

Tesis Doctoral

# Acción de la toxina Shiga 2 producida por Escherichia coli enterohemorrágica en el Sistema Nervioso

Tironi Farinati, Alicia Carla Flavia

2013-08-28

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Tironi Farinati, Alicia Carla Flavia. (2013-08-28). Acción de la toxina Shiga 2 producida por Escherichia coli enterohemorrágica en el Sistema Nervioso. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Tironi Farinati, Alicia Carla Flavia. "Acción de la toxina Shiga 2 producida por Escherichia coli enterohemorrágica en el Sistema Nervioso". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013-08-28.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Acción de la toxina Shiga 2 producida por *Escherichia coli*  
enterohemorrágica en el Sistema Nervioso**

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

**Lic. Alicia Carla Flavia Tironi Farinati**

Director de Tesis: Dr. Jorge Goldstein Rajj  
Directora Asistente: Dra. Cristina Ibarra  
Consejera de Estudios: Dra. Lidia Szczupack

Departamento de Fisiología, Laboratorio de Neurofisiopatología  
Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires  
Buenos Aires, 2013

**A Alicia y Carlos.**

**A Coni por las carreras de tatamis.**

Resumen	8
Abstract	9
Agradecimientos	10
Publicaciones	12
<b>Capítulo 1: Introducción y Objetivos</b>	16
Historia de la Toxina Shiga	18
La familia de Toxinas Shiga	19
Relevancia y Costos del problema en la Argentina	20
Acción de la toxina Shiga	21
La estructura de Stx2	21
Diferencias entre Stx1 y Stx2	21
Origen del SUH	22
Características del SUH, mecanismo y epidemiología	23
Encefalopatías originadas por la toxina Shiga	24
Histopatología del SNC en humanos	24
Resonancia Magnética	24
Alteraciones en el líquido céfalorraquídeo y en plasma	25
Modelos animales utilizados	25
Modelos murinos para estudiar el efecto de Stx2 en el SNC	25
Efecto de la Stx2 por inoculación con STEC	26
Efecto de la administración periférica de Stx en el SNC	27
Modelos en rata de daño del SNC por Stx2	27
Efecto local de Stx2 en el SNC	27
Administración Intraperitoneal de Sobrenadante Conteniendo Stx2	27
Objetivo General	30
Objetivos específicos	30
<b>Capítulo 2: Estudio de la expresión y localización del receptor de la toxina Shiga: Gb3</b>	31
Introducción	32
El receptor de la Toxina Shiga tipo 2: Gb3	32
Afinidad de Stx2 por Gb3	32
Distribución de Gb3 en el SNC	33
Materiales y métodos	34

Purificación de Stx2	34
Clonado de Stx2	34
Purificación de Stx2 por cromatografía	35
Inmunodetección de Stx2 por Western-Blot	36
Detección de proteínas de las muestras: Coomassie Blue	36
Remoción de LPS (endotoxinas)	38
Detección de la cantidad de LPS en la muestra	38
Actividad Biológica de la Stx2	38
Animales utilizados	40
Inyección ICV y Tratamiento	40
Inmunofluorescencias	42
Visualización de Gb3 y Stx2	42
Visualización de Gb3 y MAP2	42
Visualización de Gb3 y GFAP	42
Visualización de Bax	43
Controles	43
Imágenes confocales	44
Densidad óptica (IOD) y análisis de Gb3	44
Resultados	45
Manifestaciones neurológicas	45
Stx2 aumenta la expresión del receptor Gb3 en neuronas	45
La administración local de Stx2 aumenta la expresión de Gb3 hasta el día 8 de tratamiento	46
La administración local de Stx2 aumenta la expresión del receptor Gb3 y altera la expresión de MAP2 en diferentes poblaciones neuronales de cerebros de rata	47
La expresión aumentada de Gb3 luego de la administración de Stx2 se localizó en las zonas donde se encontraron astrocitos reactivos	57
El receptor Gb3 colocaliza con Stx2 en neuronas	60
La proteína proapoptótica Bax se inmunolocalizó en neuronas de poblaciones de varias regiones cerebrales luego de la administración ICV de Stx2	61
Variación del peso del animal como consecuencia de Stx2	63
Discusión	64
<b>Capítulo 3: Estudio translacional de un modelo murino de intoxicación subletal con toxina Shiga 2 en cerebros</b>	<b>70</b>

Introducción	70
Modelos animales utilizados en el estudio de los efectos de la toxina Shiga en el SNC	71
Ratones	72
Rata	72
Conejos	73
Cerdos	73
Monos	73
En seres humanos	73
Objetivo	74
Protocolos y métodos	75
Animales utilizados	75
Determinación de la dosis letal 50 Stx2 (DL50)	76
Determinación de la Dosis subletal de Stx2	76
Modos de administración de Stx2	76
Intravenoso	77
Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	77
Estudios Hematológicos	77
Variación de masa corporal	78
Marcación con Fluor Jade-B	78
Inmunofluorescencia	79
Visualización del núcleo neuronal (NeuN)	79
Visualización del endotelio (Lectinas)	80
Visualización y procesamiento de las imágenes	80
Estudios Comportamentales	81
Características generales	81
Inyecciones Intravenosas en Campo Abierto, Mazo Elevado, Rotarod y Reconocimiento de Objetos	82
Campo Abierto	82
Reconocimiento de Objetos	83
Mazo en T Elevado	85
Rotarod	85
Análisis estadístico de los tests comportamentales	86
SHIRPA	86
Resultados	88
Administración endovenosa de Stx2	88

La administración de Stx2 produce degeneración neuronal	90
La administración de dsStx2 causa edema en astrocitos e infiltración de mastocitos	92
Stx2 altera la integridad de la barrera hematoencefálica	95
La toxina Shiga causa la interrupción de la sinapsis	95
La administración de Stx2 causa alteraciones ultraestructurales en oligodendrocitos	99
La administración de Stx2 causa neurodegeneración en varias zonas del cerebro	102
Stx2 se detecta en el hipocampo a 4 días de ser administrada	103
Stx2 produce reacción astrocitaria	104
Stx2 produce un aumento de Gb3	106
Stx2 en dosis subletales no produce variaciones en el nivel de Urea	107
La toxina Shiga suministrada en dosis subletales no varía el nivel de Creatinina	108
La toxina Shiga en dosis subletales no varía el nivel de Hematocrito	110
La toxina Shiga suministrada en dosis subletales contribuye en aumentar el nivel de Hemoglobina en sangre	112
Cambios comportamentales a corto y largo plazo debido al efecto de dosis subletales de Stx2 en ratones	112
La toxina Shiga en dosis subletales altera los parámetros motores de ratones	112
La toxina Shiga en dosis subletales altera la memoria de ratones	114
La toxina Shiga en dosis subletales no afecta el nivel de ansiedad en ratones	116
La toxina Shiga en 0.1 dosis subletales no altera la actividad locomotriz espontánea de ratones	117
La toxina Shiga en 0.1 dosis subletales no altera la coordinación motora ni el balance en ratones	119
Conclusiones	121
<b>Capítulo 4: Estudio de diferentes sustancias con posible potencial de bloquear la acción citotóxica de la toxina Shiga 2</b>	131
Introducción	132
Sustancias que se analizaron en este trabajo para bloquear la acción de Stx2	133
Péptidos como inhibidores de la acción de Stx2	133

