; y este daño es dependiente del contacto con las HUVECd.

4.2.7 Stx1 induce en AST sensibilizados con LPS la liberación de factores que inducen un estado procoagulante en HUVECd.

4.2.7.1 Stx1 induce en ASTs sensibilizados con LPS la liberación de factores que inducen la liberación de Factor von Willebrand en HUVECd.

El endotelio en condiciones fisiológicas produce numerosas sustancias que previenen la activación plaquetaria y la formación de coágulos de fibrina (Wu y Thiagarajan, 1996). Por otro lado, en el estado activado el endotelio puede sintetizar mediadores que actúan en contra de los sistemas anticoagulantes, como el Factor von Willebrand (FvW) y el inhibidor de activador plasminógeno, entre otros. Se sostiene que la activación endotelial, con la liberación de FvW y la consecuente agregación plaquetaria es central en las anomalías hematológicas durante la falla renal del SUH (Remuzzi y Ruggenti, 1995; Moake, 1994).

Dada la estrecha relación entre ASTs y el endotelio cerebral, factores liberados por ASTs expuestos a la toxina y/o al LPS, podrían contribuir al establecimiento del estado pro-agregante de CEs. Por este motivo, se evaluó por medio de un ELISA la liberación de FvW en HUVECd expuestas a MC-ASTs tratados con LPS y/o Stx1. La figura 4.2.10 muestra un incremento en la secreción de FvW inducida por MC-ASTs tratados con LPS. Sin embargo, un mayor incremento pudo observarse con MC-ASTs sensibilizados con LPS y expuestos a Stx1.

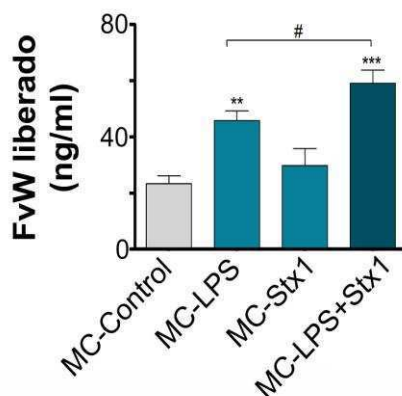


Figura 4.2.10 Aumento de la liberación de Factor von Willebrand inducido por factores liberados por ASTs tratados con LPS o LPS y Stx1. HUVECd fueron estimuladas durante 24 hs. con MC-ASTs no tratados (MC-Control), tratados con LPS (MC-LPS) o con Stx1 (MC-Stx1) o con Stx1 luego de la sensibilización con LPS (MC-LPS+Stx1). La liberación de FvW fue determinada por ELISA. Se grafica la concentración (ng/ml) de FvW liberado. **p < 0,01 (LPS vs. Control); ***p < 0,001 (MC-LPS+Stx1 vs. MC-Control) ; # p < 0,05 (MC-LPS+Stx1 vs. MC-LPS, n=6).

4.2.7.2 *Stx1* induce en AST sensibilizados con LPS la liberación de factores que inducen la activación de plaquetas.

Se ha determinado, tanto en pacientes como en modelos animales de SUH, diversas complicaciones del SNC. Entre ellas, edema cerebral difuso, regiones de infarto e isquemia y en particular la formación de microtrombos (Hahn *et al.*, 1989). En este sentido, a nivel local, los ASTs cercanos al endotelio comprometido, podrían contribuir/potenciar la activación plaquetaria y la consecuente formación de microtrombos cerebrales. Para corroborar esta hipótesis, se determinó si factores liberados por ASTs tratados con LPS y/o *Stx1* inducen la activación plaquetaria y su adhesión al endotelio. Para ello, se evaluó la expresión de P-selectina por citometría de flujo en plaquetas estimuladas con los distintos MC-ASTs durante 1,5 hs. Como se observa en la Figura 4.2.11A, la expresión de P-selectina plaquetaria fue aumentada por el MC-ASTs tratados con LPS y *Stx1*. En concordancia con el aumento en la activación, en la Figura 4.2.11B se observa un incremento significativo del porcentaje de plaquetas con alta expresión de P-selectina inducido por factores liberados por ASTs tratados con LPS y *Stx1*.

Para evaluar la adhesión plaquetaria, se estimularon HUVECd durante 24 hs. con el MC-ASTs tratados con LPS y/o *Stx1*. Luego, el estímulo fue retirado y se agregó MC-ASTs tratados fresco. Plaquetas purificadas fueron sembradas sobre las HUVECd (relación HUVEC/plaquetas 1:20). Transcurrida 1.5 hs, las plaquetas no adheridas fueron removidas por repetidos lavados. La adhesión de plaquetas a HUVECd fue evaluada indirectamente mediante la determinación del porcentaje de actividad específica de la enzima fosfatasa acida plaquetaria (FAP). Como control de cien por ciento de adhesión, un *well* con plaquetas no recibió los lavados. La figura 4.2.11C muestra un incremento en el porcentaje de actividad FAP inducido por el MC-ASTs tratados con LPS y *Stx1*. Los resultados de la Figura 4.2.11 indican que en respuesta al LPS y *Stx1* los ASTs liberan factores capaces de activar plaquetas y promover la adhesión de plaquetas a HUVECd.

En conjunto, los resultados de las figuras 4.2.10 y 4.2.11 sugieren que factores liberados por ASTs expuestos a la toxina y al LPS inducen un estado procoagulante en HUVECd, induciendo la liberación de FvW, la activación de plaquetas y favoreciendo la adhesión plaquetaria.

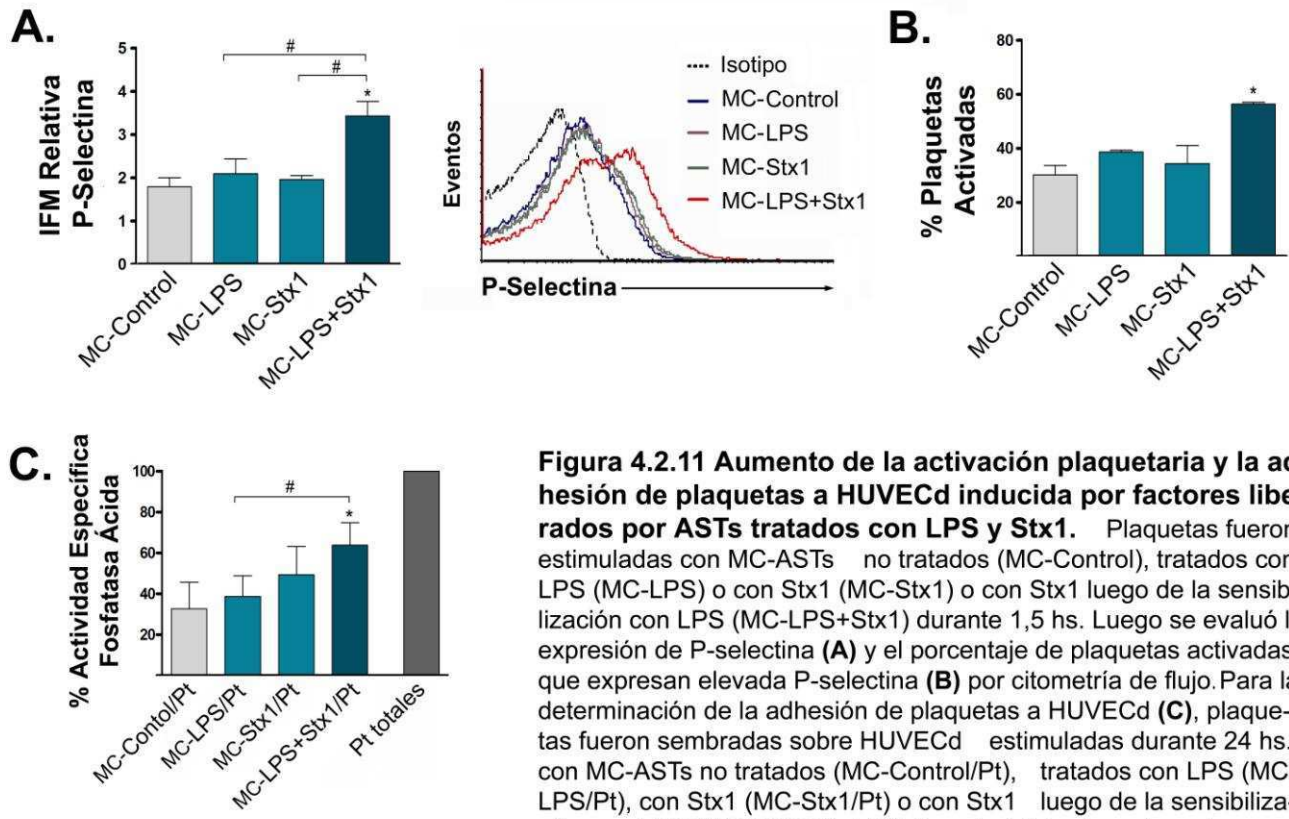


Figura 4.2.11 Aumento de la activación plaquetaria y la adhesión de plaquetas a HUVECd inducida por factores liberados por ASTs tratados con LPS y Stx1. Plaquetas fueron estimuladas con MC-ASTs no tratados (MC-Control), tratados con LPS (MC-LPS) o con Stx1 (MC-Stx1) o con Stx1 luego de la sensibilización con LPS (MC-LPS+Stx1) durante 1,5 hs. Luego se evaluó la expresión de P-selectina **(A)** y el porcentaje de plaquetas activadas que expresan elevada P-selectina **(B)** por citometría de flujo. Para la determinación de la adhesión de plaquetas a HUVECd **(C)**, plaquetas fueron sembradas sobre HUVECd estimuladas durante 24 hs. con MC-ASTs no tratados (MC-Control/Pt), tratados con LPS (MC-LPS/Pt), con Stx1 (MC-Stx1/Pt) o con Stx1 luego de la sensibilización con LPS (MC-LPS+Stx1/Pt) durante 1,5 hs. Las plaquetas no

adheridas fueron lavadas y la actividad FAP de las plaquetas remanentes adheridas fue determinada mediante espectrofotometría. Como control de adhesión máxima plaquetas sembradas sobre HUVECd sin tratar no fueron lavadas (Pt totales). **(A)** Intensidad de fluorescencia media (IFM) relativa al isotipo de P-selectina (Media+/-ES). *p < 0,05 (MC-LPS+Stx1 vs. MC-Control); # p < 0,05 (MC-LPS+Stx1 vs. MC-Stx1 o LPS). (Panel derecho) Se muestra un histograma representativo de un experimento independiente. (n=6). **(B)** Porcentaje de plaquetas activadas. *p < 0,05 (MC-LPS+Stx1 vs. MC-Control, n=6). **(C)** Porcentaje de actividad específica de FAP respecto a la actividad total de plaquetas. *p < 0,05 (MC-LPS+Stx1/PI vs. MC-Control/PI); # p < 0,05 (MC-LPS+Stx1 vs. MC-LPS/PI, n=6).

4.2.8 La inhibición de NF- κ B o el bloqueo del TNF- α endógeno en ASTs tratados con LPS y Stx1 suprime los efectos observados sobre HUVECd.

En la sección 4.1. se demostró que la inhibición del NF- κ B (por BAY 11-7082) o el bloqueo del TNF- α secretado (por Etanercept) impide la activación y la respuesta inflamatoria de AST expuestos a Stx1 y LPS .

Considerando esto se investigó si los efectos observados en HUVECd, PMN y plaquetas fueron inducidos por factores solubles producidos de manera dependiente de la activación de NF- κ B en ASTs tratados con LPS y Stx1. Además, se evaluó si los efectos fueron inducidos por el TNF- α secretado por los ASTs. Para ello, los experimentos de la Figura 4.2.12 fueron realizados con el MC-ASTs tratados LPS y Stx1 o tratados con Etanercept o BAY 11-7082 previo a la adición de LPS y Stx1.

Como muestra la Figura 4.2.12, no se registró un aumento en la expresión del Gb3 en HUVECd (Figura 4.2.12A) ni el incremento consecuente en la sensibilidad a la toxina (Figura 4.2.12B). Así mismo, la disminución de ZO-1 no fue observada en HUVECd (Figura 4.2.12C). Un comportamiento similar se encontró en la activación endotelial medida como la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y E-selectina (Figura 4.2.12D) y la liberación del FvW (Figura 4.2.12E). Además, como se ilustra en la Figura 4.2.12F, no se observó activación de PMN. Finalmente, ni el incremento en la expresión de P-selectina ni en el porcentaje de plaquetas activadas (Figura 4.2.12G) fueron observadas.

En suma, los resultados mostrados en la Figura 4.2.12 indican que la activación de NF- κ B en ASTs es necesaria para la secreción de factores que inducen la activación endotelial, plaquetaria y de PMN, así como el aumento en la expresión del receptor de Stx1 y la sensibilidad a la toxina en HUVECd. Además permiten proponer al TNF- α liberado por ASTs tratados con LPS y Stx1 como el factor responsable de estos efectos.