Sustancias Farmacológicas como inhibidores putativos de la acción de Stx2	133
Dexametasona	134
L-name	135
Etanercept	135
Pentoxifilina	135
Probióticos como inhibidores de la acción de Stx2	136
Anticuerpos como neutralizantes de la acción de Stx2	137
El reservorio de Stx2	137
Objetivo	138
Protocolos y Métodos	138
Clonado y Producción de Proteínas Recombinantes	138
Stx2BMut, Stx2B Cons y Stx2B	139
Producción de Stx2B y Proteínas Mutantes	139
Estudio de la sobrevida de ratones frente a diferentes sustancias	140
Determinación de TNF- $\alpha$ en el cerebro y suero mediante ELISA	141
Producción de Anticuerpos contra Stx2 en Vacunos	141
Formulación vacunadora	141
Animales	141
Preparación de Stx2 inactivada	142
Esquema de inmunización	143
Toma de muestras	143
Neutralización de la acción de Stx2 en células Vero	143
Neutralización de la acción de Stx2 in vivo, sobrevida en ratones	143
Inhibición por sustancias Probióticas	144
Producción de Stx2 por cepas O157:H7 y cepas recombinantes	144
Obtención del sobrenadante de cultivo de E. coli EHEC	144
Obtención de la suspensión de lactobacilos	144
Tratamiento de los lactobacilos con calor y enzimas proteolíticas	145
Preparación de las paredes celulares de los lactobacilos	145
Determinación- cuantitativa de la actividad hemolítica de los sobrenadantes con EHEC 157:H7	146
Determinación cuantitativa de la toxicidad del sobrenadante de EHEC en células Vero	146
Medidas de la protección de los Lactobacillus de la actividad citotóxica del sobrenadante de EHEC	147



Análisis Estadístico	147
Resultados	149
La administración de Stx2 aumenta la expresión de TNF- $\alpha$ en suero	149
La administración de 2DL50 de Stx2 aumenta el nivel de TNF en el cerebro	149
Estudio de diferentes agentes antiinflamatorios en la supervivencia de ratones	150
Determinación de la capacidad Protectora de los anticuerpos anti Stx2 en vacunos	152
El calostro de vacas y el suero de terneros inhiben la citotoxicidad de Stx2 en células Vero	152
El calostro de bovinos inoculados con Stx2 logra impedir la acción deletérea de Stx2 en ratones	154
Mutantes como inhibidores putativos de la acción de Stx2	154
Los péptidos Stx2BCons y StxB-Mut no inhiben la acción citotóxica de Stx2 in vitro	155
Los péptidos Stx2B, Stx2BMut y Stx2BCons no inhiben la acción citotóxica de Stx2 in vivo en ratones	157
Lb. plantarum logra inhibir la acción de Stx2	157
Diferentes cepas de Lactobacilli pueden antagonizar los efectos asociados con Stx2	159
Conclusiones	163
Antinflamatorios	163
Producción de Anticuerpos contra Stx2 e inmunización pasiva	164
Probióticos	165
Mutantes	166
Conclusiones Finales y Perspectivas Futuras	167
Bibliografía	168

## **Acción de la toxina Shiga 2 producida por *Escherichia coli* enterohemorrágica en el Sistema Nervioso**

La toxina Shiga 2 (Stx2) producida por *Escherichia coli* enterohemorrágica es la principal causa de diarrea asociada a síndrome urémico hemolítico e insuficiencia renal. El 30 % de la población infantil que sufre SUH padece alteraciones en el sistema nervioso central (SNC).

Nos propusimos determinar la expresión del receptor Gb3, el cual produce la entrada de la toxina en las células que lo poseen, en condiciones normales y luego de la administración intracerebroventricular de Stx2 en cerebros de roedores. Observamos que el receptor Gb3 se expresa en neuronas y aumenta con la administración local de Stx2. La interacción Gb3-Stx2 en neuronas podría contribuir al daño producido por las encefalopatías derivadas del SUH en niños intoxicados por ingestión de productos contaminados por *E. coli* enterohemorrágica. También caracterizamos el efecto de dosis subletales de Stx2 (dsStx2) administrada vía intravenosa por ultraestructura que se correlacionó con tests de comportamiento por primera vez. Este modelo translacional nos fue útil para determinar que dosis subletales de la toxina son capaces de generar un daño cronológico significativo de eventos en cerebros de ratones, que podría explicar las lesiones neurológicas que remiten o resultan ser permanentes en pacientes intoxicados. Un significativo edema perivascular se observó luego de 2 días de la administración sistémica de Stx2, daño en astrocitos a los 4 días, y en neuronas y oligodendrocitos luego de 8 días. También fue importante encontrar extravasación de mastocitos y sinapsis interrumpidas.

Finalmente el tratamiento de la Dexametasona, un antiinflamatorio, el *Lactobacillus Plantarum*, y/o anticuerpos anti-Stx2 logran neutralizar la acción de Stx2.

Estos estudios servirán como antecedentes para desentrañar a futuro los mecanismos celulares y moleculares involucrados en los procesos neuropatológicos durante la fase aguda de la intoxicación. En base a este conocimiento, agentes terapéuticos pueden ser utilizados para neutralizar la Stx2 a nivel central.

### **Palabras clave**

Stx2, toxina shiga, gb3, inhibidores, comportamiento, neuroprotectores, anticuerpos, vacuna, CNS, regulación positiva.

## **Action of the Shiga Toxin type 2 produced by *enterohaemorrhagic Escherichia coli* (EHEC) in the Nervous Central System**

Shiga toxin (Stx2) produced by *Escherichia coli* enterohemorrhagic is the main cause of diarrhea associated to the hemolytic uremic syndrome. 30% of the child population that suffers from HUS shows alterations in the central nervous system (CNS).

We observed that Stx2's receptor Gb3 is expressed in neurons and its expression is upregulated after the administration of Stx2. The Gb3-Stx2 interaction in neurons could contribute to the damage produced by HUS derived encephalopathies in children.

We also studied the effect of the sub lethal doses of Stx2 administrated endovenously and for first time we found comportamental changes in mice. This translational model was useful to determine that sublethal doses of Stx2 are able to produce a significative chronologic damage in the mice brain, that might explain the neuropatological lesions that occurs in intoxicated patients. Two days after the administration of Stx2 we observed perivascular edema, astrocitary damage at the 4<sup>th</sup> day and damage in neurons and oligodendrocytes at the 8th day. Another important discovery was to found tripartite synapses and mastocyte extravasation.

Finally a treatment with Dexamethasone, an antiinflammatory, the *Lactobacillus Plantarum*, and/or antibodies anti-Stx2 neutralize the action of Stx2.

These studies will serve as antecedents to unveil the cell and molecular mechanisms involved in the neuropathologic processes during the acute phase of the intoxication. Based on this knowledge, therapeutic agents can be used to neutralize Stx2 at central level.

### **Keywords**

Stx2, shiga toxin, gb3, inhibitors, behavior, neuroprotector, antibody, vaccine, SNC, upregulation.

## **Agradecimientos**

A Alicia y Carlos, por todo lo infinito

Constanza Majdalani, porque sin vos no existiría esta tesis ni nada de nada

Karina Gallo, por aguantar mis delirios tesisicos y durate todo el comienzo de la travesía

Jorge Goldstein, por la paciencia y el conocimiento brindados todos estos años

Mariano Miyakawa, por ser mi amigo y por la ayuda invaluable

Cristina Ibarra, por abrirme al mundo de la fisiología y por sus consejos, recomendaciones e intercambios científicos,

Julián Cardozo, por ser la persona más linda de los pasillos de Medicina

Julia Graft por todo el tiempo compartido en el laboratorio

A mis amigos de siempre que tantas veces escucharon la palabra “T” y tantas veces me alentaron: Julian Cardozo, Maria Elena Bogado, Jess Coppola, Maryan Noeli, Jorgelina Sciorra, Evan Rossi, Pao Ruiz, Gabriela Alfano, Fernando Roldán, Fernando Crespo Alvarez, Marcela Cucher, Agustina Casot

A Daniel Goldstein y Jorge Medina por la inspiración

A Moisés Burachik por la ayuda inconmensurable de ser quien es

A Patricia Gheogan y Adriana Cangelosi, por hacer experimentos y aprender juntas

A Angel Cataldi y Elsa Mercado por recibirme en su laboratorio, por sus consejos, recomendaciones e intercambios científicos

A Fabian Loidl, Manuel Reyes Funes, Mariano Ibarra, por la buena onda y los mates compartidos

A todos los miembros del Laboratorio de Neurofisiopatología del Departamento de

Fisiología de la UBA

A Yanil Parma y Winston Morris, por colaborar conmigo y ponerle la mejor onda

A Mariana y Mery, por los secretos de microscopía volcados mientras trabajábamos

Guillherme, Maribel y Carlos, por mostrarme el mundo de la neurociencia del comportamiento

A mis compañeros de Exactas por todos los años de estudio que pasamos juntos

A todas las personas que contribuyeron de una u otra forma en mi camino por la ciencia.

## **Publicaciones**

### **A translational murine model of sub-lethal intoxication with Shiga toxin 2 reveals novel ultrastructural findings in the brain striatum.**

Tironi-Farinati C, Geoghegan PA, Cangelosi A, Pinto A, Loidl CF, Goldstein J  
PLoS ONE 8(1): e55812. doi:10.1371/journal.pone.0055812

### **Intracerebroventricular Shiga toxin 2 increases the expression of its receptor globotriaosylceramide and causes dendritic abnormalities.**

Tironi-Farinati C, Loidl CF, Boccoli J, Parma Y, Fernandez-Miyakawa ME, Goldstein J. J Neuroimmunol. 2010 May;222(1-2):48-61. Epub 2010 Mar 27.

### **Vaccination of pregnant cows with EspA, EspB, $\gamma$ -intimin, and Shiga toxin 2 proteins from Escherichia coli O157:H7 induces high levels of specific colostral antibodies that are transferred to newborn calves.**

Rabinovitz BC, Gerhardt E, Tironi Farinati C, Abdala A, Galarza R, Vilte DA, Ibarra C, Cataldi A, Mercado EC. J Dairy Sci. 2012 Jun;95(6):3318-26

### **Lactobacillus plantarum isolated from kefir protects vero cells from cytotoxicity by type-II shiga toxin from Escherichia coli O157:H7.**

Kakisu E, Abraham AG, Tironi Farinati C, Ibarra C, De Antoni GL. Dairy Res. 2013 Feb;80(1):64-71.

## **En preparación:**

### **Dexamethasone as an inhibitor of the action of Stx2 in mice**

Tironi-Farinati, Carla; Geoghegan, Patricia; Cangelosi, Adriana; Pinto, Alipio, Goldstein, Jorge

### **Study of the effect of sublethal doses of Stx2 in the brain mice**

Tironi-Farinati, Carla; Geoghegan, Patricia; Cangelosi, Adriana; Pinto, Alipio, Goldstein, Jorge

## **Congresos Internacionales**

**Neurovascular and behavioral changes after sub-lethal administration of intravenous Stx2 and/or LPS in mouse brains.** C. Tironi-Farinati; L. Cejudo; A. Pinto; G. Monteiro-Gomes; P. Geoguegan; A. Cangelosi; M. Jacobsen; L. D'Alessio; C. F. Loidl; M. Rubn; J. Godstein. 8th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) Producing *Escherichia coli* Infections, 6-9 May 2012, Amsterdam, The Netherlands

**Local administration of Shiga Toxin 2 induces the expression of the globotriaosylceramide (Gb3) receptor in the rat brain.** Tironi Farinati C, Morris W, Venzano A, Boccoli J, Loidl F., Goldstein J. 7th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) producing *Escherichia coli* Infections. Buenos Aires, Mayo 2009

**Systemic immunization of cows with EspA, EspB,  $\gamma$ -intimin and Stx2 proteins from *Escherichia coli* O157:H7 induces colostral antibodies that are efficiently transferred to newborn calves.**

Rabinovitz BC, Tironi Farinati C, Abdala A, Galarza R, Larzábal M, Vilte DA, Cataldi A, Ibarra C, Mercado EC. 7th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) producing *Escherichia coli* Infections. Buenos Aires, Mayo 2009.

**Antibody response against Shiga toxin-2 subunits in patients with Hemolytic Uremic Syndrome**

Fernández-Brando RJ, Bentancor LV, Ramos MV, Fernández GC, Exeni R, Grimoldi I, Laso MC, Exeni A, Tironi Farinati C, Isturiz MA, Palermo MS. 7th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) producing *Escherichia coli* Infections. Buenos Aires, Mayo 2009

## **Congresos Nacionales**

**Efecto de la Toxina Shiga 2 (Stx2) y LPS producidas por *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) en la microvasculatura motora cerebral de ratones.**

Vasconcelos Esteves P, Cangelosi A, Geoghegan, P, Zeolla M, Jacobsen M, Tironi Farinati C, Goldstein J.

LVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica y LX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología, 14 al 17 de Noviembre, 2012

### **Behavioural and cellular changes triggered by sublethal doses of Stx2**

Carla Tironi-Farinati, Guilherme Monteiro Gomes, Adriana Cangelosi, Patricia Geoghegan, Laura Cejudo, Alipio Pinto, Maribel Rubin, Jorge Goldstein

XXV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias, Huerta Grande, Octubre, 2011

### **Blood Brain Barrier (BBB) and behavioral early alterations by endovenous (ev) administration of Shiga toxin 2 (Stx2) from enterohemorrhagic Escherichia coli (STEC) in mice**

Ma. Laura Cejudo, Adriana Cangelosi, Carla Tironi-farinati, Alipio Pinto, Patricia Geoghegan, Jorge Goldstein

XXV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias, Huerta Grande, Octubre, 2011

### **Effect of Shiga toxin-producing E. coli (STEC) and LPS in the microvasculature of striatal brain mice**

Alipio Pinto, Mariana Jacobsen, Adriana Cangelosi, Carla Tironi-Farinati, María Laura Cejudo, Patricia Geoghegan, Jorge Goldstein

XXV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias, Huerta Grande, Octubre, 2011

### **Characterization of a sub-lethal systemic dose of Shiga toxin 2 in the Nervous System.**

Tironi-Farinati Carla, Cangelosi Adriana, ,Geoghegan Patricia, ,Morris Winston, Loidl C. Fabian,Pinto Alipio, Cejudo Maria Laura, Goldstein Jorge. SAN: XXV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias, Huerta Grande, 6 al 10 de Octubre, 2010.



**La administración local de la toxina shiga tipo 2 (Stx2) induce la expresión del receptor Gb3 en cerebros de rata.**

Tironi Farinati Carla, Morris W, Venzano A, Boccoli J, Loidl F, Ibarra C, Goldstein J. LIII Reunión Científica Anual, Sociedad Argentina de Investigación Clínica,. Mar del Plata, Argentina. Noviembre 2008

**Ultraestructural and comportamental characterization of Stx2 subletal doses in the mice brain**

Tironi Farinati, C ; Geoghegan, P ; Cangelosi, Adriana ; D`Alessio, L ; Parma, Y ; Morris, W ; Loidl, C. F ;Goldstein, J. Relator: Tironi Farinati, Alicia Carla Flavia. SAIC, Mar del Plata, 2009

**Lactobacillus Plantarum protege a células vero de la acción de la toxina Shiga de Escherichia Coli enterohemorrágica**

Tironi Farinati C, Kakisu E, Abraham AG, Perez PF, Ibarra C, Antoni GL. LIII Reunión Científica Anual, Sociedad Argentina de Investigación Clínica,. Mar del Plata, Argentina. Noviembre 2008

**La administración intracerebroventricular de la toxina Shiga 2 gatilla la expresión neuronal de la proteína proapoptótica Bax y la reacción astrocitaria en cerebros de rata.**

Boccoli J, **Tironi Farinati C**, Loidl F, Ibarra C, Goldstein J. LIII Reunión Científica Anual, Sociedad Argentina de Investigación Clínica,. Mar del Plata, Argentina. Noviembre 2008

Agradecemos el apoyo de Conicet, IBRO, UBA, Foncyt y Secyt.