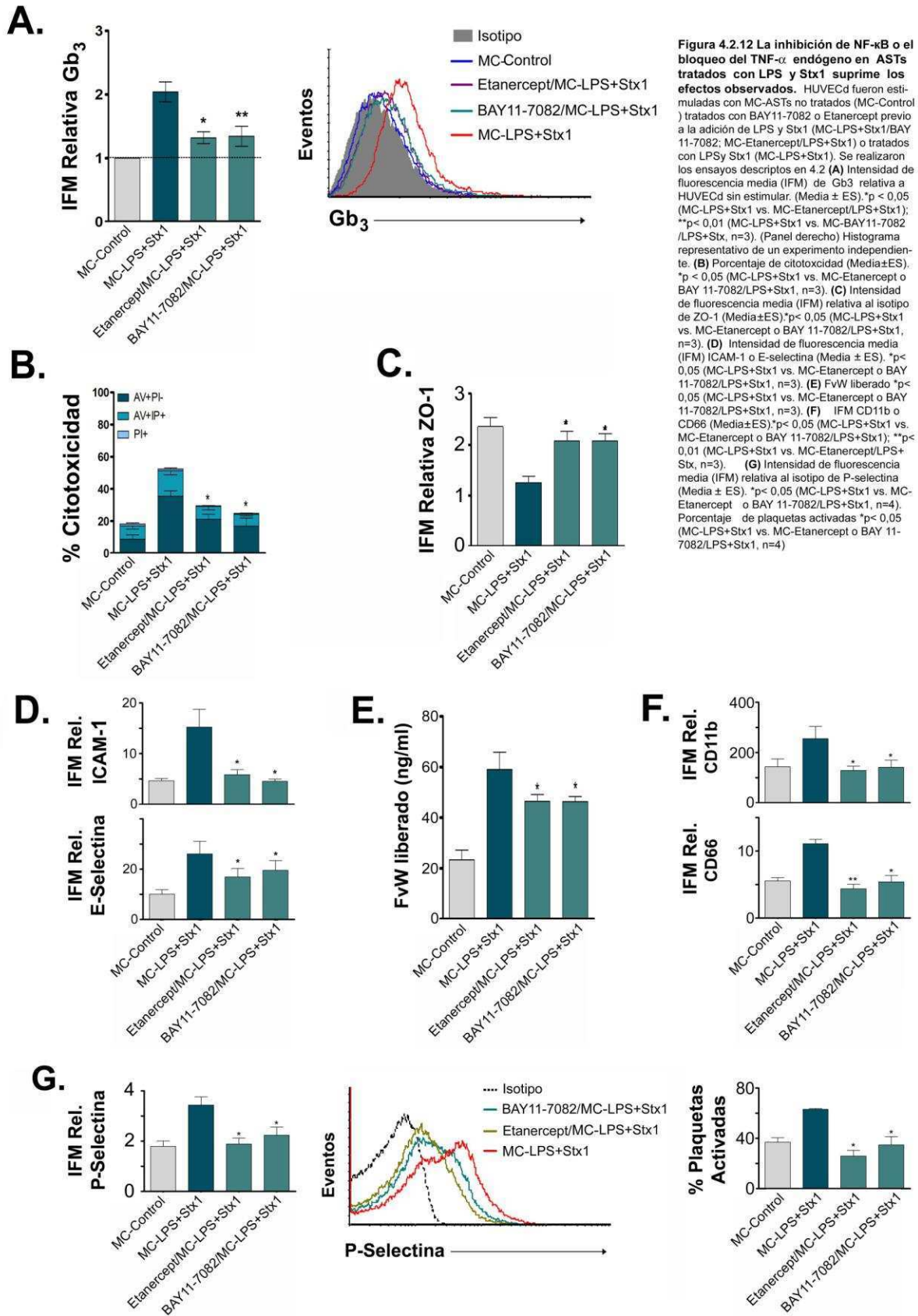


Figura 4.2.12 La inhibición de NF- κ B o el bloqueo del TNF- α endógeno en ASTs tratados con LPS y Stx1 suprime los efectos observados. HUVeCd fueron estimuladas con MC-ASTs no tratados (MC-Control) tratados con BAY11-7082 o Etanercepto previo a la adición de LPS y Stx1 (MC-LPS+Stx1/BAY11-7082; MC-Etanercept/LPS+Stx1) o tratados con LPSy Stx1 (MC-LPS+Stx1). Se realizaron los ensayos descritos en 4.2 (A) Intensidad de fluorescencia media (IFM) de Gb₃ relativa a HUVeCd sin estimular. (Media \pm ES). * p < 0,05 (MC-LPS+Stx1 vs. MC-Etanercept/LPS+Stx1); ** p < 0,01 (MC-LPS+Stx1 vs. MC-BAY11-7082/LPS+Stx, n=3). (Panel derecho) Histograma representativo de un experimento independiente. (B) Porcentaje de citotoxicidad (Media \pm ES). * p < 0,05 (MC-LPS+Stx1 vs. MC-Etanercept o BAY 11-7082/LPS+Stx1, n=3). (C) Intensidad de fluorescencia media (IFM) relativa al isotipo de ZO-1 (Media \pm ES)* p < 0,05 (MC-LPS+Stx1 vs. MC-Etanercept o BAY 11-7082/LPS+Stx1, n=3). (D) Intensidad de fluorescencia media (IFM) ICAM-1 o E-selectina (Media \pm ES). * p < 0,05 (MC-LPS+Stx1 vs. MC-Etanercept o BAY 11-7082/LPS+Stx1, n=3). (E) FvW liberado * p < 0,05 (MC-LPS+Stx1 vs. MC-Etanercept o BAY 11-7082/LPS+Stx1, n=3). (F) IFM CD11b o CD66 (Media \pm ES)* p < 0,05 (MC-LPS+Stx1 vs. MC-Etanercept o BAY 11-7082/LPS+Stx1); ** p < 0,01 (MC-LPS+Stx1 vs. MC-Etanercept/LPS+Stx, n=3). (G) Intensidad de fluorescencia media (IFM) relativa al isotipo de P-selectina (Media \pm ES). * p < 0,05 (MC-LPS+Stx1 vs. MC-Etanercept o BAY 11-7082/LPS+Stx1, n=4). Porcentaje de plaquetas activadas * p < 0,05 (MC-LPS+Stx1 vs. MC-Etanercept o BAY 11-7082/LPS+Stx1, n=4)

Resumen Sección 4.2

Stx1 induce en ASTs sensibilizados por LPS la liberación de factores que:

- ☀ Inducen citotoxicidad de HUVECd.
- ☀ Aumentan en HUVECd la expresión del receptor Gb₃ y la sensibilización los efectos tóxicos de Stx1.
- ☀ Alteran la expresión de ZO-1 y la disposición de la actina en HUVECd.
- ☀ Aumentan la translocación de la Stx1 a través de HUVECd.
- ☀ Aumentan la expresión de moléculas de adhesión y la liberación de FvW en HUVECd.
- ☀ Activan PMN y plaquetas.
- ☀ Aumentan la adhesión de PMN y plaquetas a HUVECd.
- ☀ La liberación de factores astrocitarios en respuesta a Stx1 y LPS es dependiente de la activación de NF-κB en ASTs.

5. APENDICE

Determinación de concentraciones de trabajo y controles experimentales

A.1- Determinación de la concentración óptima de Stx1 para evaluar su efecto sobre ASTs.

Para estudiar la respuesta inflamatoria inducida por Stx1 y su modulación por LPS en ASTs se determinó la concentración de Stx1 que indujera mínima toxicidad y al mismo tiempo máxima activación astrocitaria. Para ello, se evaluó por citometría de flujo la muerte de ASTs realizando una marcación con Anexina V-FITC/ Ioduro de propidio (PI) y la activación determinando el incremento en la expresión de GFAP, a diferentes concentraciones de Stx1 (10, 25 y 100 ng/ml) luego de 72 hs. de agregar la toxina.

La Figura A.1A muestra que Stx1 no induce activación astrocitaria aún a la mayor concentración empleada. El aumento de la expresión de GFAP en ASTs sensibilizados por LPS fue la misma para cualquiera de las concentraciones de Stx1 utilizadas. Este resultado indica que la máxima activación de ASTs se alcanza con 10 ng/ml de Stx1.

En la Figura A.1 B se observa que Stx1 sólo no indujo la muerte de ASTs. Sin embargo, 25 y 100 ng/ml de Stx1 indujo un incremento considerable de la toxicidad (~30%) comparada con la inducida por 10 ng/ml de Stx1 en ASTs sensibilizados por LPS (~15%). Este resultado indica que 25 ng/ml de Stx1 es suficiente para inducir máxima citotoxicidad en ASTs sensibilizados por LPS.

Teniendo en cuenta estos resultados se decidió emplear la concentración de Stx1 de 10 ng/ml para llevar a cabo los experimentos puesto que induce máxima activación y mínima toxicidad en ASTs sensibilizados por LPS.

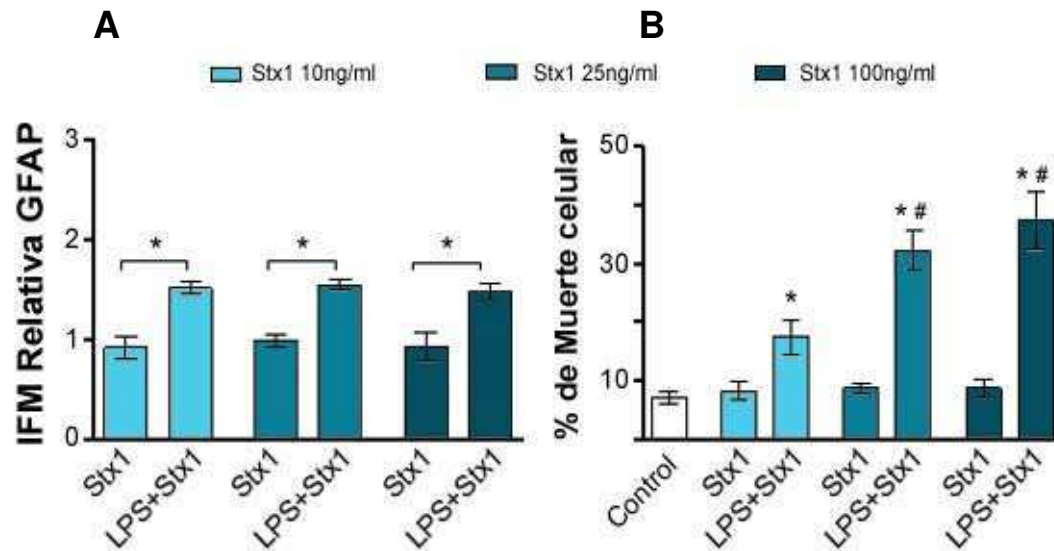


Figura A.1 Máxima activación y menor citotoxicidad en ASTs inducida por 10 ng/ml de Stx1.

Los ASTs fueron cultivados en medio completo (control) o en presencia de 0,5 µg/ml LPS (0 a 72 hs.) y/o 10, 25 o 100 ng/ml de Stx1 (18 hs. luego del pretratamiento con LPS).

La inmunomarcación de GFAP intracelular (A) y el análisis de la muerte celular (B) fueron realizadas mediante citometría de flujo. (A) Mediana de la intensidad de fluorescencia (IFM) relativa al Control de la inmunomarcación para GFAP intracelular (media ± ES) medida las 72 hs. luego del tratamiento con Stx1. *p<0,01 (LPS+Stx1 vs. Stx1). n=3. (B) Los porcentajes de muerte celular (media ± error estándar de las medias [ES]) luego 72 hs. de tratamiento con Stx1. *p<0,01 (LPS+Stx1 10 o 25 o 100 ng/ml vs. Control); #p<0,05 (LPS+Stx1 25 o 100 ng/ml vs. LPS+Stx1 10 n/ml). n=3.

A.2 El inhibidor Etanercept 11-7082 bloquea la actividad de TNF-α derivado de ASTs de rata.

El inhibidor de TNF-α Etanercept 11-7082 consiste en una proteína quimérica en la que el receptor soluble de TNF-α humano está asociado a la porción Fc de una inmunoglobulina. Si bien numerosos reportes en la literatura avalan el uso de este inhibidor aún para el bloqueo de TNF-α de especies distintas a la humana, se realizaron experimentos control para determinar que la dosis de Etanercept empleada en el trabajo uniera y bloquearan de manera eficiente la acción de TNF-α recombinante de rata (rrTNF-α). Para ello, se empleó un bioensayo de toxicidad de células L929, una línea sensible al TNF-α. En la figura A.2 se muestra que la viabilidad de L929 (medida como densidad óptica a 550 nm y multiplicada por 1000) es reducida de manera

dependiente de dosis al incrementar la concentración de rrTNF- α (Control). Cuando las distintas dosis de rrTNF- α en combinación con 5 ng/ml de Etanercept se agregan a las células no se observa disminución de la viabilidad de las L929 (Etanercept). Estos resultados confirman el uso de 5 ng/ml de Etanercept para inhibir la acción del TNF- α de rata. Esta concentración de Etanercept es la empleada en las experiencias subsiguientes.

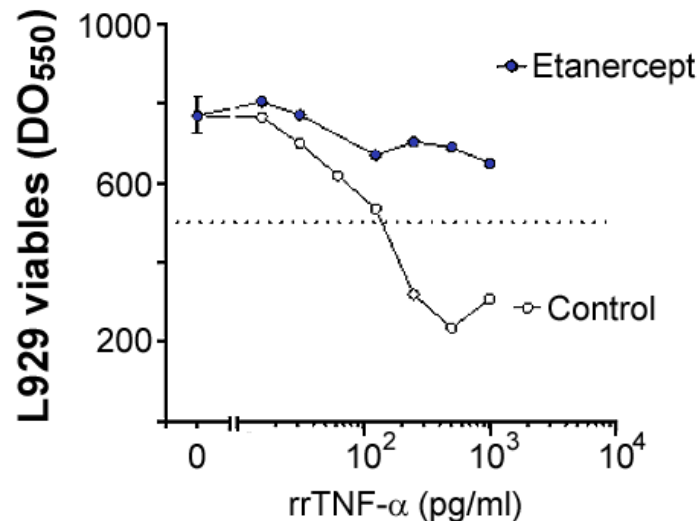


Figura A.2 Etanercept bloquea e inhibe los efectos tóxicos de TNF- α de rata sobre células L929.

Células L929 fueron tratadas con distintas concentraciones de rrTNF- α en ausencia (Control) o presencia (Etanercept) de 5 ng/ml de Etanercept. La actividad de TNF- α fue estimada por el ensayo de citotoxicidad en células L929 como densidad óptica X1000 a 550 nm (DO₅₅₀).

A3- MC-ASTs tratados con LPS y Stx1 no presenta actividad Stx1 al adicionarle anticuerpo bloqueante de Stx.

En los ensayos donde se utiliza el MC-ASTs tratado con LPS y/o Stx1 para evaluar los efectos de factores solubles astrocitarios, se adicionó al MC anticuerpo bloqueante anti-Stx a fin de evitar los efectos directos de Stx1 remanente en los mismos. Para confirmar que el MC-ASTs tratados el anticuerpo anti-Stx bloquea de manera eficiente la toxina se evaluó la actividad citotóxica en células Vero sensibles inducida por 10ng/ml Stx1 (la concentración empleada para estimular ASTs) o por MC-ASTs tratados con LPS y Stx1, agregando previamente anti-Stx. La Figura A3 muestra que los

efectos tóxicos de 10 ng/ml Stx1 (barra azul) logran ser suprimidos por el anticuerpo bloqueante anti-Stx y que el MC-ASTs tratado con LPS y Stx1 en presencia de anti-Stx no posee actividad tóxica para las Vero.

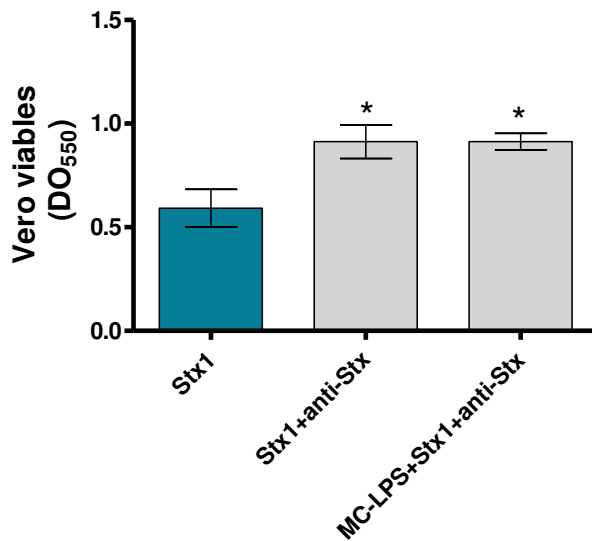


Figura A3 El MC-ASTs tratados con LPS y Stx1 no posee actividad citotóxica de células Vero al adicionar anti-Stx.

Células Vero fueron tratadas con 10 ng/ml de Stx1 en ausencia (Stx1) o presencia de anti-Stx (Stx1+anti-Stx1) o con el MC-ASTs tratados con LPS y Stx1 al que se le adicionó anti-Stx (MC-LPS+Stx1+anti-Stx). La actividad de Stx1 fue estimada por el ensayo de citotoxicidad en células Vero como densidad óptica X1000 a 550 nm (DO₅₅₀) de las células viables. * $p < 0,05$ (Stx1 vs. Stx1+anti-Stx o MC-LPS+Stx1+anti-Stx). n=5.

A4- La Polomixina (Px) inhibe los efectos inducido por LPS

En los ensayos donde se utiliza MC-ASTs tratado con LPS y/o Stx1 para evaluar los efectos de factores solubles derivados de ASTs, se adicionó 7 $\mu\text{g/ml}$ Px a fin de evitar efectos directos de LPS remanentes en los MC-ASTs. La Px se preparó en el momento y se agregó al MC-ASTs 10 min. antes de utilizarlo como estímulo en los diferentes ensayos. Paralelamente, se realizó un control estimulando con 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de LPS en ausencia o presencia de Px. para asegurar la capacidad inhibitoria de la Px en cada ensayo.

En la Figura A4 se ilustran los resultados de estos controles observándose que la Px inhibe los efectos inducidos por LPS. Estos resultados aseguran que la Px agregada a los MC-ASTs tratados logra inhibir el LPS que pudiera quedar remanente.

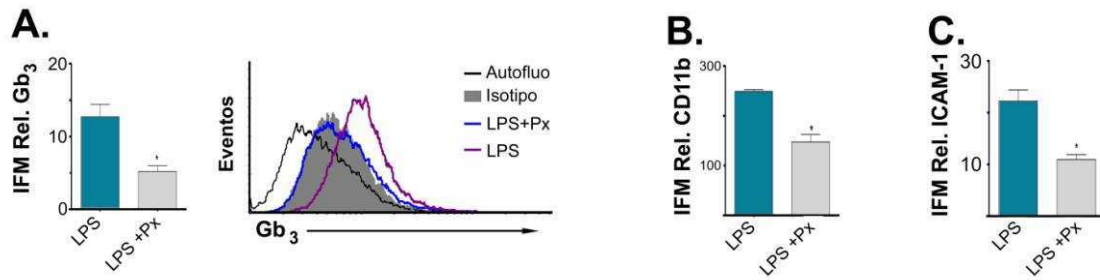


Figura A4. La Px inhibe los efectos de inducido por LPS.

HUVECd , PMN o plaquetas fueron cultivados en medio completo (control) o estimuladas con 0,5 µg/ml LPS en ausencia (LPS) o presencia de Px (LPS+Px) durante 24 hs. , 40 mis. o 12 hs. para la medición de Gb₃, CD11b o ICAM-1 respectivamente . La evaluación de los niveles de Gb₃ en HUVECd **(A)**, la expresión de CD11b en PMN **(B)** y la expresión de ICAM-1 en HUVECd **(C)** se determinó por citometría de flujo. **(A)** IFM rel. (relativo al isotipo) del receptor Gb₃ en HUVECd (media ± ES). *p<0,01 LPS vs. LPS+Px, (n=2). (Panel derecho) Histogramas de un experimento representativo. **(B)** IFM rel. (relativa al isotipo) de CD11b. (media ± ES). *p<0,05 LPS vs. LPS+Px, (n=3). **(C)** IFM rel. (relativa al isotipo) de ICAM-1. (media ± ES). *p<0,05 LPS vs. LPS+Px, (n=3).

6. DISCUSIÓN

6.1 Efecto de Stx1 sobre ASTs sensibilizados por LPS

Las complicaciones afectando al sistema nervioso central (SNC) son determinantes en la morbilidad y mortalidad en la fase aguda de las infecciones causadas por STEC. Aunque las complicaciones de la patogénesis que involucran al SNC no son aún completamente comprendidas, la alteración y/o incremento en la permeabilidad de la BBB y la injuria neuronal, consecuente al daño de las BECs, son eventos centrales durante la fase aguda del SUH (Zoja *et al.*, 1992).

Los ASTs comprenden el 55–60% del total de células del cerebro humano (Eng y Ghirnikar, 1994) y están involucrados virtualmente en toda la patología del cerebro. Esto se debe, al menos en parte, a su potencial inflamatorio, ya que los ASTs son considerados la principal fuente celular de TNF- α y ON, dos mediadores asociados a las patologías del SNC (Fan *et al.*, 1996; Murphy, 2000). Por lo tanto, el estudio de la respuesta celular de los ASTs a Stx1 y al LPS es esencial para comprender la neuropatología observada en los casos severos de SUH. Aunque la toxicidad mediada por Stx en neuronas y CEs cerebrales ha sido previamente demostrada (Goldstein *et al.*, 2007; Fujii *et al.*, 1994a), poco se sabe sobre los efectos de Stx sobre los ASTs. En referencia a esto, se ha documentado recientemente que la administración intracerebroventricular de Stx2 en ratas adultas causa la activación de los ASTs (Boccoli *et al.*, 2008; Goldstein *et al.*, 2007). Sin embargo, su efecto sobre la respuesta inflamatoria de los ASTs no fue estudiada.

Los resultados mostrados en la sección 4.1 señalan que el pretratamiento con LPS potencia los efectos de Stx1. La unión de la toxina al receptor Gb₃ es el determinante primario de un efecto citotóxico y patológico de las Stxs (Paton y Paton, 1998). Trabajos previos han remarcado el rol de los agentes proinflamatorios en la sensibilización a los efectos de la Stx mediante el aumento de la expresión del receptor de la toxina Gb₃ en diferentes células blanco, incluyendo a las CEs cerebrales (Eisenhauer *et al.*, 2001; van Setten *et al.*, 1997). Los resultados aquí encontrados extienden esa observación

a ASTs, ya que la preincubación con LPS estimuló la expresión de Gb₃, y en consecuencia, la internalización de Stx1. Además, cabe destacar que la máxima expresión de Gb₃ fue observada luego de la estimulación con Stx1 en ASTs previamente sensibilizados con LPS. Esto sugiere que la modulación del receptor Gb₃ puede estar mediada por un mecanismo de *feedback* positivo. Esto constituye la primera evidencia sobre el rol de Stx1 en la modulación de su propio receptor.

Stx1 indujo en los ASTs sensibilizados con LPS una respuesta inflamatoria temprana, la cual fue determinada por la liberación de TNF- α y ON, y la actividad quimioattractante de PMN. Por otra parte, la activación de los ASTs (definida por la expresión aumentada de GFAP) y la muerte celular fueron consecuencias tardías del tratamiento con Stx1 en ASTs sensibilizados con LPS. Además, teniendo en cuenta que la secreción de TNF- α , luego de la estimulación con LPS, es dependiente de la activación de NF- κ B, se examinó el rol de de esos factores en la sensibilización a los efectos de Stx1 en los ASTs. Los resultados señalan que tanto la activación como la muerte celular de los ASTs son revertidas por la supresión de la activación de NF- κ B o por el bloqueo de la actividad del TNF- α endógeno. En concordancia con estos resultados, se ha reportado que tanto el TNF- α como la activación de NF- κ B están implicados en la regulación de la expresión de GFAP (Lin *et al.*, 2008). Además, se ha demostrado previamente que la exposición de los ASTs a diferentes estímulos de muerte induce la activación de NF- κ B, y que inhibidores del mismo bloquean la muerte celular de dichas células (Takuma *et al.*, 1999).

Aún más, los resultados obtenidos muestran que la expresión aumentada del receptor Gb₃ observada luego de la estimulación con LPS y Stx1 fue también dependiente de la vía NF- κ B/TNF- α , si bien el mecanismo involucrado no fue establecido. Sin embargo, se ha demostrado en células epiteliales intestinales y en endoteliales cerebrales humanas que TNF- α aumenta la expresión de Gb₃ activando la lactosilseramida sintasa, enzima involucrada en la generación de lactosilceramida (LacCer) (Stricklett *et al.*, 2002). Esta vía podría además mediar la estimulación de Gb₃ en los ASTs, ya que la estimulación con TNF- α aumenta los niveles intracelulares de LacCer en estas células (Pannu *et al.*, 2005). En resumen, los resultados obtenidos en 4.1 revelan que el TNF- α actúa autócrina- o parácrinamente como una molécula

efectora central para amplificar los efectos de Stx1 en los ASTs sensibilizados con LPS. Estos efectos probablemente estén mediados por el aumento del Gb₃ y consecuente la internalización de la Stx1.

La Stx ha sido considerada clásicamente como una proteína tóxica para los ribosomas, ejerciendo sus efectos a través del bloqueo de la síntesis proteica. Sin embargo, datos recientes indican que cantidades subtóxicas de Stx causan sólo efectos menores sobre la síntesis de proteínas, aunque sí ejercen efectos dramáticos sobre la regulación génica, causando una expresión aumentada de marcadores pro-adherentes, protrombóticos e inflamatorios como por ejemplo en CEs (Petruzzello *et al.*, 2009). Este parecería ser el caso para los ASTs no sensibilizados, donde Stx por sí misma, sólo fue capaz de inducir un leve pero estadísticamente significativo aumento en la secreción de TNF- α , y en la migración y adhesión de PMN, aunque sin embargo no indujo muerte celular o estimulación de GFAP.

Por otro lado, al producirse un daño focal en el SNC una subpoblación de ASTs o precursores de ASTs sufren mitosis y cambios morfológicos. Estos ASTs se activan y migran hacia la lesión donde se organizan en una compacta cicatriz glial (Hampton y col., 2004; Rhodes y col., 2003; Wang y col., 2004; Zhou y col., 1986). La migración de la astroglia reactiva resulta fundamental y es un componente necesario para formar la actriz glial alrededor del área dañada. Se observó que sólo en ASTs sensibilizados con LPS la Stx1 ejerce un efecto inhibitorio en la migración de los ASTs y como consecuencia evitó la repoblación de la zona lesionada. Si bien la cicatriz glial tiene propiedades que a largo plazo pueden resultar dañinas, el impedimento de la formación de la cicatriz glial inicialmente puede tener consecuencias por lo menos igualmente perjudiciales. La cicatriz glial inicialmente trae aparejada la contención del proceso inflamatorio evitando la propagación de los efectos nocivos inherentes a los estados inflamatorios. Además permite la reparación de la BHE, inhibe la entrada de células inflamatorias en el cerebro dañado y limita la muerte neuronal (Bush y col., 1999; Faulkner y col., 2004). En este sentido, la inhibición de la migración astrocitaria por la Stx1 y el LPS podría contribuir en el daño al SNC.

Los PMN activados juegan un rol clave en las neuropatologías. Ellos pueden infiltrar rápidamente el parénquima cerebral injuriado y liberar

proteasas y sustancias potencialmente tóxicas (Barone *et al.*, 1991). En los pacientes con SUH, el recuento elevado en periferia de PMN en el período agudo, está asociado a un mal pronóstico (Fernandez *et al.*, 2007). Trabajos previos han establecido que varias quimioquinas y sus receptores son expresados por ASTs, tanto constitutivamente como inducidas por mediadores inflamatorios (Meeuwssen *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos demuestran que los ASTs tratados con LPS o Stx1 liberan factores que estimulan la activación, migración y adhesión de PMN a los ASTs, resultando finalmente en un aumento de la toxicidad. Nuevamente, los efectos máximos fueron alcanzados por Stx1 sobre ASTs sensibilizados con LPS. Sin embargo, los efectos sobre la activación de PMN por trazas de LPS o Stx1 que pudiera haber en los medios condicionados de los ASTs no pueden ser completamente descartados, aunque otros grupos han demostrado que aún luego de la sensibilización de PMN con LPS, TNF- α o IL-8, la Stx fue incapaz de activar a los PMN (Fernandez *et al.*, 2005; Geelen *et al.*, 2007). Por otra parte, la toxicidad potenciada mediada por PMN luego del tratamiento combinado LPS+Stx1, respecto al LPS solo, favorece la noción que los efectos observados son debidos a factores derivados de los ASTs.

La relevancia in vivo de los resultados obtenidos e la sección 4.1 es apoyada por estudios donde la producción local de TNF- α fue encontrada en cerebros de ratones luego de la infección con STEC, aunque la fuente celular no fue determinada (Okayama *et al.*, 2004). Aún más, fue reportado que la microinyección en el cerebro de TNF- α induce la acumulación y adherencia de PMN a los vasos sanguíneos cerebrales (Lotan *et al.*, 1994).

6.2 Influencia de los Factores astrocitarios liberados en respuesta a LPS y Stx1 sobre CEs con fenotipo cerebral.

La acción directa de la Stx1 en ASTs sensibilizados por LPS ha revelado una activación de estas células y el desarrollo de una respuesta inflamatoria caracterizada por la secreción de ON, TNF- α y quimioquinas que promueven la atracción, adhesión y el daño mediado por PMN. En particular, el TNF- α endógeno secretado por los ASTs ha mostrado jugar un rol fundamental en los eventos desencadenados por la toxina. Por lo tanto su papel en el desarrollo de la neuropatía del SUH debe tomarse en consideración. La disposición anatómica y la estrecha relación e influencia que mantienen los ASTs con las CEs de la barrera, amerita el estudio de los efectos de la respuesta astrocitaria a la toxina sobre el endotelio para comprender el daño y la alteración endotelial central en el compromiso del SNC observado en SUH.

Numerosas enfermedades e injurias del SNC, están acompañadas por la ruptura de la BHE resultando en el daño secundario a neuronas (Maxwell *et al.*, 1987). En particular, las observaciones realizadas tanto en casos severos de SUH como en modelos animales, indican un claro compromiso del endotelio vascular cerebral (Fukuda *et al.*, 2005), y se ha propuesto que el daño neuronal observado sería una consecuencia secundaria al daño del endotelio cerebral.

Se ha reportado que son los ASTs los que establecen y regulan las propiedades de la BHE y restringen la difusión de elementos y sustancias de la sangre. En particular, aquí se emplearon células HUVEC para una mejor representación del endotelio cerebral humano. En la sección 4.2 se validó la diferenciación de células HUVEC, mediante el uso de MC-ASTs, a células con fenotipo cerebral (HUVECd). Al respecto, se observó un aumento de la actividad fosfatasa alcalina, un aumento en la expresión y disposición periférica de ZO-1 y una reorganización de la actina. Estas observaciones concuerdan con lo reportado por otros autores (Takemoto *et al.*, 1994; Kuchler-Bopp *et al.*, 1999) (Hurst y Fritz, 1996; Kuchler-Bopp *et al.*, 1999). De modo que las HUVECd diferenciadas con MC-ASTs adoptan características que coinciden con las que presentan células endoteliales cerebrales humanas.

Para determinar si la respuesta astrocitaria frente a la toxina podría alterar las propiedades de las CEs que componen la BHE y/o contribuir al daño

endotelial observado en el SUH, se estudiaron los efectos de factores solubles liberados por ASTs expuestos a LPS y/o Stx1 sobre células HUVECd.

Los factores liberados por los ASTs sensibilizados por LPS y expuestos a Stx1 liberan factores que inducen un aumento en la expresión del receptor Gb₃ en HUVECd. A su vez este aumento correlacionó con un incremento en la apoptosis inducida por Stx1 cuando las HUVECd fueron expuestas a concentraciones subtóxicas de la toxina. Esto indica que la activación de ASTs via NF- κ B y en particular la secreción de TNF- α por parte de los ASTs media el aumento del Gb₃ y la consecuente susceptibilidad a la toxina en HUVECd. A favor de esto, otros estudios han revelado en CEs cerebrales humanas, que el TNF- α aumenta tanto la expresión del receptor como la susceptibilidad a la toxina (Eisenhauer *et al.*, 2001; Ergonul *et al.*, 2003).

Por otro lado, se observó que los ASTs expuestos a la combinación de LPS y Stx1 liberan factores que sólo a largo plazo resultan tóxicos para HUVECd. Si bien los factores astrocitarios responsables de la toxicidad de HUVECd no fueron determinados en este trabajo, el TNF- α ha sido propuesto como la molécula responsable de la citotoxicidad mediada por ASTs sobre oligodendrocitos (Robbins *et al.*, 1987) y neuronas (Downen *et al.*, 1999). Sin embargo, el TNF- α *in vitro* no resulta letal para cultivos de endotelio cerebral por sí solo, pero ha mostrado un sorprendente sinergismo cuando se combina con especies reactivas (Ginis *et al.*, 2000). En este sentido, el ON liberado en respuesta a LPS y Stx1 podría actuar en combinación con el TNF- α induciendo la muerte de HUVECd. A favor de esta hipótesis, el ON ha mostrado ser tóxico para CEs cerebrales (Tan *et al.*, 2004). Sin embargo, los experimentos aquí presentados no permiten descartar la posibilidad de que factores secretados por ASTs actúen sobre las HUVECd y éstas sintetizen algún mediador tóxico. El hecho de que el efecto sea tardío sugiere que este mediador endotelial debería ser sintetizado *de novo*. Estudios futuros ayudarán a determinar esta posibilidad.