# Capítulo 1

## Introducción y Objetivos

## *Itaca*

*Cuando partas para Itaca, desea que el camino sea largo, rico en peripecias y en experiencias. No temas ni a los Lestrigonos, ni a los Cíclopes, ni a la cólera de Neptuno. No los encontrarás en tu ruta si tus pensamientos son elevados, si tu cuerpo y tu alma no se dejan arrastrar por pensamientos bajos. No encontrarás ni a los Lestrigonos, ni a los Cíclopes ni a la furia de Neptuno, si no los llevas dentro de ti, si tu corazón no te los muestra.*

*Desea que el camino sea largo, que numerosas sean las mañanas de verano, dónde (con cuántas delicias!) entrarás en puertas por primera vez. Haz escala en los mercados fenicios, compra bellas mercancías: nácar y coral, ámbar y ébano, y miles de perfumes sensuales. Compra cuántos más perfumes puedas. Visita las numerosas ciudades egipcias, e instrúyete y enseña avidamente. Guarda siempre Itaca en tu espíritu. Llegar es tu meta final, pero no apures tu viaje, es mejor que dure muchos años y que tu llegues a la isla cuando sea viejo, rico con todo los tesoros acumulados en el camino, sin esperar que Itaca te hubiese ofrecido riquezas.*

*Itaca te ha dado un bello camino, sin ella, te perderías en la ruta. Ella no tiene nada más que darte. Si la encuentras pobre, Itaca no te ha engañado. Sabio como has devenido con tantas experiencias, ya deberías saber lo que significan las Itacas.*

Constantin Cavafy

## Capítulo 1

### Introducción y Objetivos

#### Historia de la toxina Shiga

La bacteria *E. coli* productora de la toxina Shiga (STEC) es un patógeno causante de colitis hemorrágica, Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) y complicaciones neurológicas que se observan mayoritariamente en niños.



Dr. Kiyoshi Shiga (1871-1957)

Las complicaciones en el sistema nervioso central (SNC) se dan en aproximadamente el 30% de los niños con SUH. Los pacientes pueden presentar ataxia, convulsiones y hemiparesis<sup>12</sup>. El desequilibrio del SNC por intoxicación con Stx2 es la causa de mortalidad y el mayor contribuyente a la morbilidad asociada al SUH<sup>3</sup>.

Existen dos grupos principales en la familia de toxinas Shiga (Stxs), Toxina Shiga tipo 1 (Stx1) y Toxina Shiga tipo 2 (Stx2). Estas deben su nombre al microbiólogo japonés Dr. Kiyoshi Shiga, el primero en describir el origen bacteriano de la disentería causada por *Shigella dysenteriae* en 1897<sup>4</sup>.

En 1936, en una cena de honor en la Universidad de Harvard (EEUU), Shiga se dirigía a su audiencia diciendo: “El descubrimiento del bacilo de la disentería avivó en mi joven corazón la esperanza de erradicar la enfermedad. Muchos miles aún sufren de esta enfermedad cada año y la luz de esperanza que una vez brilló tan vivamente se ha desvanecido como un sueño en una noche de verano.”

Hoy en día, la Shigelosis aún mata a miles de personas al año, principalmente niños que viven en países subdesarrollados.

## La familia de Toxinas Shiga

Las toxinas *Shiga* fueron descubiertas en el año 1977<sup>5</sup> al observar que ciertas cepas de *E. coli* enteropatógenas aisladas de pacientes con enteritis, producían una toxina diferente y eran capaces de provocar una lesión intensa e irreversible sobre la línea celular Vero, una línea celular derivada de riñón del mono verde africano (*Cercopithecus aethiopicus*), por lo que fueron llamadas verotoxinas.

Toda la familia de Toxinas Shiga son toxinas del tipo AB<sub>5</sub>, compuestas por una subunidad A catalíticamente activa y un pentámero de 5 subunidades B que les permiten entrar a las células blanco que poseen el receptor específico. La proteína necesita estar conformada por la unidad A y las unidades B para ser activa y poder entrar en las células e inhibir la síntesis de proteínas<sup>6</sup>.

El origen más común de las toxinas Shiga son las bacterias *S. dysenteriae* y el grupo *Shigatoxigénico* de *Escherichia coli*, el cual incluye el serotipo O157:H7 y otras cepas de *E. coli* enterohemorrágicas. Las diferentes cepas bacterianas pueden expresar diferentes cantidades de Stx<sub>2</sub>, Stx<sub>1</sub> y el resto de los subtipos.<sup>7</sup>

Los estudios epidemiológicos muestran que las cepas de STEC que expresan Stx<sub>2</sub> solamente son más virulentas que las cepas que expresan Stx<sub>1</sub> solamente o Stx<sub>1</sub>+Stx<sub>2</sub>. Tanto Stx<sub>1</sub> como Stx<sub>2</sub> tienen una estructura similar<sup>8</sup> pero ambas tienen son inmunológicamente diferentes, los anticuerpos contra Stx<sub>1</sub> no neutralizan Stx<sub>2</sub> y viceversa<sup>9</sup>.

Los genes de Stx<sub>2</sub> y Stx<sub>1</sub> se encuentran codificados en fagos tipo lambda<sup>10</sup>.

La biología de la producción de Stx<sub>2</sub> es bastante inusual, los genes que codifican para Stx<sub>2</sub> están codificados en la región más tardía de un fago lisogénico<sup>11 12</sup>. Estos genes solo se expresan cuando el fago se encuentra o en su ciclo replicativo o lítico<sup>13</sup>. En el caso de *E. coli* O157:H7, los genes de Stx<sub>2</sub> están silenciados durante la lisogenia, sin embargo si el fago es inducido a entrar en el

ciclo lítico, comenzará a producir Stx2.

El daño del ADN u otras señales del sistema SOS puede activar la transcripción de Stx2 y Stx1<sup>14</sup>. Los antibióticos en general, activan el sistema de SOS bacteriano, es por eso que está desaconsejada la utilización de antibióticos cuando se produce una infección por STEC<sup>15</sup>.

### **Relevancia y Costos del problema en la Argentina**

La Argentina es el país con mayor incidencia en el mundo de SUH. Se producen entre 12 a 14 casos cada 100.000 niños menores de 5 años, esto se traduce en alrededor de 500 casos por año con una letalidad en la fase aguda del 4%.

Los costos de la enfermedad para la Argentina son altísimos. En el único trabajo encontrado en Pubmed al respecto, se evalúan los costos directos del SUH (en la atención hospitalaria) en sus diferentes etapas evolutivas: el período agudo de internación, el seguimiento ambulatorio, la diálisis peritoneal continua ambulatoria (DPCA), la hemodiálisis (Hd) y el trasplante renal (Tx) y los costos indirectos del SUH (sociales): los gastos de la familia, el Estado y los servicios de salud.<sup>16</sup>

En el estudio mencionado se analizaron las historias clínicas de 525 pacientes y se clasificaron por su procedencia y su situación clínica. Durante la etapa aguda se observa que se reparte equitativamente la carga el Estado y el núcleo familiar, durante la etapa de trasplante la carga recae mayormente sobre las familias. El 65% de los gastos observados corresponde a la etapa de seguimiento ambulatorio y los tratamientos sustitutos de la función renal.

En el año 2005 el costo total por paciente fue de \$79.000, es decir que los 464 casos denunciados tuvieron un costo total en el 2005 de \$36.845.000, a valor 2013 esto es aproximadamente \$65.000.000. Todo esto sin tener en cuenta el sufrimiento humano incuantificable de los niños y las familias afectadas.

## **Acción de la Toxina Shiga**

Los dos tipos de toxina Shiga, Stx1 y Stx2 poseen la misma estructura AB<sub>5</sub>, en donde la subunidad A (StxA) se encuentra asociada con 5 subunidades B (Stx2B). La subunidad A es la que tiene la actividad catalítica N-glicosidasa<sup>17</sup>, actúa quitando un base específica de adenina de la subunidad 28S rRNA de la subunidad 60S de las células infectadas. Como la base de adenina está en un loop de rRNA de las células es esencial para el pegado correcto de factores de elongación, por lo que la toxina es capaz de interrumpir la síntesis de proteínas de la célula blanco.