Numerosas sustancias modulan la permeabilidad de la BHE y muchas de estas, incluyendo las familias de mediadores inflamatorios, son producidas por ASTs (Abbott, 2000). Así se ha determinado, que en condiciones patológicas, factores inflamatorios circulantes, incluyendo el LPS, pueden

también influir en la permeabilidad de la BHE. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los estados de “apertura” de la barrera gatillado por estímulos sistémicos suelen ser transitorios. De este modo, la respuesta inflamatoria de los ASTs perivasculares que fueran alcanzados por la toxina podrían mantener en el tiempo el estado “permeabilizado”, y al mismo tiempo, potenciar el daño endotelial iniciado por la toxina y agentes inflamatorios de la infección. Además, la estrecha interacción entre ASTs y el endotelio al que envuelven determina que la concentración local de factores astrocitarios secretados sea elevada y por tanto sumamente relevante. Por otro lado, la inyección intracerebral de LPS induce un aumento progresivo en la “apertura” de las TJs lo cual resultó estar mediado por la secreción de citoquinas inflamatorias derivadas tanto de células gliales como de CEs (Wispelwey et al., 1988).

Esto sugiere que factores secretados por ASTs en respuesta a LPS y/o Stx1 pueden jugar un rol fundamental en la alteración de la integridad y por lo tanto en la modulación de la permeabilidad de la BHE.

Las alteraciones en las proteínas que constituyen los complejos de TJs están directamente asociadas a la desregulación de la permeabilidad. De hecho, el compromiso de las TJs es una característica distintiva en las enfermedades neuroinflamatorias (Petty y Lo, 2002). Además, entre las sustancias que participan de las modificaciones patológicas de los complejos proteicos de las TJs, se encuentran el TNF- α , y los radicales libres, como el ON (Kimura *et al.*, 2008), mediadores que son secretado por los ASTs en respuesta a LPS y Stx1. Por este motivo, se evaluó el efecto de factores liberados por los ASTs tratados sobre la permeabilidad endotelial en HUVECd. Se determinó que factores solubles astrocitarios inducidos por LPS o Stx1 y en mayor medida por la combinación de LPS y Stx1 indujeron una disminución importante de la expresión de ZO-1 en HUVECd. Además, según lo observado microscópicamente, esta disminución correlacionó con una alteración notoria de la distribución periférica de la proteína.

Típicamente, la distribución en la periferia de ZO-1, se relaciona con la integridad de la función de la barrera, puesto a que esta proteína se asocia intracitoplasmáticamente a las moléculas ocluyentes, como las ocludinas y claudinas, En la actualidad aun no hay evidencias concretas que determinen cómo ocurre esta redistribución, pero se cree que está asociada a la

reorganización de los filamentos de actina (Bazzoni y Dejana, 2004; Stamatovic *et al.*, 2003), los cuales se conectan a las proteínas del complejo de TJs en parte a través de ZO-1 (Lai *et al.*, 2005; Tao *et al.*, 1996; Wong *et al.*, 1983).

De acuerdo a estos antecedentes, se evaluó la distribución de la actina en HUVECd estimuladas con MC-ASTs tratados. En concordancia con la menor expresión y pérdida de la distribución periférica de ZO-1, se observó una reorganización de la F-actina inducida por factores solubles derivados de ASTs tratados con LPS y/o Stx1. Estos resultados concuerdan con reportes en los que agentes “permeabilizantes” como la histamina y el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) indujeron en CEs cambios en la organización de los filamentos de F-actina como los aquí descritos (Criscuolo y Balledux, 1996). Además, fue reportado que los cambios en la permeabilidad correlacionan con bajos niveles de expresión de ZO-1 en las zonas del cerebro lesionadas en ratones tras la inducción de la “apertura” de la BHE por administración de D-manitol (Lu *et al.*, 2008).

Para confirmar que las alteraciones en ZO-1 y F-actina mediadas por factores solubles astrocitarios se relacionan a un aumento en la permeabilidad, se evaluó la capacidad de la toxina de atravesar el endotelio mediante un ensayo en *transwell*. Los resultados obtenidos confirmaron que los factores liberados por ASTs tratados con LPS y Stx1 indujeron un aumento en la permeabilidad en HUVECd, volviéndose más permisivas a la translocación de la Stx1. La Stx es una macromolécula y, como tal, en condiciones normales, no debería ser capaz de ingresar al parénquima cerebral. Sin embargo, estudios en modelos animales han mostrado que la toxina atraviesa la barrera e incluso fue encontrada asociada tanto a células endoteliales como a células del parénquima, incluyendo neuronas y ASTs (Fujii *et al.*, 1996; Fujii *et al.*, 1994b; Goldstein *et al.*, 2007).

En conjunto, estos resultados indican que Stx1 induce en ASTs sensibilizados con LPS la secreción de factores que contribuyen a la pérdida de la integridad de la barrera y al aumento de la permeabilidad endotelial.

El aumento de la permisividad de migración de leucocitos a través del endotelio es indicativo de permeabilidad de la BHE. Asimismo, la migración transcelular de PMN inducida por estímulos quimiotácticos es también capaz de aumentar significativamente la permeabilidad endotelial (Inglis *et al.*, 2004).

En este trabajo, los experimentos realizados en *transwell* revelaron un incremento en la migración transendotelial de PMN cuando las HUVECs fueron expuestas a los MC-ASTs tratados con LPS y Stx1. Más aún, esto guardó relación con los ensayos de quimiotaxis inducida por los MC-ASTs tratados con LPS y Stx1 en respuesta a LPS y Stx1 con PMN de rata (4.1.3C).

Esto correlaciona con lo observado en modelos animales de distintas neuropatías en donde se observa un infiltrado perivascular de leucocitos acompañado del ingreso de proteínas presentes en la sangre (Claudio *et al.*, 1990; Lossinsky *et al.*, 1989). Si bien la transmigración de PMN inducida por estímulos quimiotácticos no suele dañar la linealidad endotelial, la presencia de estímulos que además inducen degranulación de los PMN como el TNF- α pueden conducir a la destrucción de la arquitectura del endotelio vascular en el proceso migratorio debido a la liberación de enzimas proteolíticas (McGowan, 1990) (Harlan *et al.*, 1985). En este sentido, en las microfotografías mostradas en la Figura 4.2.8 se evidencia una clara alteración de la linealidad de las monocapas de HUVECs asociada al aumento en la transmigración de PMN inducida por los MC-ASTs tratados.

De modo que los resultados aquí obtenidos indican que además del incremento en la permeabilidad inducido por factores secretados por los ASTs en respuesta a LPS y Stx1, la transmigración inducida por factores quimiotácticos astrocitarios y la consecuente destrucción de la linealidad endotelial estarían comprometiendo aun más la integridad de la BHE.

Dependiendo de cada patología numerosos factores han mostrado “abrir” la BHE. Dado que la vía de NF- κ B está involucrada en la síntesis de mediadores inflamatorios “permeabilizantes”, el pretratamiento de ASTs con BAY 11-7082 previno los efectos observados sobre la expresión de ZO-1. Aún más, el pretratamiento con Etanercept mostró los mismos resultados, sugiriendo que el TNF- α secretado en respuesta a LPS y Stx1 es relevante para la desregulación de la permeabilidad endotelial. Apoyando estos resultados, en otros modelos se ha visto que el bloqueo de TNF- α secretado por linfocitos infectados por retrovirus, previene la alteración de la integridad de CEs cerebrales establecida como el aumento de la permeabilidad, de la migración transendotelial, la disminución y la desorganización de ZO-1 y actina. (Afonso *et al.*, 2007).

Hasta la fecha no existen registros de alteraciones en las moléculas TJs en respuesta a la toxina o a las infecciones con STEC. Los resultados mostrados en este trabajo plantean por primera vez la posibilidad de que la respuesta inflamatoria cerebral inducida por la toxina alteraría estas moléculas contribuyendo al aumento de la permeabilidad endotelial observado en el SUH.

Si bien estudios *in vivo*, deben realizarse para corroborar esta hipótesis, estudios en otras patologías cerebrales apoyan esta posibilidad (Afonso *et al.*, 2007; Cavois *et al.*, 2000). En este sentido, Álvarez y col. reportaron, en un modelo murino de inflamación cerebral (neurocisticercosis), que ASTs activados yuxtapuestos a los vasos sanguíneos que exhibían aumentada permeabilidad expresaban mayor producción de citoquinas reguladoras de la BHE, (Alvarez y Teale, 2006).

Por otro lado, si bien aquí no se evaluó la translocación de Stx1 en asociación con la transmigración endotelial de PMN, estudios realizados con células epiteliales de intestino demostraron un aumento de la translocación de la toxina concomitante a la migración de PMN a través de la monocapa. Esto sugiere fuertemente que la quimiotaxis inducida por los ASTs en respuesta a la toxina que inicialmente alcanzara el parénquima podría contribuir a una mayor translocación de Stx al cerebro, potenciando el daño y la inflamación (Hurley *et al.*, 2001).

La disfunción endotelial resulta crucial para el desarrollo de las lesiones microangiopáticas en el SUH (Ruggenti *et al.*, 2001) (Andreoli, 1999) y una vasta bibliografía sugiere que la interacción entre leucocitos activados (en particular los PMN), plaquetas y CEs amplifican y extienden el daño a nivel renal (Forsyth *et al.*, 1989) (Morigi *et al.*, 1995; Morigi *et al.*, 2001). Los eventos de activación, adhesión y migración, así como su relación con la Stx, han sido estudiados exhaustivamente en lo que refiere al daño renal/endotelial. Sin embargo, no existen trabajos en la neuropatología del SUH que contemplen la contribución de la inflamación intracerebral y su efecto sobre las CEs de la BHE, además de otros componentes del sistema inmune periférico.

En este trabajo se ha evaluado la influencia de la respuesta inflamatoria de los ASTs frente a la Stx1 y/o el LPS, sobre la activación de CEs con fenotipo cerebral, y su interacción con PMN y plaquetas.

Por un lado, se determinó que factores liberados por ASTs tratados con LPS y Stx1 indujeron la activación de HUVECd evidenciada por el aumento de moléculas de adhesión ICAM-1 y E-selectina, y por la liberación del FvW. Por otro lado, fueron capaces de activar PMN observándose un aumento en la expresión de CD11b y CD66, moléculas implicadas en la adhesión al endotelio. En modelos animales la administración de la toxina, induce la activación de PMN.

En concordancia con la activación de HUVECd y PMN, se observó un aumento en la adhesión de PMN sobre las HUVECd estimuladas con los MC-ASTs tratados. La relevancia de estos hallazgos puede encontrarse en otras enfermedades con compromiso del SNC. Así, el incremento en el tráfico de PMN hacia el cerebro en distintas patologías ha sido atribuido al aumento en la expresión de ICAM-1 tanto en CEs como en ASTs (Olschowka *et al.*, 1997). En adición al efecto quimioattractante observado por factores liberados por ASTs tratados con LPS y Stx1, el aumento en la expresión de ICAM-1 en CEs de la barrera favorecería la trans migración de PMN contribuyendo al estado inflamatorio del cerebro. Apoyando esta hipótesis ratones deficientes para ICAM-1 mostraron resistencia a la injuria por isquemia-reperfusión cerebral y renal, debido a una disminución en la infiltración de PMN (Connolly *et al.*, 1996; Kelly *et al.*, 1996; Soriano *et al.*, 1996). Asimismo, el bloqueo de ICAM-1 con anticuerpos en ratas disminuyó el infiltrado de PMN y la formación de edema (Matsuo *et al.*, 1994). Por otro lado, la regulación de la expresión de ICAM-1 por parte de los ASTs en respuesta a la toxina tendría relevancia en el aumento de la permeabilidad endotelial independientemente de la presencia de PMN. En este sentido, la sobre-expresión de ICAM-1 en CEs de la dermis mostró un incremento en la permeabilidad, cambio de forma, alteración de la disposición del citoesqueleto y una reducción de las TJs. (Clark *et al.*, 2007). En relación a esto, se ha sugerido que la permeabilidad vascular esta mecánicamente asociada a la inducción de ICAM-1 debido a la interacción que existe entre ICAM-1 y proteínas del citoesqueleto. (Carpen *et al.*, 1992; Heiska *et al.*, 1998; Barreiro *et al.*, 2002).

El daño endotelial inducido por PMN activados con agonistas exógenos ha sido extensamente documentado. Sin embargo, el endotelio activado por citoquinas inflamatorias ha mostrado ser altamente susceptible a la

citotoxicidad mediada por PMN aún en ausencia de estímulos que activen previamente a los PMN (Gimbrone *et al.*, 1989; Westlin y Gimbrone, 1993).

La citotoxicidad de HUVECd mediada por PMN fue inducida por los distintos MC-ASTs tratados. Sin embargo, la mayor citotoxicidad endotelial fue inducida por MC-ASTs tratados con LPS y Stx1. Por otro lado, los experimentos de citotoxicidad en *transwell* mostraron que la interacción/adhesión estrecha entre HUVECd y PMN es necesaria para el desarrollo de citotoxicidad endotelial. En concordancia con estos resultados, numerosos estudios han determinado que la citotoxicidad endotelial mediada por PMN es prevenida por la inhibición de contacto (Westlin y Gimbrone, 1993; Forsyth *et al.*, 1989). La adhesión estrecha entre PMN y el endotelio resulta crítica para la acción citotóxica de PMN puesto que permite la formación de un microambiente entre las CEs y los PMN en el cual la liberación de especies reactivas y/o el contenido proteolítico de PMN pueden ser mantenidos en alta concentración, a la vez que inhibidores de proteasas endógenos de CEs quedan excluidos (Weiss, 1989). El aumento de ICAM-1 y E-selectina y de la adhesión de PMN a HUVECd inducida por MC-ASTs tratados con LPS y Stx1, podría estar relacionado con la máxima citotoxicidad de HUVECd mediada por PMN. Apoyando esta hipótesis, la estimulación exógena por formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP) de los PMN dispuestos en los *transwell* fracasó en inducir citotoxicidad reforzando el hecho de que la mayor adhesión de PMN y la activación endotelial inducida por factores liberados por ASTs es crítica para la citotoxicidad de HUVECd mediada por PMN (datos no mostrados) y no tanto por la simple activación/degranulación, de PMN. Además, la interacción de PMN con endotelios activados genera señales intracelulares. Lo y col. mostraron que E-selectina induce en los PMN una mayor actividad adhesiva de la integrina CR3 (CD11b/CD18). Esta propiedad de la E-selectina está involucrada en la transducción de señales en los PMN reclutando moléculas adicionales involucradas en una adhesión más estrecha al endotelio (Lo *et al.*, 1991; Detmers *et al.*, 1990).

Dado que los MC-ASTs tratados con LPS o Stx1, y en donde la adhesión estrecha no fue observada, también sensibilizaron a las HUVECd al daño de PMN, esto sugiere que otros mecanismos dispararían los dispositivos tóxicos de PMN. Una interpretación es que factores liberados por las HUVECd tratadas

actuarían de manera paracrina estimulando la actividad tóxica de PMN en contacto no estrecho con el endotelio.

Teniendo en cuenta los antecedentes bibliográficos y los resultados aquí obtenidos, la regulación de la activación de CEs y PMN por factores liberados por ASTs sensibilizados en respuesta a la toxina, sugieren un rol fundamental de los ASTs en el desarrollo de la neuropatología asociada al SUH. Esto significaría que, además de su contribución a la inflamación cerebral y a la permeabilidad de la BHE, esos factores estarían regulando la participación de los PMN en la injuria endotelial.

Entre los eventos críticos comúnmente involucrados en la afección del SNC en el SUH se encuentran la formación de edema, microtrombos y los cambios isquémicos (Siegler, 1994; Bos *et al.*, 1985). Material de autopsia en pacientes con SUH reveló trombosis de capilares en riñón, pulmón, hígado y cerebro.

Tanto el daño como la estimulación con mediadores inflamatorios suprimen las propiedades anticoagulantes del endotelio a la vez que aumenta aquellas que favorecen el estado procoagulante. La activación endotelial junto a un fenotipo endotelial procoagulante, ha sido reportada en pacientes con SUH (Bergstein *et al.*, 1992); (Nevard *et al.*, 1999); (Defreyne *et al.*, 1982). El endotelio dañado expone el FvW presente en el subendotelio promoviendo la formación de microtrombos. Por otra parte, en pacientes con SUH, el FvW derivado tanto de plaquetas como de células endoteliales determina la agregación plaquetaria en la microvasculatura. (Remuzzi y Ruggerenti, 1995; Moake, 1994). En forma similar a lo observado con los PMN, el MC-ASTs expuesto a LPS y Stx1 indujo la activación plaquetaria, evidenciada como el incremento en la expresión de P-selectina, asociado al aumento de la adhesión de plaquetas a HUVECd. Se ha determinado que la toxina por si misma no induce directamente la activación de plaquetas (Ghosh *et al.*, 2004; Viisoreanu *et al.*, 2000) por lo que se propone que, *in vivo*, otros factores derivados del endotelio u otra célula estimuladas con la toxina provocan la activación y agregación de plaquetas derivando en la trombosis asociada a SUH.

Si bien la contribución específica de la inflamación cerebral en la activación plaquetaria no ha sido establecida en el SUH, la participación de plaquetas activadas ha sido resaltada en otras enfermedades que afectan al

SNC [Sheremata, 2008 #288; Nathanson, 1952 #289]. Así, en el infarto isquémico-cerebrales, las plaquetas activadas contribuyen en gran medida en la oclusión microvascular isquémica (Abumiya *et al.*, 2000). Además recientemente, el rol de las plaquetas en el daño endotelial ha sido sugerido en malaria cerebral. (Faille *et al.*, 2009). Estudios detallados de la compleja relación entre las CEs cerebrales y las plaquetas en el contexto de SUH permitirán un mejor entendimiento de la neuropatología de la enfermedad.

La activación de HUVECd, PMN y plaquetas no fue observada cuando los MC-ASTs provenían de ASTs incubados en presencia de BAY 11-7082, sugiriendo que factores inflamatorios secretados via la activación del NF- κ B astrocitario fueron responsables de los efectos observados en estas células y en las plaquetas. Aún más, el bloqueo por etanercept del TNF- α liberado también previno estos efectos. Esto sugiere que el TNF- α podría ser un factor implicado en este evento. Apoyando este hallazgo, el aumento en la expresión ICAM-1 y E-selectina en CEs cerebrales y la activación de PMN pueden ser inducidos por TNF- α . (Fabry *et al.*, 1992; Dore-Duffy *et al.*, 1994). Además, se ha demostrado que TNF- α induce la activación y agregación de plaquetas (Soslau *et al.*, 1997; Bar *et al.*, 1997; Pignatelli *et al.*, 2005).

En suma, estos resultados sugieren que Stx1 induce en ASTs sensibilizados con LPS la liberación de factores que actúan sobre CEs, PMN y plaquetas desencadenando eventos que favorecen la formación de trombos que podrían contribuir al daño al endotelio cerebral observado en SUH.

Los resultados que se presentan aquí permiten proponer a los ASTs como una fuente importante de mediadores inflamatorios que potencialmente, podrían ser responsables de la susceptibilidad aumentada de CEs cerebrales a los efectos inducidos por Stx y, por lo tanto, contribuir a la disrupción de la BHE y a la neurotoxicidad en el HUS.

Asimismo, sugieren que el NF- κ B y el TNF- α podrían ser moléculas “blanco” para prevenir o disminuir las complicaciones del SNC en los pacientes HUS. Varios estudios *in vivo* en diferentes patologías que afectan al SNC demostraron que la supresión de la activación de los ASTs y su respuesta inflamatoria resulta en una reducción de la severidad de la enfermedad y mejora la recuperación (Brambilla *et al.*, 2009; Sommer *et al.*, 2001). Además, reportes recientes muestran una mejora en los pacientes con enfermedad de

Alzheimer y otras patologías relacionadas luego de la administración periespinal de Etanercept. Esto sugiere que el Etanercept tiene la habilidad de penetrar en el fluido cerebro-espinal del cerebro a una concentración terapéuticamente efectiva (Tobinick, 2008; Tobinick y Gross, 2008b; Tobinick y Gross, 2008a)

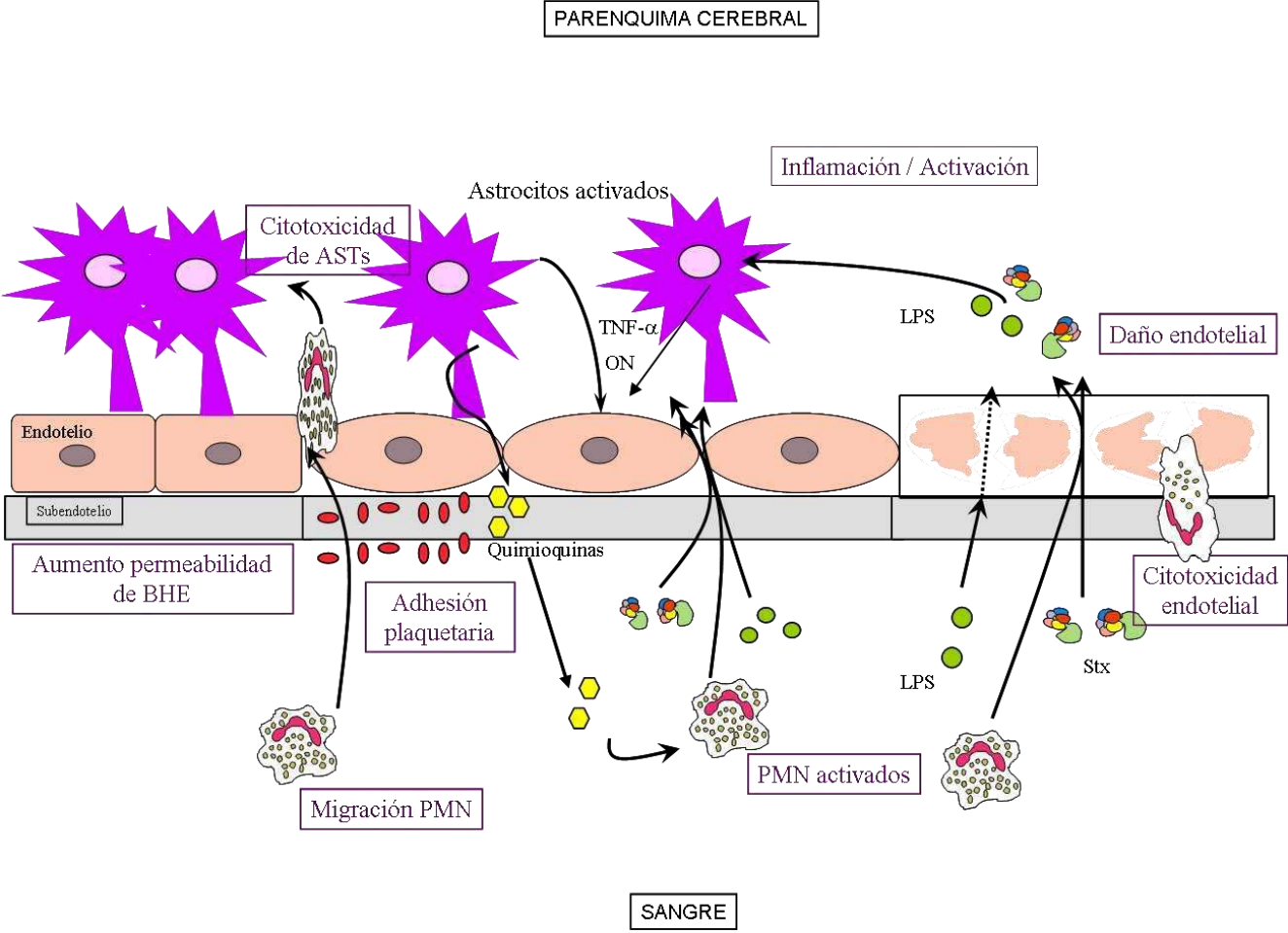
Estudios futuros *in vivo* deberán determinar si la inhibición de la señalización por NF- κ B o la producción de TNF- α en ASTs resulta en un efecto protector. Además, deberán concluir si la vía NF- κ B resulta en un nuevo blanco conveniente para el desarrollo de estrategias terapéuticas para el tratamiento de pacientes con HUS que presenten compromiso del SNC.

Los resultados presentados son relevantes para entender el rol de la inflamación cerebral y su relación con las lesiones microvasculares y las alteraciones de la BHE, permitiendo una mejor comprensión de los mecanismos neuropatológicos del SUH. Los resultados de este trabajo y los antecedentes bibliográficos, estimulan la realización de un estudio más detallado *in vivo* de la contribución de la respuesta inflamatoria cerebral, y en particular de los ASTs perivasculares para comprender la neurofisiopatología del SUH.

7. INTEGRACIÓN Y CONCLUSIONES

Este trabajo, muestra que Stx1 induce en ASTs una respuesta inflamatoria caracterizada por la liberación de TNF- α y factores quimioattractantes de PMN. La sensibilización por LPS potencia esta respuesta presumiblemente mediante la inducción del aumento en la expresión del receptor de Stx1 y la internalización de la toxina. Los efectos de esta respuesta fueron determinados sobre CEs con fenotipo cerebral. En este sentido, los factores solubles liberados por ASTs sensibilizados en respuesta a Stx1 provocaron una disminución de las propiedades restrictivas de la barrera endotelial alterando la expresión y distribución de las TJs. Además estos factores astrocitarios indujeron un estado activado y procoagulante de las CEs favoreciendo la adhesión de plaquetas y PMN que eventualmente provocaron citotoxicidad endotelial. Estos resultados sugieren que la respuesta inflamatoria de ASTs activados por LPS y Stx1 puede cumplir un rol en la alteración del funcionamiento y la integridad de la BHE y contribuyen con los eventos neuropatológicos observados en los casos severos de SUH.

Los resultados obtenidos permiten proponer el siguiente modelo. La Stx junto con los factores inflamatorios asociados a la infección como el LPS provocan inicialmente la activación y eventualmente el daño de las células endoteliales de la BHE, permitiendo el acceso de la toxina y el LPS al parénquima cerebral. Los ASTs adyacentes al endotelio cerebral se activan en respuesta a la Stx y al LPS y liberan mediadores inflamatorios como TNF- α , radicales y quimioquinas potenciando el daño inicial causado por la toxina. Al mismo tiempo estos factores sensibilizan al endotelio a un mayor daño por la toxina aumentando la expresión del receptor Gb3. Además, los factores liberados por los ASTs afectan la integridad de la BHE. El aumento de la permeabilidad resultante favorece la translocación de más toxina y la trasmigración de PMN atraídos por quimioquinas astrocitarias. A su vez los factores astrocitarios activan a las células endoteliales PMN y plaquetas generándose un estado protrombotico que contribuye con la angiopatía de la microvasculatura cerebral.



Modelo propuesto: Contribución de la respuesta inflamatoria astrocitaria inducida por la Stx1 al daño endotelial de la BHE cerebral.

8. BIBLIOGRAFIA

- Abbassi, O., Kishimoto, T. K., McIntire, L. V., Anderson, D. C. and Smith, C. W. (1993) E-selectin supports neutrophil rolling in vitro under conditions of flow. *J Clin Invest*, 92, 2719-2730.
- Abbott, N. J. (2000) Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability. *Cell Mol Neurobiol*, 20, 131-147.
- Abbott, N. J. (2005) Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation. *Cell Mol Neurobiol*, 25, 5-23.
- Abbott, N. J. and Romero, I. A. (1996) Transporting therapeutics across the blood-brain barrier. *Mol Med Today*, 2, 106-113.
- Abbott, N. J., Ronnback, L. and Hansson, E. (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*, 7, 41-53.
- Acheson, D. W., Moore, R., De Breucker, S., Lincicome, L., Jacewicz, M., Skutelsky, E. and Keusch, G. T. (1996) Translocation of Shiga toxin across polarized intestinal cells in tissue culture. *Infect Immun*, 64, 3294-3300.
- Alon, R., Rossiter, H., Wang, X., Springer, T. A. and Kupper, T. S. (1994) Distinct cell surface ligands mediate T lymphocyte attachment and rolling on P and E selectin under physiological flow. *J Cell Biol*, 127, 1485-1495.
- Alvarez, J. I. and Teale, J. M. (2006) Breakdown of the blood brain barrier and blood-cerebrospinal fluid barrier is associated with differential leukocyte migration in distinct compartments of the CNS during the course of murine NCC. *J Neuroimmunol*, 173, 45-55.
- Andreoli, S. P. (1999) The pathophysiology of the hemolytic uremic syndrome. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 8, 459-464.
- Argaw, A. T., Zhang, Y., Snyder, B. J., Zhao, M. L., Kopp, N., Lee, S. C., Raine, C. S., Brosnan, C. F. and John, G. R. (2006) IL-1beta regulates blood-brain barrier permeability via reactivation of the hypoxia-angiogenesis program. *J Immunol*, 177, 5574-5584.
- Armstrong, G. D., Rowe, P. C., Goodyer, P., Orrbine, E., Klassen, T. P., Wells, G., MacKenzie, A., Lior, H., Blanchard, C., Auclair, F. and et al. (1995) A phase I study of chemically synthesized verotoxin (Shiga-like toxin) Pk-trisaccharide receptors attached to chromosorb for preventing hemolytic-uremic syndrome. *J Infect Dis*, 171, 1042-1045.
- Arthur, F. E., Shivers, R. R. and Bowman, P. D. (1987) Astrocyte-mediated induction of tight junctions in brain capillary endothelium: an efficient in vitro model. *Brain Res*, 433, 155-159.
- Bale, J. F., Jr., Brasher, C. and Siegler, R. L. (1980) CNS manifestations of the hemolytic-uremic syndrome. Relationship to metabolic alterations and prognosis. *Am J Dis Child*, 134, 869-872.
- Ballabh, P., Braun, A. and Nedergaard, M. (2004) The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis*, 16, 1-13.
- Barnett, N. D., Kaplan, A. M., Bernes, S. M. and Cohen, M. L. (1995) Hemolytic uremic syndrome with particular involvement of basal ganglia and favorable outcome. *Pediatr Neurol*, 12, 155-158.
- Barone, F. C., Hillegass, L. M., Price, W. J., White, R. F., Lee, E. V., Feuerstein, G. Z., Sarau, H. M., Clark, R. K. and Griswold, D. E. (1991) Polymorphonuclear leukocyte infiltration into cerebral focal ischemic tissue: myeloperoxidase activity assay and histologic verification. *J Neurosci Res*, 29, 336-345.