Las subunidades A de Stx1 y Stx2 son casi idénticas difiriendo solamente en 1 aminoácido (el aminoácido Serina en la posición 45 es reemplazado por treonina), sin embargo, en contraste con la secuencia de las subunidades A, las subunidades N de Stx1 y Stx2 sólo tienen un 55% de semejanza<sup>18</sup>.

## **La estructura de Stx2**

La estructura de Stx1 fue descubierta antes que la de Stx2<sup>19</sup>. La subunidad A interacciona con el pentámero de StxB mediante una hélice C-terminal y 4 hojas beta. El plegado del resto de la subunidad A es muy similar a la cadena A de la toxina Ricina, ambas son N-glicosidasas. El sitio activo de la toxina bacteriana está bloqueado por un segmento de la cadena polipeptídica que se libera como parte del mecanismo de activación de la toxina. Es por esto que es importante verificar la actividad biológica de Stx2, ya que la proteína puede no ser activa si no está correctamente plegada.

## **Diferencias entre Stx1 y Stx2**

Las dos principales isoformas, Stx1 y Stx2, que difieren drásticamente en potencia citotóxica, a pesar de tener el 57% de secuencia idéntica.<sup>20</sup> Los estudios animales y epidemiológicos muestran que Stx2 está asociada con la enfermedad

más severa.<sup>21 22</sup>.

Además, algunas variantes de Stx2 son más virulentas en humanos, como Stx2c y ciertas formas de Stx2d, que pueden ser activadas por la elastasa presente en el mucus humano. Si bien las infecciones por STEC están asociadas a Stx1, Stx2 o ambas, la producción de Stx2 aumenta considerablemente el riesgo de SUH.<sup>23</sup>

Los datos observados por la técnica de espectrometría de masa sugieren que esto se debe a la diferencia de estabilidad entre los pentámeros de subunidades B de ambas toxinas que son los responsables de la unión de la toxina a las células.

En esta tesis nos centramos en la actividad de Stx2, dado que esta variante de toxina genera mayores causas de muerte. De todas las cepas STEC (tanto productoras de Stx2, de Stx2+Stx1 o solamente de Stx1), las cepas de *E. coli* que producen Stx2 son las que producen SUH con un mayor grado de compromiso con el CNS y un mayor daño<sup>24 25</sup>.

Esto está íntimamente relacionado con que Stx2 tiene una capacidad citotóxica de 100 a 1000 veces superior que Stx1<sup>26</sup>

El brote de STEC del 2011 en Alemania fue causado por la cepa O104:H4, un genotipo y fenotipo muy poco usual. Se reportaron 4333 infectados, entre ellos 733 casos de SUH y 50 muertos debido a complicaciones neurológicas.<sup>27</sup>

Mientras que el SUH causado por STEC se observa habitualmente en menores de cinco años, en este brote el 90% de los casos fueron de edad igual o superior a 20 años, de los que aproximadamente dos tercios fueron mujeres. Estas características poco usuales en cuanto a distribución por sexo y edad pueden explicarse debido las características patogénicas, particularmente la cepa O104:H4 que produce Stx2a y es enteroagregativa<sup>28</sup>.

## **Origen del SUH**

La bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) es un microorganismo que compone la flora



colónica humana. Se adhiere y coloniza la mucosa intestinal a pocas horas después del nacimiento. *E. Coli* pertenece a la familia de anaerobios facultativos *Enterobacteriaceae*, capaces de prosperar en el intestino y en el ambiente exterior, algunos miembros de esta familia son también *Shigella dysenteriae*, responsable de la disentería y *Salmonella typhi*, que produce la fiebre tifoidea.

La infección con *E. coli* productor de Stx está relacionada al consumo de alimentos contaminados y puede desencadenar diferentes cuadros clínicos que varían desde diarrea, colitis hemorrágica, encefalopatías y síndrome urémico hemolítico.

El SUH fue descrito por primera vez en nuestro país por Gianantonio<sup>29</sup> y realizó una descripción completa de los aspectos clínicos y la evolución de 64 casos de SUH.

### **Características del SUH, mecanismo y epidemiología**

El SUH es un síndrome caracterizado por anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia e insuficiencia renal aguda que puede progresar a insuficiencia renal crónica.<sup>30</sup>

La infección comienza con la ingesta de agua o alimentos contaminados con materia fecal. Aproximadamente el 10% de los pacientes con infecciones por STEC desarrollará SUH.

Las bacterias STEC presentan resistencia a la acidez, lo que facilita su supervivencia en el estómago. Al alcanzar el colon se adhieren a los enterocitos a través de un mecanismo regulado por una serie de genes de virulencia, que inducen lesiones características conocidas como *attaching and effacing (A/E)*<sup>31</sup>, caracterizadas por una estrecha interacción entre la bacteria y las células epiteliales intestinales, el borrado de las microvellosidades y la desorganización del citoesqueleto, que causa diarrea e inflamación intestinal<sup>32</sup>.

La diarrea con sangre, uno de los signos principales de alerta en estos cuadros, se produce como consecuencia del daño que produce la Stx2 en las células endoteliales de los pequeños vasos del colon. Además la Stx2 tiene por blancos

el riñón y sistema nervioso central. Como estos tejidos no forman parte del epitelio intestinal donde coloniza STEC, el daño endotelial es una consecuencia directa de la acción de Stx que, liberada por las bacterias atraviesa la barrera intestinal y ganan acceso a la circulación sanguínea<sup>33</sup>.

La letalidad es sólo del 3-5% debido al diagnóstico precoz la instauración temprana de la diálisis peritoneal en los casos con oliguria grave o anuria y al manejo de la anemia hemolítica.

Alrededor del 60% de los pacientes supera la fase aguda y se recupera sin secuelas después de dos semanas de hospitalización.

Un 5% de los niños desarrolla una insuficiencia renal crónica que, en pocos años, requiere procedimientos de hemodiálisis permanente o trasplante renal. Otro 30% continúa con microhematuria y grados variables de proteinuria que pueden durar décadas<sup>34</sup>.

El SUH está ampliamente distribuido en el mundo y frecuentemente se lo describe como una enfermedad epidémica de baja tasa de incidencia en países desarrollados como EEUU y Japón, con 1-3 casos cada 100.000 niños menores de 5 años<sup>35</sup>.

Sin embargo, en la Argentina, el país con mayor incidencia en el mundo se producen 12-14 casos cada 100.000 niños menores de 5 años. Esto se traduce en alrededor de 500 casos por año con una letalidad en la fase aguda del 4%.

### **Encefalopatías originadas por la toxina Shiga**

Como ya mencionamos los problemas asociados a STEC son usualmente diarrea acuosa y diarrea sanguinolenta y en los casos más severos SUH y problemas en el SNC<sup>36 37</sup>. Los problemas neurológicos asociados a una infección con STEC son amplios e incluyen entre otros fallas en la coordinación motriz fina, ceguera cortical, ataxia, cambios en la conciencia desde letargia hasta coma<sup>38 39 40</sup>.

Las manifestaciones en el sistema nervioso son trascendentes en el paciente, dado que están asociadas a secuelas muy severas y a un índice significativo de mortalidad<sup>41</sup>.

Para definir y estudiar el problema en humanos se han propuesto una serie de modelos. Uno de los problemas es la dificultad para hallar un modelo de infección con STEC que pueda reconstituir todo lo que ocurre en pacientes.

### **Observaciones clínicas**

La acción patogénica de STEC se debe principalmente a la toxina Shiga, de los dos subtipos (Stx1 y Stx2), y Stx2 es la que está relacionada con pronósticos más severos y de mayores secuelas producidas<sup>42 43</sup>.