- Barrett, T. J., Potter, M. E. and Wachsmuth, I. K. (1989) Bacterial endotoxin both enhances and inhibits the toxicity of Shiga-like toxin II in rabbits and mice. *Infect Immun*, 57, 3434-3437.
- Beck, D. W., Vinters, H. V., Hart, M. N. and Cancilla, P. A. (1984) Glial cells influence polarity of the blood-brain barrier. *J Neuropathol Exp Neurol*, 43, 219-224.
- Begley, D. J. and Brightman, M. W. (2003) Structural and functional aspects of the blood-brain barrier. *Prog Drug Res*, 61, 39-78.
- Bentzel, C. J., Hainau, B., Edelman, A., Anagnostopoulos, T. and Benedetti, E. L. (1976) Effect of plant cytokinins on microfilaments and tight junction permeability. *Nature*, 264, 666-668.
- Beutin, L. (1999) *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. *Vet Res*, 30, 285-298.
- Beutin, L., Geier, D., Steinruck, H., Zimmermann, S. and Scheutz, F. (1993) Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J Clin Microbiol*, 31, 2483-2488.
- Beutin, L., Geier, D., Zimmermann, S., Aleksic, S., Gillespie, H. A. and Whittam, T. S. (1997) Epidemiological relatedness and clonal types of natural populations of *Escherichia coli* strains producing Shiga toxins in separate populations of cattle and sheep. *Appl Environ Microbiol*, 63, 2175-2180.
- Bezzi, P., Gundersen, V., Galbete, J. L., Seifert, G., Steinhauser, C., Pilati, E. and Volterra, A. (2004) Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat Neurosci*, 7, 613-620.
- Bielaszewska, M., Clarke, I., Karmali, M. A. and Petric, M. (1997) Localization of intravenously administered verocytotoxins (Shiga-like toxins) 1 and 2 in rabbits immunized with homologous and heterologous toxoids and toxin subunits. *Infect Immun*, 65, 2509-2516.
- Boccoli, J., Loidl, C. F., Lopez-Costa, J. J., Creydt, V. P., Ibarra, C. and Goldstein, J. (2008) Intracerebroventricular administration of Shiga toxin type 2 altered the expression levels of neuronal nitric oxide synthase and glial fibrillary acidic protein in rat brains. *Brain Res*, 1230, 320-333.
- Boyd, B., Richardson, S. and Garipey, J. (1991) 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*, 59, 750-757.
- Brady, H. R. (1994) Leukocyte adhesion molecules and kidney diseases. *Kidney Int*, 45, 1285-1300.
- Brightman, M. W., Klatzo, I., Olsson, Y. and Reese, T. S. (1970) The blood-brain barrier to proteins under normal and pathological conditions. *J Neurol Sci*, 10, 215-239.
- Brown, R. C., Mark, K. S., Egleton, R. D. and Davis, T. P. (2004) Protection against hypoxia-induced blood-brain barrier disruption: changes in intracellular calcium. *Am J Physiol Cell Physiol*, 286, C1045-1052.
- Bush, T. G., Puvanachandra, N., Horner, C. H., Polito, A., Ostefeld, T., Svendsen, C. N., Mucke, L., Johnson, M. H. and Sofroniew, M. V. (1999) Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron*, 23, 297-308.
- Butt, A. M. (1991) Modulation of a glial blood-brain barrier. *Ann N Y Acad Sci*, 633, 363-377.
- Butt, A. M., Jones, H. C. and Abbott, N. J. (1990) Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *J Physiol*, 429, 47-62.

- Cooling, L. L., Walker, K. E., Gille, T. and Koerner, T. A. (1998) Shiga toxin binds human platelets via globotriaosylceramide (Pk antigen) and a novel platelet glycosphingolipid. *Infect Immun*, 66, 4355-4366.
- Cordenosi, M., D'Atri, F., Hammar, E., Parry, D. A., Kendrick-Jones, J., Shore, D. and Citi, S. (1999) Cingulin contains globular and coiled-coil domains and interacts with ZO-1, ZO-2, ZO-3, and myosin. *J Cell Biol*, 147, 1569-1582.
- Cserr, H. F. and Bundgaard, M. (1984) Blood-brain interfaces in vertebrates: a comparative approach. *Am J Physiol*, 246, R277-288.
- Chung, I. Y. and Benveniste, E. N. (1990) Tumor necrosis factor-alpha production by astrocytes. Induction by lipopolysaccharide, IFN-gamma, and IL-1 beta. *J Immunol*, 144, 2999-3007.
- de Jong, M. and Monnens, L. (1988) Haemolytic-uraemic syndrome: a 10-year follow-up study of 73 patients. *Nephrol Dial Transplant*, 3, 379-382.
- Dermietzel, R. (1998) Gap junction wiring: a 'new' principle in cell-to-cell communication in the nervous system? *Brain Res Brain Res Rev*, 26, 176-183.
- Deshpande, M., Zheng, J., Borgmann, K., Persidsky, R., Wu, L., Schellpeper, C. and Ghorpade, A. (2005) Role of activated astrocytes in neuronal damage: potential links to HIV-1-associated dementia. *Neurotox Res*, 7, 183-192.
- Dixit, V. M., Green, S., Sarma, V., Holzman, L. B., Wolf, F. W., O'Rourke, K., Ward, P. A., Prochownik, E. V. and Marks, R. M. (1990) Tumor necrosis factor-alpha induction of novel gene products in human endothelial cells including a macrophage-specific chemotaxin. *J Biol Chem*, 265, 2973-2978.
- Dohgu, S., Yamauchi, A., Takata, F., Naito, M., Tsuruo, T., Higuchi, S., Sawada, Y. and Kataoka, Y. (2004) Transforming growth factor-beta1 upregulates the tight junction and P-glycoprotein of brain microvascular endothelial cells. *Cell Mol Neurobiol*, 24, 491-497.
- Donohue-Rolfe, A., Kondova, I., Mukherjee, J., Chios, K., Hutto, D. and Tzipori, S. (1999) Antibody-based protection of gnotobiotic piglets infected with *Escherichia coli* O157:H7 against systemic complications associated with Shiga toxin 2. *Infect Immun*, 67, 3645-3648.
- Duner, K. I. (1993) A new kinetic single-stage *Limulus* amoebocyte lysate method for the detection of endotoxin in water and plasma. *J Biochem Biophys Methods*, 26, 131-142.
- Edefonti, A., Bettinelli, A., Mondonico, P., Claris Appiani, A., Picca, M., Cossu, M. M., Tentori, F., Giani, M. and Rossi, E. (1985) Intraplatelet serotonin (5HT) in children with the hemolytic uremic syndrome. *Clin Nephrol*, 23, 207-211.
- Eisenhauer, P. B., Jacewicz, M. S., Conn, K. J., Koul, O., Wells, J. M., Fine, R. E. and Newburg, D. S. (2004) *Escherichia coli* Shiga toxin 1 and TNF-alpha induce cytokine release by human cerebral microvascular endothelial cells. *Microb Pathog*, 36, 189-196.
- Endo, Y., Tsurugi, K., Yutsudo, T., Takeda, Y., Ogasawara, T. and Igarashi, K. (1988) 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*, 171, 45-50.
- Eng, L. F. and Ghirnikar, R. S. (1994) GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol*, 4, 229-237.
- Ergonul, Z., Clayton, F., Fogo, A. B. and Kohan, D. E. (2003) Shigatoxin-1 binding and receptor expression in human kidneys do not change with age. *Pediatr Nephrol*, 18, 246-253.

- Eriksson, K. J., Boyd, S. G. and Tasker, R. C. (2001) Acute neurology and neurophysiology of haemolytic-uraemic syndrome. *Arch Dis Child*, 84, 434-435.
- Exeni, R. A. (1996) [Hemolytic uremic syndrome]. *Medicina*, 56, 197-198.
- Exeni, R. A., Fernandez, G. C. and Palermo, M. S. (2007) Role of polymorphonuclear leukocytes in the pathophysiology of typical hemolytic uremic syndrome. *ScientificWorldJournal*, 7, 1155-1164.
- Fan, L., Young, P. R., Barone, F. C., Feuerstein, G. Z., Smith, D. H. and McIntosh, T. K. (1996) Experimental brain injury induces differential expression of tumor necrosis factor- α mRNA in the CNS. *Brain Res Mol Brain Res*, 36, 287-291.
- Faulkner, J. R., Herrmann, J. E., Woo, M. J., Tansey, K. E., Doan, N. B. and Sofroniew, M. V. (2004) Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J Neurosci*, 24, 2143-2155.
- Fernandez, G. C., Lopez, M. F., Gomez, S. A., Ramos, M. V., Bentancor, L. V., Fernandez-Brando, R. J., Landoni, V. I., Dran, G. I., Meiss, R., Isturiz, M. A. and Palermo, M. S. (2006) Relevance of neutrophils in the murine model of haemolytic uraemic syndrome: mechanisms involved in Shiga toxin type 2-induced neutrophilia. *Clin Exp Immunol*, 146, 76-84.
- Fernandez, G. C., Rubel, C., Dran, G., Gomez, S., Isturiz, M. A. and Palermo, M. S. (2000) Shiga toxin-2 induces neutrophilia and neutrophil activation in a murine model of hemolytic uremic syndrome. *Clin Immunol*, 95, 227-234.
- Fillit, H., Ding, W. H., Buee, L., Kalman, J., Altstiel, L., Lawlor, B. and Wolf-Klein, G. (1991) Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 129, 318-320.
- Finazzi, G., Bellavita, P., Falanga, A., Viero, P. and Barbui, T. (1992) Inefficacy of intravenous immunoglobulin in patients with low-risk thrombotic thrombocytopenic purpura/hemolytic-uremic syndrome. *Am J Hematol*, 41, 165-169.
- Fitzpatrick, M. M., Shah, V., Filler, G., Dillon, M. J. and Barratt, T. M. (1992a) Neutrophil activation in the haemolytic uraemic syndrome: free and complexed elastase in plasma. *Pediatr Nephrol*, 6, 50-53.
- Fitzpatrick, M. M., Shah, V., Trompeter, R. S., Dillon, M. J. and Barratt, T. M. (1992b) Interleukin-8 and polymorphoneutrophil leucocyte activation in hemolytic uremic syndrome of childhood. *Kidney Int*, 42, 951-956.
- Fong, J. S. and Kaplan, B. S. (1982) Impairment of platelet aggregation in hemolytic uremic syndrome: evidence for platelet "exhaustion". *Blood*, 60, 564-570.
- Forsyth, K. D., Simpson, A. C., Fitzpatrick, M. M., Barratt, T. M. and Levinsky, R. J. (1989) Neutrophil-mediated endothelial injury in haemolytic uraemic syndrome. *Lancet*, 2, 411-414.
- Fujii, J., Kinoshita, Y., Kita, T., Higure, A., Takeda, T., Tanaka, N. and Yoshida, S. (1996a) Magnetic resonance imaging and histopathological study of brain lesions in rabbits given intravenous verotoxin 2. *Infect Immun*, 64, 5053-5060.
- Fujii, J., Kinoshita, Y., Kita, T., Higure, A., Takeda, T., Tanaka, N. and Yoshida, S. (1996b) Magnetic resonance imaging and histopathological study of brain lesions in rabbits given intravenous verotoxin 2. *Infect Immun*, 64, 5053-5060.
- Fujii, J., Kita, T., Yoshida, S., Takeda, T., Kobayashi, H., Tanaka, N., Ohsato, K. and Mizuguchi, Y. (1994a) Direct evidence of neuron impairment by oral infection with verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H- in mitomycin-treated mice. *Infect Immun*, 62, 3447-3453.

- Fujii, J., Kita, T., Yoshida, S., Takeda, T., Kobayashi, H., Tanaka, N., Ohsato, K. and Mizuguchi, Y. (1994b) Direct evidence of neuron impairment by oral infection with verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H- in mitomycin-treated mice. *Infect Immun*, 62, 3447-3453.
- Gagnadoux, M. F., Habib, R., Gubler, M. C., Bacri, J. L. and Broyer, M. (1996) Long-term (15-25 years) outcome of childhood hemolytic-uremic syndrome. *Clin Nephrol*, 46, 39-41.
- Galbusera, M., Benigni, A., Paris, S., Ruggenti, P., Zoja, C., Rossi, C. and Remuzzi, G. (1999) Unrecognized pattern of von Willebrand factor abnormalities in hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Am Soc Nephrol*, 10, 1234-1241.
- Gallo, E. G. and Gianantonio, C. A. (1995) Extrarenal involvement in diarrhoea-associated haemolytic-uraemic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 9, 117-119.
- Gianantonio, C. A., Vitacco, M., Mendilaharsu, F., Gallo, G. E. and Sojo, E. T. (1973) The hemolytic-uremic syndrome. *Nephron*, 11, 174-192.
- Giaume, C., Kirchhoff, F., Matute, C., Reichenbach, A. and Verkhratsky, A. (2007) Glia: the fulcrum of brain diseases. *Cell Death Differ*, 14, 1324-1335.
- Glauser, M. P. (1996) The inflammatory cytokines. New developments in the pathophysiology and treatment of septic shock. *Drugs*, 52 Suppl 2, 9-17.
- Goldstein, J., Loidl, C. F., Creydt, V. P., Boccoli, J. and Ibarra, C. (2007) Intracerebroventricular administration of Shiga toxin type 2 induces striatal neuronal death and glial alterations: an ultrastructural study. *Brain Res*, 1161, 106-115.
- Guha, M. and Mackman, N. (2001) LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal*, 13, 85-94.
- Hahn, J. S., Havens, P. L., Higgins, J. J., O'Rourke, P. P., Estroff, J. A. and Strand, R. (1989) Neurological complications of hemolytic-uremic syndrome. *J Child Neurol*, 4, 108-113.
- Hampton, D. W., Rhodes, K. E., Zhao, C., Franklin, R. J. and Fawcett, J. W. (2004) The responses of oligodendrocyte precursor cells, astrocytes and microglia to a cortical stab injury, in the brain. *Neuroscience*, 127, 813-820.
- Harzheim, M., Stepien-Mering, M., Schroder, R. and Schmidt, S. (2004) The expression of microfilament-associated cell-cell contacts in brain endothelial cells is modified by IFN-beta1a (Rebif). *J Interferon Cytokine Res*, 24, 711-716.
- Hayashi, Y., Nomura, M., Yamagishi, S., Harada, S., Yamashita, J. and Yamamoto, H. (1997) Induction of various blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells by close apposition to co-cultured astrocytes. *Glia*, 19, 13-26.
- Haydon, P. G. and Carmignoto, G. (2006) Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol Rev*, 86, 1009-1031.
- Herlitz, H., Petersson, A., Sigstrom, L., Wennmalm, A. and Westberg, G. (1997) The arginine-nitric oxide pathway in thrombotic microangiopathy. *Scand J Urol Nephrol*, 31, 477-479.
- Hickey, W. F. (2001) Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system. *Glia*, 36, 118-124.
- Hirase, T., Staddon, J. M., Saitou, M., Ando-Akatsuka, Y., Itoh, M., Furuse, M., Fujimoto, K., Tsukita, S. and Rubin, L. L. (1997) Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *J Cell Sci*, 110 (Pt 14), 1603-1613.

- Huber, J. D., Egleton, R. D. and Davis, T. P. (2001) Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends Neurosci*, 24, 719-725.
- Huber, J. D., Hau, V. S., Borg, L., Campos, C. R., Egleton, R. D. and Davis, T. P. (2002) Blood-brain barrier tight junctions are altered during a 72-h exposure to lambda-carrageenan-induced inflammatory pain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 283, H1531-1537.
- Hurley, B. P., Jacewicz, M., Thorpe, C. M., Lincicome, L. L., King, A. J., Keusch, G. T. and Acheson, D. W. (1999) Shiga toxins 1 and 2 translocate differently across polarized intestinal epithelial cells. *Infect Immun*, 67, 6670-6677.
- Hurst, R. D. and Fritz, I. B. (1996) Properties of an immortalised vascular endothelial/glioma cell co-culture model of the blood-brain barrier. *J Cell Physiol*, 167, 81-88.
- Hurwitz, A. A., Lyman, W. D. and Berman, J. W. (1995) Tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta upregulate astrocyte expression of monocyte chemoattractant protein-1. *J Neuroimmunol*, 57, 193-198.
- Huseman, D., Gellermann, J., Vollmer, I., Ohde, I., Devaux, S., Ehrich, J. H. and Filler, G. (1999) Long-term prognosis of hemolytic uremic syndrome and effective renal plasma flow. *Pediatr Nephrol*, 13, 672-677.
- Inward, C. D., Howie, A. J., Fitzpatrick, M. M., Rafaat, F., Milford, D. V. and Taylor, C. M. (1997a) Renal histopathology in fatal cases of diarrhoea-associated haemolytic uraemic syndrome. *British Association for Paediatric Nephrology. Pediatr Nephrol*, 11, 556-559.
- Inward, C. D., Varaganam, M., Adu, D., Milford, D. V. and Taylor, C. M. (1997b) Cytokines in haemolytic uraemic syndrome associated with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infection. *Arch Dis Child*, 77, 145-147.
- Ishikawa, N., Kamitsuji, H., Murakami, T., Nakayama, A. and Umeki, Y. (2000) Plasma levels of granulocyte elastase-alpha1-proteinase inhibitor complex in children with hemolytic uremic syndrome caused by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *Pediatr Int*, 42, 637-641.
- Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G. and Minick, C. R. (1973) Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest*, 52, 2745-2756.
- Janzer, R. C. and Raff, M. C. (1987) Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature*, 325, 253-257.
- Kacem, K., Lacombe, P., Seylaz, J. and Bonvento, G. (1998) Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study. *Glia*, 23, 1-10.
- Kaneko, K., Kiyokawa, N., Ohtomo, Y., Nagaoka, R., Yamashiro, Y., Taguchi, T., Mori, T., Fujimoto, J. and Takeda, T. (2001) Apoptosis of renal tubular cells in Shiga-toxin-mediated hemolytic uremic syndrome. *Nephron*, 87, 182-185.
- Kaplan, B. S., Cleary, T. G. and Obrig, T. G. (1990) Recent advances in understanding the pathogenesis of the hemolytic uremic syndromes. *Pediatr Nephrol*, 4, 276-283.
- Kaplan, B. S. and Mills, M. (1988) Elevated serum elastase and alpha-1-antitrypsin levels in hemolytic uremic syndrome. *Clin Nephrol*, 30, 193-196.
- Karmali, M. A., Petric, M., Lim, C., Fleming, P. C., Arbus, G. S. and Lior, H. (1985) The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis*, 151, 775-782.

- Karmali, M. A., Steele, B. T., Petric, M. and Lim, C. (1983) Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet*, 1, 619-620.
- Karpman, D., Andreasson, A., Thysell, H., Kaplan, B. S. and Svanborg, C. (1995) Cytokines in childhood hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Pediatr Nephrol*, 9, 694-699.
- Karpman, D., Papadopoulou, D., Nilsson, K., Sjogren, A. C., Mikaelsson, C. and Lethagen, S. (2001) Platelet activation by Shiga toxin and circulatory factors as a pathogenetic mechanism in the hemolytic uremic syndrome. *Blood*, 97, 3100-3108.
- Keusch, G. T. and Acheson, D. W. (1997) Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with Shiga toxins. *Semin Hematol*, 34, 106-116.
- Keusch, G. T., Acheson, D. W., Aaldering, L., Erban, J. and Jacewicz, M. S. (1996) Comparison of the effects of Shiga-like toxin 1 on cytokine- and butyrate-treated human umbilical and saphenous vein endothelial cells. *J Infect Dis*, 173, 1164-1170.
- Kuchler-Bopp, S., Delaunoy, J. P., Artault, J. C., Zaepfel, M. and Dietrich, J. B. (1999) Astrocytes induce several blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells. *Neuroreport*, 10, 1347-1353.
- Kudva, I. T., Hatfield, P. G. and Hovde, C. J. (1997) Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* serotypes isolated from sheep. *J Clin Microbiol*, 35, 892-899.
- Lalo, U., Pankratov, Y., Kirchhoff, F., North, R. A. and Verkhratsky, A. (2006) NMDA receptors mediate neuron-to-glia signaling in mouse cortical astrocytes. *J Neurosci*, 26, 2673-2683.
- Lawrence, M. B. and Springer, T. A. (1993) Neutrophils roll on E-selectin. *J Immunol*, 151, 6338-6346.
- Lee, J. F., Zeng, Q., Ozaki, H., Wang, L., Hand, A. R., Hla, T., Wang, E. and Lee, M. J. (2006) Dual roles of tight junction-associated protein, zonula occludens-1, in sphingosine 1-phosphate-mediated endothelial chemotaxis and barrier integrity. *J Biol Chem*, 281, 29190-29200.
- Lee, S. C., Liu, W., Dickson, D. W., Brosnan, C. F. and Berman, J. W. (1993) Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 beta. *J Immunol*, 150, 2659-2667.
- Lee, T. Y. and Gotlieb, A. I. (2003) Microfilaments and microtubules maintain endothelial integrity. *Microsc Res Tech*, 60, 115-127.
- Ley, K., Bullard, D. C., Arbones, M. L., Bosse, R., Vestweber, D., Tedder, T. F. and Beaudet, A. L. (1995) Sequential contribution of L- and P-selectin to leukocyte rolling in vivo. *J Exp Med*, 181, 669-675.
- Litalien, C., Proulx, F., Mariscalco, M. M., Robitaille, P., Turgeon, J. P., Orrbine, E., Rowe, P. C., McLaine, P. N. and Seidman, E. (1999) Circulating inflammatory cytokine levels in hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 13, 840-845.
- Liu, K. K. and Dorovini-Zis, K. (2009) Regulation of CXCL12 and CXCR4 expression by human brain endothelial cells and their role in CD4+ and CD8+ T cell adhesion and transendothelial migration. *J Neuroimmunol*, 215, 49-64.
- Lopez, E. L., Contrini, M. M., Devoto, S., de Rosa, M. F., Grana, M. G., Aversa, L., Gomez, H. F., Genero, M. H. and Cleary, T. G. (1995) Incomplete hemolytic-uremic syndrome in Argentinean children with bloody diarrhea. *J Pediatr*, 127, 364-367.

- Lopez, E. L., Diaz, M., Grinstein, S., Devoto, S., Mendilaharsu, F., Murray, B. E., Ashkenazi, S., Rubeglio, E., Woloj, M., Vasquez, M. and et al. (1989) Hemolytic uremic syndrome and diarrhea in Argentine children: the role of Shiga-like toxins. *J Infect Dis*, 160, 469-475.
- Louise, C. B. and Obrig, T. G. (1992) Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: combined cytotoxic effects of shiga toxin and lipopolysaccharide (endotoxin) on human vascular endothelial cells in vitro. *Infect Immun*, 60, 1536-1543.
- Lum, H. and Roebuck, K. A. (2001) Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280, C719-741.
- Mackic, J. B., Weiss, M. H., Miao, W., Kirkman, E., Ghiso, J., Calero, M., Bading, J., Frangione, B. and Zlokovic, B. V. (1998) Cerebrovascular accumulation and increased blood-brain barrier permeability to circulating Alzheimer's amyloid beta peptide in aged squirrel monkey with cerebral amyloid angiopathy. *J Neurochem*, 70, 210-215.
- MacMicking, J., Xie, Q. W. and Nathan, C. (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol*, 15, 323-350.
- Madara, J. L. (1987) Intestinal absorptive cell tight junctions are linked to cytoskeleton. *Am J Physiol*, 253, C171-175.
- Mannucci, P. M., Lombardi, R., Lattuada, A., Ruggerenti, P., Vigano, G. L., Barbui, T. and Remuzzi, G. (1989) Enhanced proteolysis of plasma von Willebrand factor in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic uremic syndrome. *Blood*, 74, 978-983.
- Matise, I., Cornick, N. A., Booher, S. L., Samuel, J. E., Bosworth, B. T. and Moon, H. W. (2001) Intervention with Shiga toxin (Stx) antibody after infection by Stx-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis*, 183, 347-350.
- Matter, K. and Balda, M. S. (2003) Signalling to and from tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 225-236.
- Maxwell, K., Berliner, J. A. and Cancilla, P. A. (1987) Induction of gamma-glutamyl transpeptidase in cultured cerebral endothelial cells by a product released by astrocytes. *Brain Res*, 410, 309-314.
- McCarthy, K. D. and de Vellis, J. (1980) Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol*, 85, 890-902.
- McGraw, J., Hiebert, G. W. and Steeves, J. D. (2001) Modulating astrogliosis after neurotrauma. *J Neurosci Res*, 63, 109-115.
- Merrill, J. E. (1992) Proinflammatory and antiinflammatory cytokines in multiple sclerosis and central nervous system acquired immunodeficiency syndrome. *J Immunother* (1991), 12, 167-170.
- Meza, I., Ibarra, G., Sabanero, M., Martinez-Palomo, A. and Cereijido, M. (1980) Occluding junctions and cytoskeletal components in a cultured transporting epithelium. *J Cell Biol*, 87, 746-754.
- Middleton, J., Neil, S., Wintle, J., Clark-Lewis, I., Moore, H., Lam, C., Auer, M., Hub, E. and Rot, A. (1997) Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell*, 91, 385-395.
- Milford, D. V., Staten, J., MacGreggor, I., Dawes, J., Taylor, C. M. and Hill, F. G. (1991) Prognostic markers in diarrhoea-associated haemolytic-uraemic syndrome: initial neutrophil count, human neutrophil elastase and von Willebrand factor antigen. *Nephrol Dial Transplant*, 6, 232-237.
- Mitic, L. L. and Anderson, J. M. (1998) Molecular architecture of tight junctions. *Annu Rev Physiol*, 60, 121-142.

- Mizuguchi, M., Tanaka, S., Fujii, I., Tanizawa, H., Suzuki, Y., Igarashi, T., Yamanaka, T., Takeda, T. and Miwa, M. (1996) Neuronal and vascular pathology produced by verocytotoxin 2 in the rabbit central nervous system. *Acta Neuropathol*, 91, 254-262.
- Moake, J. L. (1994) Haemolytic-uraemic syndrome: basic science. *Lancet*, 343, 393-397.
- Mogi, M., Harada, M., Narabayashi, H., Inagaki, H., Minami, M. and Nagatsu, T. (1996) Interleukin (IL)-1 beta, IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor-alpha levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 211, 13-16.
- Mogi, M., Harada, M., Riederer, P., Narabayashi, H., Fujita, K. and Nagatsu, T. (1994) Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neurosci Lett*, 165, 208-210.
- Murata, A., Shimazu, T., Yamamoto, T., Taenaka, N., Nagayama, K., Honda, T., Sugimoto, H., Monden, M., Matsuura, N. and Okada, S. (1998) Profiles of circulating inflammatory- and anti-inflammatory cytokines in patients with hemolytic uremic syndrome due to *E. coli* O157 infection. *Cytokine*, 10, 544-548.
- Narushima, I., Kita, T., Kubo, K., Yonetani, Y., Momochi, C., Yoshikawa, I., Shimada, K. and Nakashima, T. (1999) Contribution of endothelin-1 to disruption of blood-brain barrier permeability in dogs. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 360, 639-645.
- Nedergaard, M. and Dirnagl, U. (2005) Role of glial cells in cerebral ischemia. *Glia*, 50, 281-286.
- O'Neill, L. A. and Kaltschmidt, C. (1997) NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci*, 20, 252-258.
- Oakes, R. S., Siegler, R. L., McReynolds, M. A., Pysher, T. and Pavia, A. T. (2006) Predictors of fatality in postdiarrheal hemolytic uremic syndrome. *Pediatrics*, 117, 1656-1662.
- Obata, F., Tohyama, K., Bonev, A. D., Kolling, G. L., Keepers, T. R., Gross, L. K., Nelson, M. T., Sato, S. and Obrig, T. G. (2008) Shiga toxin 2 affects the central nervous system through receptor globotriaosylceramide localized to neurons. *J Infect Dis*, 198, 1398-1406.
- Obrig, T. G., Del Vecchio, P. J., Karmali, M. A., Petric, M., Moran, T. P. and Judge, T. K. (1987) Pathogenesis of haemolytic uraemic syndrome. *Lancet*, 2, 687.
- Ohmi, K., Kiyokawa, N., Takeda, T. and Fujimoto, J. (1998) Human microvascular endothelial cells are strongly sensitive to Shiga toxins. *Biochem Biophys Res Commun*, 251, 137-141.
- Okayama, A., Mikasa, K., Matsui, N., Higashi, N., Miyamoto, M. and Kita, E. (2004) An interventional approach to block brain damage caused by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection, by use of a combination of phosphodiesterase inhibitors. *J Infect Dis*, 190, 2129-2136.
- Palermo, M., Alves-Rosa, F., Rubel, C., Fernandez, G. C., Fernandez-Alonso, G., Alberto, F., Rivas, M. and Isturiz, M. (2000) Pretreatment of mice with lipopolysaccharide (LPS) or IL-1beta exerts dose-dependent opposite effects on Shiga toxin-2 lethality. *Clin Exp Immunol*, 119, 77-83.
- Palmeri, D., van Zante, A., Huang, C. C., Hemmerich, S. and Rosen, S. D. (2000) Vascular endothelial junction-associated molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily, is localized to intercellular boundaries of endothelial cells. *J Biol Chem*, 275, 19139-19145.

- Pardridge, W. M. (2003) Blood-brain barrier drug targeting: the future of brain drug development. *Mol Interv*, 3, 90-105, 151.
- Pareti, F. I., Capitanio, A., Mannucci, L., Ponticelli, C. and Mannucci, P. M. (1980) Acquired dysfunction due to the circulation of "exhausted" platelets. *Am J Med*, 69, 235-240.
- Paton, J. C. and Paton, A. W. (1998) Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev*, 11, 450-479.
- Pekny, M. and Nilsson, M. (2005) Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia*, 50, 427-434.
- Perez, N., Spizzirri, F., Rahman, R., Suarez, A., Larrubia, C. and Lasarte, P. (1998) Steroids in the hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 12, 101-104.
- Petty, M. A. and Lo, E. H. (2002) Junctional complexes of the blood-brain barrier: permeability changes in neuroinflammation. *Prog Neurobiol*, 68, 311-323.
- Prat, A., Biernacki, K., Lavoie, J. F., Poirier, J., Duquette, P. and Antel, J. P. (2002) Migration of multiple sclerosis lymphocytes through brain endothelium. *Arch Neurol*, 59, 391-397.
- Prat, A., Biernacki, K., Pouly, S., Nalbantoglu, J., Couture, R. and Antel, J. P. (2000) Kinin B1 receptor expression and function on human brain endothelial cells. *J Neuropathol Exp Neurol*, 59, 896-906.
- Proulx, F., Turgeon, J. P., Litalien, C., Mariscalco, M. M., Robitaille, P. and Seidman, E. (1998) Inflammatory mediators in *Escherichia coli* O157:H7 hemorrhagic colitis and hemolytic-uremic syndrome. *Pediatr Infect Dis J*, 17, 899-904.
- Provost, P., Lam, J. Y., Lacoste, L., Merhi, Y. and Waters, D. (1994) Endothelium-derived nitric oxide attenuates neutrophil adhesion to endothelium under arterial flow conditions. *Arterioscler Thromb*, 14, 331-335.
- Provost, P. and Merhi, Y. (1997a) Endogenous nitric oxide release modulates mural platelet thrombosis and neutrophil-endothelium interactions under low and high shear conditions. *Thromb Res*, 85, 315-326.
- Provost, P. and Merhi, Y. (1997b) Endothelium-derived nitric oxide decreases polymorphonuclear leukocyte interaction with the deeply injured arterial wall under intermediate and high shear conditions. *Thromb Haemost*, 78, 939-946.
- Radomski, M. W., Palmer, R. M. and Moncada, S. (1987) Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet*, 2, 1057-1058.
- Ramegowda, B., Samuel, J. E. and Tesh, V. L. (1999) Interaction of Shiga toxins with human brain microvascular endothelial cells: cytokines as sensitizing agents. *J Infect Dis*, 180, 1205-1213.
- Rasoulpour, M., Leichtner, A., San Jorge, M. and Hyams, J. (1985) Cerebral vascular accident during the recovery phase of hemolytic uremic syndrome. *Int J Pediatr Nephrol*, 6, 287-288.
- Reese, T. S. and Karnovsky, M. J. (1967) Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol*, 34, 207-217.
- Remuzzi, G. and Ruggenti, P. (1995) The hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int*, 48, 2-19.
- Remuzzi, G. and Ruggenti, P. (1998) The hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int Suppl*, 66, S54-57.
- Repetto, H. A. (2005) Long-term course and mechanisms of progression of renal disease in hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int Suppl*, S102-106.
- Reuss, B., Dono, R. and Unsicker, K. (2003) Functions of fibroblast growth factor (FGF)-2 and FGF-5 in astroglial differentiation and blood-brain barrier permeability: evidence from mouse mutants. *J Neurosci*, 23, 6404-6412.