Generalmente, la infección por STEC activa una cascada de coagulación que reduce el número de plaquetas en la sangre (trombocitopenia) e induce trombos de fibrina en los vasos, por lo que los glóbulos se dañan al pasar por los vasos cerrados lo que origina anemia hemolítica. Mientras la trombosis progresa en los glomérulos renales, se produce un daño en el mecanismo de ultrafiltración que contribuye a la falla renal. Por otro lado cerca del 35% de los pacientes diarrea positivos para SUH progresarán hacia una disfunción del SNC.<sup>44 45 46 47 48</sup>

Sin embargo, es de destacar que antes del establecimiento del SUH, entre un 9-15% de los pacientes muestran trastornos neuronales, lo que sugiere que los mismos pueden aparecer previo al síndrome<sup>49 50 51</sup>.

Además, la tasa de mortalidad de los pacientes con disfunciones en el SNC-D+ SUH (diarrea positivos) es aproximadamente dos a tres veces mayor que SNC- D- SUH<sup>52 53 54 55</sup>.

### **Histopatología del SNC en humanos**

Las lesiones predominantes que se observan en el SNC de autopsias de pacientes incluyen edema <sup>56</sup> infartos focales y necrosis <sup>57</sup>. La mayoría de los casos encontrados no presentan micro trombos (capilares saturados de fibrina) lo que sugiere que el daño endotelial se produce, pero en la ausencia de la activación de la cascada de coagulación. <sup>58</sup>

También se han reportado hemorragias intraparenquimales y extraparenquimales, sugiriendo el rompimiento o debilitamiento de la barrera hematoencefálica. <sup>59</sup>

### **Resonancia Magnética**

Las lesiones observadas por resonancia magnética (RMI) se localizaron en los ganglios de la base, tálamo y cerebelo <sup>60 61 62 63</sup> .

### **Alteraciones en el líquido céfallo-raquídeo y en plasma**

En pacientes normales, la concentración de proteínas en el líquido céfallo-raquídeo es menor comparada con el suero, ya que la barrera hematoencefálica en el plexo coroideo frena el pasaje de proteínas al líquido céfallo-raquídeo. Sin embargo del 10% al 30% de los pacientes con complicaciones del SNC poseen concentración elevada de proteínas en el líquido céfallo-raquídeo, lo que indica que la infección por STEC altera la permeabilidad de la barrera de la barrera hematoencefálica <sup>64</sup> <sup>65 66</sup> .

Además la primera anomalía circulatoria que se detecta en la mayoría de los pacientes es trombocitopenia, seguida de hemólisis debido al daño que sufren los eritrocitos al pasar por los trombos localizados en vasos pequeños<sup>67</sup>. Previamente al hallazgo de la disminución del volumen de eritrocitos, generalmente la concentración de creatinina en sangre tiende a subir.

### **Modelos animales utilizados**

Los modelos animales utilizados para investigar los casos neurológicos incluyen la inoculación gastrointestinal de STEC y modelos donde se inyecta Stx2 por diferentes vías (i.p., intraperitoneal; e.v., endovenosa i.t., intratecal (vía cisterna magna); i.c.v., intracerebroventricular). Los animales más utilizados son ratón, rata y conejo.

## **Modelos murinos para estudiar el efecto de Stx2 en el SNC**

### **Efecto de la Stx2 por inoculación con STEC**

Los modelos de inyección de Stx son los más usados para estudiar los efectos de STEC, dado que STEC infecta el colon del animal, pero esto es difícil de lograr y además requiere bioerios de nivel de Bioseguridad III, lo que limita aún más esta técnica.

Por otro lado las diferentes cepas varían en su capacidad de producir Stx2<sup>68 69</sup>, por su grado de adhesión<sup>70</sup>, su grado de invasión a las células<sup>71</sup> y su capacidad de secretar proteínas<sup>72</sup>. Por esta razón es aún más interesante plantear un modelo basado únicamente en la inyección de Stx2 para solucionar la falta de homogeneidad entre cepas y saber la cantidad de toxina que se inyecta.

El modelo de inoculación de STEC es muy dificultoso y debe trabajarse con ratones muy pequeños y suministrárseles antibióticos para que STEC pueda colonizar el intestino<sup>73</sup>. Por ejemplo en un modelo de inoculación gastrointestinal de STEC productora de Stx2c, se observó células endoteliales edematosas y destrucción de mielina<sup>74</sup>.

En este modelo de administración con STEC productoras de Stx1 y Stx2 se observó hemorragia, cambios edematosos y micro trombos, daño vascular y neuronas en degeneración, sin embargo, la mielina no presentó daños en la corteza, hipocampo ni cerebelo. En ambos casos se observaron lesiones relacionadas con daño endotelial.<sup>75 76 77 78 79</sup>

En otro modelo de inoculación de STEC utilizan animales malnutridos. En todos los casos los síntomas comunes del SNC que se observan son las convulsiones y la parálisis en las extremidades.<sup>80</sup>

### **Efecto de la administración periférica de Stx en el SNC**

En este modelo de administración de la toxina se observó parálisis en las extremidades, escalofríos, andar anormal, espasmos (las patas duras previniendo una posición normal parado) parálisis unilateral, aunque en este caso los ratones tenían funcionalidad senso-neuronal mientras estaban paralizados<sup>81 82</sup>.

Otros autores descubrieron hemorragia, edema, congestión y cambios celulares gliales (picnosis de los oligodendrocitos y astrocitos)<sup>83 84 85</sup>.

Finalmente se observó por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), procesos gliales entre la pre y post sinapsis.<sup>86</sup>

Además se observó que la inyección de Stx y LPS resultan en una hemorragia más severa en el cerebro comparados con los que son inyectados con Stx2 solamente<sup>87</sup>.

En cuanto a los parámetros hematológicos Stx2 vía intraperitoneal (IP) (225ng/kg) no causó trombocitopenia, pero si anemia hemolítica y aumento de la creatinina en suero y BUN. El LPS (0.3mg/kg IP) produjo trombocitopenia, pero no aumento de la creatinina)<sup>88</sup>. La combinación de Stx2 y LPS causó trombocitopenia, reticulocitosis, y aumento de creatinina en suero, los tres criterios de diagnóstico de SUH. También puede inducir trombocitopenia que Stx2 (5ng/kg iv) y LPS (0.5mg/kg)<sup>89</sup> o Stx2 a una dosis más alta (50 ng/kg i.v.) p LPS (0.5 mg/kg i.v.) pero no a la dosis más baja de 5ng/kg.

En los modelos de infección con STEC los ratones probablemente reciben Stx2 y LPS y mostraron una fragmentación de los glóbulos rojos, signo de la anemia hemolítica<sup>90</sup>.

Por lo tanto Stx2 es capaz de causar falla renal (aumento de creatinina y BUN) y Stx2 en combinación con LPS agrava el daño.

## **Modelos en rata de daño del SNC por Stx2**

### **Efecto local de Stx2 en el SNC**

En el 2007 en nuestro laboratorio se observó por ultraestructura neurodegeneración neuronal, desmielinización, astrogliosis y oligodendrocitos patológicos en el estriado cuando se inyectó vía icv una dosis de 1ng/μl de Stx2. En este modelo se confirmó la localización de Stx2 en el cerebro mediante inmunohistoquímica.<sup>91</sup>

En otro trabajo de nuestro grupo en el modelo de rata se observó que la administración ICV de Stx2 causó la expresión de GFAP que derivó en astrogliosis, además por microscopía confocal se observaron astrocitos reactivos en contacto con neuronas conteniendo Stx2.