- Rhodes, K. E., Moon, L. D. and Fawcett, J. W. (2003) Inhibiting cell proliferation during formation of the glial scar: effects on axon regeneration in the CNS. *Neuroscience*, 120, 41-56.
- Rivas, M., Balbi, L., Miliwebsky, E. S., Garcia, B., Tous, M. I., Leardini, N. A., Prieto, M. A., Chillemi, G. M. and de Principi, M. E. (1998) [Hemolytic uremic syndrome in children of Mendoza, Argentina: association with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection]. *Medicina*, 58, 1-7.
- Rollins, B. J., Yoshimura, T., Leonard, E. J. and Pober, J. S. (1990) Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. *Am J Pathol*, 136, 1229-1233.
- Rossi, D. J., Brady, J. D. and Mohr, C. (2007) Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. *Nat Neurosci*, 10, 1377-1386.
- Ruggenti, P., Noris, M. and Remuzzi, G. (2001) Thrombotic microangiopathy, hemolytic uremic syndrome, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Kidney Int*, 60, 831-846.
- Sanchez Avalos, J. C. (2000) [Thrombotic microangiopathies: HUS/TTP. Physiopathological aspects]. *Medicina*, 60, 46-58.
- Sandvig, K. and van Deurs, B. (2000) Entry of ricin and Shiga toxin into cells: molecular mechanisms and medical perspectives. *Embo J*, 19, 5943-5950.
- Satoh, H., Zhong, Y., Isomura, H., Saitoh, M., Enomoto, K., Sawada, N. and Mori, M. (1996) Localization of 7H6 tight junction-associated antigen along the cell border of vascular endothelial cells correlates with paracellular barrier function against ions, large molecules, and cancer cells. *Exp Cell Res*, 222, 269-274.
- Scemes, E. and Giaume, C. (2006) Astrocyte calcium waves: what they are and what they do. *Glia*, 54, 716-725.
- Sheth, K. J., Swick, H. M. and Haworth, N. (1986) Neurological involvement in hemolytic-uremic syndrome. *Ann Neurol*, 19, 90-93.
- Shiau, M. Y., Chiou, H. L., Lee, Y. L., Kuo, T. M. and Chang, Y. H. (2001) Establishment of a consistent L929 bioassay system for TNF-alpha quantitation to evaluate the effect of lipopolysaccharide, phytomitogens and cytodifferentiation agents on cytotoxicity of TNF-alpha secreted by adherent human mononuclear cells. *Mediators Inflamm*, 10, 199-208.
- Shukaliak, J. A. and Dorovini-Zis, K. (2000) Expression of the beta-chemokines RANTES and MIP-1 beta by human brain microvessel endothelial cells in primary culture. *J Neuropathol Exp Neurol*, 59, 339-352.
- Shultz, P. J., Tayeh, M. A., Marletta, M. A. and Raij, L. (1991) Synthesis and action of nitric oxide in rat glomerular mesangial cells. *Am J Physiol*, 261, F600-606.
- Siegler, R. L. (1994) Spectrum of extrarenal involvement in postdiarrheal hemolytic-uremic syndrome. *J Pediatr*, 125, 511-518.
- Siegler, R. L., Edwin, S. S., Christofferson, R. D. and Mitchell, M. D. (1991) Endothelin in the urine of children with the hemolytic uremic syndrome. *Pediatrics*, 88, 1063-1066.
- Siegler, R. L., Pavia, A. T., Christofferson, R. D. and Milligan, M. K. (1994) A 20-year population-based study of postdiarrheal hemolytic uremic syndrome in Utah. *Pediatrics*, 94, 35-40.
- Small, J. V., Rottner, K. and Kaverina, I. (1999) Functional design in the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*, 11, 54-60.
- Spizzirri, F. D., Perez, N., Suarez, A., Cobenas, C., Rahman, R. C. and Alconcher, L. (1997a) Hemolytic uremic syndrome: presence or absence of diarrheal prodromes. *J Pediatr*, 131, 937-938.

- Spizzirri, F. D., Rahman, R. C., Bibiloni, N., Ruscasso, J. D. and Amoreo, O. R. (1997b) Childhood hemolytic uremic syndrome in Argentina: long-term follow-up and prognostic features. *Pediatr Nephrol*, 11, 156-160.
- Stamatovic, S. M., Shakui, P., Keep, R. F., Moore, B. B., Kunkel, S. L., Van Rooijen, N. and Andjelkovic, A. V. (2005) Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability. *J Cereb Blood Flow Metab*, 25, 593-606.
- Steinborn, M., Leiz, S., Rudisser, K., Griebel, M., Harder, T. and Hahn, H. (2004) CT and MRI in haemolytic uraemic syndrome with central nervous system involvement: distribution of lesions and prognostic value of imaging findings. *Pediatr Radiol*, 34, 805-810.
- Stevenson, B. R. and Begg, D. A. (1994) Concentration-dependent effects of cytochalasin D on tight junctions and actin filaments in MDCK epithelial cells. *J Cell Sci*, 107 (Pt 3), 367-375.
- Stewart, P. A. and Wiley, M. J. (1981) Developing nervous tissue induces formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells: a study using quail--chick transplantation chimeras. *Dev Biol*, 84, 183-192.
- Tai, L. M., Holloway, K. A., Male, D. K., Loughlin, A. J. and Romero, I. A. (2009) Amyloid-beta-induced occludin down-regulation and increased permeability in human brain endothelial cells is mediated by MAPK activation. *J Cell Mol Med*.
- Takagi, C. and Naruse, T. (1997) [Verotoxin induced hemolytic uremic syndrome: pathophysiology of neurological involvement]. *Nippon Rinsho*, 55, 731-735.
- Takeda, T., Yoshino, K., Adachi, E., Sato, Y. and Yamagata, K. (1999) In vitro assessment of a chemically synthesized Shiga toxin receptor analog attached to chromosorb P (Synsorb Pk) as a specific absorbing agent of Shiga toxin 1 and 2. *Microbiol Immunol*, 43, 331-337.
- Takeichi, M. (1995) Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol*, 7, 619-627.
- Tao, Y. S., Edwards, R. A., Tubb, B., Wang, S., Bryan, J. and McCrea, P. D. (1996) beta-Catenin associates with the actin-bundling protein fascin in a noncadherin complex. *J Cell Biol*, 134, 1271-1281.
- Taylor, C. M., Williams, J. M., Lote, C. J., Howie, A. J., Thewles, A., Wood, J. A., Milford, D. V., Raafat, F., Chant, I. and Rose, P. E. (1999) A laboratory model of toxin-induced hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int*, 55, 1367-1374.
- te Loo, D. M., Monnens, L. A., van Der Velden, T. J., Vermeer, M. A., Preyers, F., Demacker, P. N., van Den Heuvel, L. P. and van Hinsbergh, V. W. (2000) Binding and transfer of verocytotoxin by polymorphonuclear leukocytes in hemolytic uremic syndrome. *Blood*, 95, 3396-3402.
- Thorpe, C. M., Flaumenhaft, R., Hurley, B., Jacewicz, M., Acheson, D. W. and Keusch, G. T. (1999) Shiga toxins do not directly stimulate alpha-granule secretion or enhance aggregation of human platelets. *Acta Haematol*, 102, 51-55.
- Tout, S., Dreher, Z., Chan-Ling, T. and Stone, J. (1993) Contact-spacing among astrocytes is independent of neighbouring structures: in vivo and in vitro evidence. *J Comp Neurol*, 332, 433-443.
- Tsao, N., Hsu, H. P., Wu, C. M., Liu, C. C. and Lei, H. Y. (2001) Tumour necrosis factor-alpha causes an increase in blood-brain barrier permeability during sepsis. *J Med Microbiol*, 50, 812-821.
- Tsukita, S., Furuse, M. and Itoh, M. (2001) Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 285-293.

- Tzipori, S., Chow, C. W. and Powell, H. R. (1988) Cerebral infection with *Escherichia coli* O157:H7 in humans and gnotobiotic piglets. *J Clin Pathol*, 41, 1099-1103.
- Van Damme-Lombaerts, R., Proesmans, W., Van Damme, B., Eeckels, R., Binda ki Muaka, P., Mercieca, V., Vlietinck, R. and Vermynen, J. (1988) Heparin plus dipyridamole in childhood hemolytic-uremic syndrome: a prospective, randomized study. *J Pediatr*, 113, 913-918.
- van de Kar, N. C., Monnens, L. A., Karmali, M. A. and van Hinsbergh, V. W. (1992) 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*, 80, 2755-2764.
- van Hinsbergh, V. W. and van Nieuw Amerongen, G. P. (2002) Intracellular signalling involved in modulating human endothelial barrier function. *J Anat*, 200, 549-560.
- Van Itallie, C. M., Balda, M. S. and Anderson, J. M. (1995) Epidermal growth factor induces tyrosine phosphorylation and reorganization of the tight junction protein ZO-1 in A431 cells. *J Cell Sci*, 108 (Pt 4), 1735-1742.
- van Setten, P. A., Monnens, L. A., Verstraten, R. G., van den Heuvel, L. P. and van Hinsbergh, V. W. (1996) Effects of verocytotoxin-1 on nonadherent human monocytes: binding characteristics, protein synthesis, and induction of cytokine release. *Blood*, 88, 174-183.
- van Setten, P. A., van Hinsbergh, V. W., van den Heuvel, L. P., Preyers, F., Dijkman, H. B., Assmann, K. J., van der Velden, T. J. and Monnens, L. A. (1998) Monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 levels in urine and serum of patients with hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Res*, 43, 759-767.
- van Setten, P. A., van Hinsbergh, V. W., van der Velden, T. J., van de Kar, N. C., Vermeer, M., Mahan, J. D., Assmann, K. J., van den Heuvel, L. P. and Monnens, L. A. (1997) Effects of TNF alpha on verocytotoxin cytotoxicity in purified human glomerular microvascular endothelial cells. *Kidney Int*, 51, 1245-1256.
- Vandenbroucke, E., Mehta, D., Minshall, R. and Malik, A. B. (2008) Regulation of endothelial junctional permeability. *Ann N Y Acad Sci*, 1123, 134-145.
- Verkhatsky, A. and Toescu, E. C. (2006) Neuronal-glial networks as substrate for CNS integration. *J Cell Mol Med*, 10, 826-836.
- Verweyen, H. M., Karch, H., Allerberger, F. and Zimmerhackl, L. B. (1999) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) in pediatric hemolytic-uremic syndrome: a prospective study in Germany and Austria. *Infection*, 27, 341-347.
- Viisoreanu, D., Polanowska-Grabowska, R., Suttitanamongkol, S., Obrig, T. G. and Gear, A. R. (2000) Human platelet aggregation is not altered by Shiga toxins 1 or 2. *Thromb Res*, 98, 403-410.
- Volterra, A. and Meldolesi, J. (2005) Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci*, 6, 626-640.
- Vorbrodt, A. W. and Dobrogowska, D. H. (2004) Molecular anatomy of interendothelial junctions in human blood-brain barrier microvessels. *Folia Histochem Cytobiol*, 42, 67-75.
- Walters, M. D., Levin, M., Smith, C., Nokes, T. J., Hardisty, R. M., Dillon, M. J. and Barratt, T. M. (1988) Intravascular platelet activation in the hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int*, 33, 107-115.
- Walters, M. D., Matthei, I. U., Kay, R., Dillon, M. J. and Barratt, T. M. (1989) The polymorphonuclear leucocyte count in childhood haemolytic uraemic syndrome. *Pediatr Nephrol*, 3, 130-134.

- Walterspiel, J. N., Ashkenazi, S., Morrow, A. L. and Cleary, T. G. (1992) Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on extracellular Shiga-like toxin I. *Infection*, 20, 25-29.
- Wang, J. Y., Shum, A. Y., Chao, C. C. and Kuo, J. S. (2000) Production of macrophage inflammatory protein-2 following hypoxia/reoxygenation in glial cells. *Glia*, 32, 155-164.
- Westerholt, S., Hartung, T., Tollens, M., Gustrau, A., Oberhoffer, M., Karch, H., Klare, B., Pfeffer, K., Emmrich, P. and Oberhoffer, R. (2000) Inflammatory and immunological parameters in children with haemolytic uremic syndrome (HUS) and gastroenteritis-pathophysiological and diagnostic clues. *Cytokine*, 12, 822-827.
- Wheeler, M. A., Smith, S. D., Garcia-Cardena, G., Nathan, C. F., Weiss, R. M. and Sessa, W. C. (1997) Bacterial infection induces nitric oxide synthase in human neutrophils. *J Clin Invest*, 99, 110-116.
- Wieler, L. H., Schwanitz, A., Vieler, E., Busse, B., Steinruck, H., Kaper, J. B. and Baljer, G. (1998) Virulence properties of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains of serogroup O118, a major group of STEC pathogens in calves. *J Clin Microbiol*, 36, 1604-1607.
- Wilson, M. E. (1985) Effects of bacterial endotoxins on neutrophil function. *Rev Infect Dis*, 7, 404-418.
- Williams, K. C. and Hickey, W. F. (1995) Traffic of hematogenous cells through the central nervous system. *Curr Top Microbiol Immunol*, 202, 221-245.
- Wong, D. and Dorovini-Zis, K. (1992) Upregulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in primary cultures of human brain microvessel endothelial cells by cytokines and lipopolysaccharide. *J Neuroimmunol*, 39, 11-21.
- Wong, D. and Dorovini-Zis, K. (1996) Regulation by cytokines and lipopolysaccharide of E-selectin expression by human brain microvessel endothelial cells in primary culture. *J Neuropathol Exp Neurol*, 55, 225-235.
- Wu, K. K. and Thiagarajan, P. (1996) Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. *Annu Rev Med*, 47, 315-331.
- Wuthrich, R. P. (1992) Intercellular adhesion molecules and vascular cell adhesion molecule-1 and the kidney. *J Am Soc Nephrol*, 3, 1201-1211.
- Yamada, Y., Fujii, J., Murasato, Y., Nakamura, T., Hayashida, Y., Kinoshita, Y., Yutsudo, T., Matsumoto, T. and Yoshida, S. (1999) Brainstem mechanisms of autonomic dysfunction in encephalopathy-associated Shiga toxin 2 intoxication. *Ann Neurol*, 45, 716-723.
- Yamagami, S., Motoki, M., Kimura, T., Izumi, H., Takeda, T., Katsuura, Y. and Matsumoto, Y. (2001) 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*, 184, 738-742.
- Yoshimura, K., Fujii, J., Yutsudo, T., Kikuchi, R., Soejima, T., Shirahata, S. and Yoshida, S. (1998) No direct effects of Shiga toxin 1 and 2 on the aggregation of human platelets in vitro. *Thromb Haemost*, 80, 529-530.
- Zach, O., Bauer, H. C., Richter, K., Webersinke, G., Tontsch, S. and Bauer, H. (1997) Expression of a chemotactic cytokine (MCP-1) in cerebral capillary endothelial cells in vitro. *Endothelium*, 5, 143-153.
- Zhang, W., Smith, C., Howlett, C. and Stanimirovic, D. (2000) Inflammatory activation of human brain endothelial cells by hypoxic astrocytes in vitro is mediated by IL-1beta. *J Cereb Blood Flow Metab*, 20, 967-978.

- Zhou, C. F., Lawrence, J. M., Morris, R. J. and Raisman, G. (1986) Migration of host astrocytes into superior cervical sympathetic ganglia autografted into the septal nuclei or choroid fissure of adult rats. *Neuroscience*, 17, 815-827.
- Zoja, C., Corna, D., Farina, C., Sacchi, G., Lingwood, C., Doyle, M. P., Padhye, V. V., Abbate, M. and Remuzzi, G. (1992) Verotoxin glycolipid receptors determine the localization of microangiopathic process in rabbits given verotoxin-1. *J Lab Clin Med*, 120, 229-238.