La injuria por parte de Stx2 correlacionó con los cambios en la expresión y la actividad neuronal de la óxido nítrico sintasa (nNOS). Observaron una disminución en el número y la actividad de neuronas nNOS en la corteza cerebral y el estriado, mientras que se observó un efecto opuesto en el núcleo paraventricular del hipotálamo.<sup>92</sup>

### **Administración Intraperitoneal de Sobrenadante Conteniendo Stx2**

Además en otro modelo de rata pero con una administración peritoneal de sobrenadante expresando Stx2 se observaron alteraciones neurológicas como letargia, parálisis y caminar anormal. Además se observe daño neuronal y una disminución de los niveles expresión de acuaporina 1 (AQP1) y la acuaporina 4

(AQP4) en el cerebro de rata 2 días luego de la inyección del sobrenadante de Stx2. La regulación negativa de los niveles de acuaporina y las alteraciones neuronales observadas en ratas inyectadas con Stx2 pueden estar relacionadas con la formación de edema y las manifestaciones neurológicas características del SUH en este modelo.<sup>93</sup>

## **Objetivo General**

Determinar la fisiopatogenicidad de la Stx2 en el SNC a partir del uso de dos modelos animales de administración.

## **Objetivos específicos**

1) Determinar la presencia del receptor Gb3 en el parénquima cerebral y determinar el efecto de la administración local de Stx2 en el cerebro.

2) Caracterizar los efectos de dosis subletales de Stx2 en cerebros de ratones por microscopía y mediante tests comportamentales.

3) Determinar posibles agentes neuroprotectores, lo que permite estudiar por métodos farmacológicos los mecanismos neurotóxicos y desarrollar un tratamiento eficaz en los casos de encefalopatías agudas de intoxicación por STEC.



## **Capítulo 2**

### **Estudio de la expresión y localización del receptor de la toxina Shiga: Gb<sub>3</sub>**

## Capítulo 2

### Estudio de la expresión y localización del receptor de la toxina Shiga: Gb<sub>3</sub>

#### Introducción

##### El receptor de la Toxina Shiga tipo 2: Gb<sub>3</sub>

El receptor Gb<sub>3</sub> es sintetizado a partir de la enzima lactocilceramida por la enzima  $\alpha$ 1,4-galactosyltransferasa (Gb<sub>3</sub>/CD77 sintetasa,  $\alpha$ 1,4Gal-T)<sup>9495</sup>. Gb<sub>3</sub> es también el antígeno Pk del grupo P de los eritrocitos<sup>96</sup>, también conocido como el antígeno asociado al linfoma de Burkitt y como un marcador celular (CD77). No se han reportado aún ligandos fisiológicos para Gb<sub>3</sub>.

Un modelo conocido de intoxicación celular describe que el pentámero Stx2B se une al receptor globotriaosilceramida (Gb<sub>3</sub>/CD77), lo que le permite a la Stx2 ser internalizada por endocitosis en los endosomas tempranos y trasladarse hacia el aparato de Golgi<sup>97</sup>. Luego de “saltar” del retículo endoplasmático, la subunidad A de la toxina es translocada al citosol donde es capaz de inhibir la síntesis de proteínas y promover la muerte celular<sup>98</sup>. Por lo tanto, existe una fuerte evidencia que el daño causado por la toxina Shiga depende de la expresión y mediación de Gb<sub>3</sub> en los diferentes tejidos<sup>99</sup>.

Aunque las variantes de Stx1 son más homogéneas, Stx2 tiene un mayor número de variantes que incluyen Stx2c, Stx2d, Stx2d-activable, Stx2e, y Stx2f. Sólo la variante Stx2c de Stx2 ha sido encontrada en los serotipos O157. Las diferentes variantes de Stx2 se distinguen por una diferente actividad biológica y una diferente constante de afinidad por el receptor al cual se unen<sup>100</sup>. De las diferentes variantes de Stx2, sólo la Stx2e se une preferentemente al receptor globotriaosilceramida Gb<sub>4</sub> (GalNAc $\beta$ 1-3Gal $\alpha$ 1-4Gal $\beta$ 1-4glucosil ceramida), mientras que el resto de las variantes se unen preferentemente al receptor globotriaosilceramida (Gal $\alpha$ 1-4Gal $\beta$ 1-4glucosil ceramida, Gb<sub>3</sub>). Esta selectiva

capacidad de unión al receptor de las diferentes variantes de la toxina posibilita la interacción con diferentes poblaciones celulares. Entre los mecanismos de inducción del receptor se observó que la diferenciación celular afecta la síntesis y la distribución de Gb<sub>3</sub> en la membrana plasmática<sup>101</sup>. Otro mecanismo que se reportó es la inducción del receptor por mecanismos proinflamatorios en el que participa la Interleukina-1 $\beta$  y/o el Factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ )<sup>102, 103</sup>. Por ejemplo se observó que TNF- $\alpha$  aumenta la sensibilidad a la toxina Shiga en células cerebrales endoteliales humanas que presentan Gb<sub>3</sub><sup>104</sup>.

### **Afinidad de Stx2 por Gb<sub>3</sub>**

La variedad Stx2 ha estado más relacionada con pronósticos más severos y con menor esperanza de sobrevivida que la Stx1<sup>105,106</sup>. Si bien no existen diferencias en la actividad de la subunidad A, la diferencia de toxicidad resulta en la diferencia en el pegado a Gb<sub>3</sub> de las subunidades B entre ambas toxinas. Esto se ha demostrado con construcciones híbridas entre la Stx1A-Stx2B y viceversa, lo cual demuestra que la citotoxicidad es efectivamente regulada por el la subunidad B<sup>107</sup>.

La afinidad de unión de Stx1 con células que contienen Gb<sub>3</sub> es ( $Kd = 4,6 \times 10^{-8}$  M) mucho más alta que la de Stx2 ( $Kd = 3,7 \times 10^{-7}$  M)<sup>108,109</sup>. Esta diferencia de afinidad entre ambas toxinas con el receptor sugiere que la Stx2 circule un mayor tiempo debido a su menor afinidad respecto a la Stx1, lo que le permite alcanzar los riñones con más facilidad que Stx1<sup>110</sup>. Además se ha demostrado que Stx2 es más citotóxica que Stx1 en células de la microvasculatura de riñón in vivo<sup>111</sup>.

### **Distribución de Gb<sub>3</sub> en el SNC**

La distribución del receptor es clave para entender la acción de Stx2 en el sistema nervioso. La mayoría de los autores aceptan que Gb<sub>3</sub> se encuentra en las células endoteliales.

Se ha demostrado la expresión basal de Gb<sub>3</sub> en cerebro de ratones normales en

neuronas de la médula dorsal, de la corteza, hipocampo y células de Purkinje en el cerebelo pero no lo encontraron presentes en células endoteliales<sup>112</sup>.

Otros autores, han estudiado que Gb<sub>3</sub> se encuentra presente en el endotelio de la sustancia gris de la espina dorsal y en el hipocampo pero no en neuronas ni en células gliales, por lo que existen controversias en la distribución de Gb<sub>3</sub><sup>113</sup>.

Finalmente en humanos, se ha encontrado la expresión de Gb<sub>3</sub> en neuronas y células endoteliales de la corteza<sup>114</sup>.

No existen reportes en la distribución de Gb<sub>3</sub> en cerebro de rata, ni tampoco existen reportes si la Stx2 induce cambios en la expresión del mismo, por lo que nuestro objetivo fue estudiar la localización celular de Gb<sub>3</sub> en diferentes regiones del cerebro de rata, y evaluar el efecto local de Stx2 sobre la misma.

## **Materiales y métodos**

### **Purificación de Stx2**

Debido a los atentados ocurridos en EE.UU. el 11 de Septiembre de 2001 se volvió imposible conseguir la toxina Shiga en la Argentina ya que EEUU declaró que puede usarse como arma bioterrorista por lo tanto tuvimos que poner a punto la purificación y producción de Stx2 en el laboratorio.

### **Clonado de Stx2**

Los plásmidos fueron construidos según las técnicas normales de clonado, según el manual del NIH sobre "Trabajando con cuidado con material biológico peligroso"<sup>115</sup>. Esto es especialmente importante ya que se trabaja con una toxina como Stx2 que procede de cepas patogénicas. Se usaron técnicas normales para construir los plásmidos que expresaran la toxina<sup>116</sup>. Los plásmidos fueron aislados de la bacteria usando el sistema miniprep de DNA Wizard Plus SV (Promega

Corp., Madison, WI, USA). Todos los constructos fueron chequeados y secuenciados por el Método enzimático de terminación de cadena de Sanger usando un secuenciador automático Applied Biosystem.

El ADN cromosomal de Stx2 se extrajo de la bacteria *E. coli* C600 que contiene el bacteriófago 933W (22). Un fragmento de 1422bp de bases fue amplificado por la reacción de polimerasa en cadena (PCR) usando los siguientes promotores: (upstream: 5'-GAA TTC ATT ATG CGT TGT TAG-3' y downstream: 5'-GAA TTC TCAGTC ATT ATT AAA CTG-3', ambos conteniendo un sitio de restricción para *EcoRI* ) flanqueando los genes tanto de Stx2A como Stx2B. El producto de PCR fue clonado dentro de un vector pGEM-T Easy (Promega). Células competentes DH5 (Life Technologies, Rockville, MD, USA) fueron transformadas con el plásmido Pgemt-tStx2 y Pgemt usado como control.

Se cultivó la bacteria recombinante conteniendo *E. coli* (pStx2), y/o *E. coli* (Pgemt) durante toda la noche a 37°C con agitación a 250 rpm en 5 ml de caldo Luria-Bertani (LB) (Difco Laboratories) suplementado con 100 µg/ml de ampicilina (Sigma Aldrich Co.). Las células bacterianas fueron removidas por centrifugación y el sobrenadante fue esterilizado con filtro de 0.22-µm.

### **Purificación de Stx2 por cromatografía**

La Stx2 se purificó mediante cromatografía de afinidad en condiciones nativas. Se cultivaron bacterias *E. coli* DH5a –PStx2 recombinante en medio LB con 100 µg/ml de ampicilina. Luego de centrifugar a 1000g por 10 min, el pellet bacteriano fue resuspendido en buffer de lisis ( 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, pH = 8) e incubado en hielo por 30 min con agitación suave.

La muestra fue sonicada con 10 pulsos (10x3) y centrifugada a 5000g por 20 minutos. Luego, el sobrenadante fue separado, precipitado con una solución saturada de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> y centrifugado 20 minutos a 10000g a 4°C. La solución obtenida fue dializado con 4 volúmenes de PBS overnight para remover el SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. Luego de la diálisis se agregó un cocktail de inhibidores de proteasas

(20 mM leupeptina, 1 mM aprotinina, 10 uM pepstatina A, 1 mM PMSF) y se incubó con la resina globotriosa Fractogel (IsoSep AB, Tullinge, Suecia) por 4 horas a 4 °C en agitación suave. La resina permite unir moléculas de Stx2 ya que es una triosa similar al Gb<sub>3</sub>.

La resina fue lavada y eluída con MgCl<sub>2</sub>. Luego se dializó overnight (ON) con PBS a 4C para extraer el MgCl<sub>2</sub> en la solución.

La concentración de proteínas en todos los eluidos fue medida por absorbancia a 280 nm. Para identificar la Stx2 se utilizó el anticuerpo primario anti Stx2B (SIFIN, Alemania).

### **Inmunodetección de Stx2 por Western-Blot**

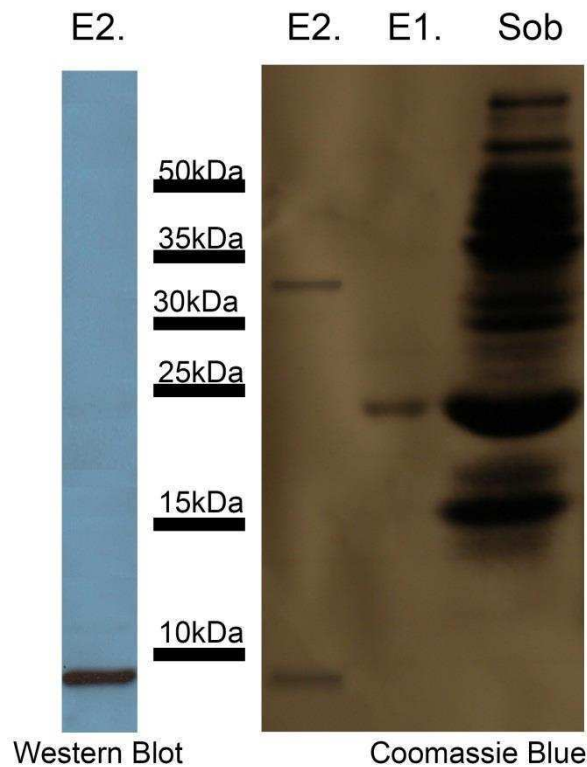
La concentración de proteínas se determinó con un kit BCA (Pierce Biotechnology Inc, USA). En cada calle se sembró la misma cantidad de proteína por calle (1ug). La solución conteniendo Stx2 y un sobrenadante control fueron separados en un gel 15% SDS-Tris-Poliacrilamida(v/v) con un aparato de electroforesis BioRad Mini Protean II (CA, USA). Luego el gel se transfirió a una membrana de PVDF (Bio-Rad Lab, USA). Las membranas se incubaron ON a 4°C con un anticuerpo monoclonal primario (anti Stx2B, Sifin, Alemania) (1:100 en PBS). Luego de los lavados las membranas se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con anti-mouse IgG (1:3000, Bio-Rad, USA) como anticuerpo secundario. Las proteínas se detectaron usando el kit de detección por quimioluminiscencia ECL (Amersham Corp, UK).

### **Detección de proteínas de las muestras: Coomassie Blue**

Para analizar la pureza de las muestras se corrió las muestras en un gel de poliactilamida y luego se detectaron las proteínas en el mismo gracias a la solución de Coomassie Blue.

Se corrieron las muestras obtenidas en la purificación de Stx2, en un gel de Tris-

poliacrilamida 12% (v/v) (Tricine-SDS-PAGE)<sup>117</sup>, con un aparato de electroforesis BioRad Mini Protean II (CA, USA). La electroforesis se realizó en un buffer de Tris-Tricina a 30 V por 1 h y luego a 90 V durante 4 h. Los geles se fijaron en 50% y 10% ácido acético (v/v) durante 30 minutos y luego fueron coloreados con Coomassie blue R en 10% ácido acético por 2hr y decolorados en 10% ácido acético por 2hs.



**Fig. 1 . Purificación de Stx2 a partir de bacterias recombinantes**

En esta figura se muestran las distintas fracciones de la purificación. Se muestra la corrida de Western Blot para la fracción E2, la inmunodetección se realizó con el anticuerpo anti-Stx2B (Sifin, Alemania). Se observa la banda positiva para la subunidad Stx2B en 7.7kDa. En el panel de la derecha se muestra la tinción por Coomassie Blue: Eluido 2 (se observan las bandas de la Subunidad B y la Subunidad A), Eluido 1 y Sobrenadante Pgemt-Stx2.

Por el método de coloración de geles, Coomassie Blue se pueden observar las impurezas de la muestra y constatar el grado de impurezas de la solución, por lo cual se seleccionó el Eluido E2, ya que se observó la menor cantidad de impurezas.

Por el método de Western Blot se verificó la presencia de una banda de 7.7 kDa correspondiente a la Stx2 B.

### **Remoción de LPS (endotoxinas)**

Se eliminó el LPS de la fracción que contenía Stx2 por medio de un kit que elimina LPS (Detoxi-Gel, Pierce, Rockford, USA): se colocan 500ul de la resina Detoxi-Gel a temperatura ambiente. Se agregan 5 volúmenes de desoxicolato de sodio 1% y se agita unos minutos y luego se centrifuga a 12.000g. Se retira el sobrenadante. Se agregan 5 volúmenes de solución fisiológica apiro. Se agita nuevamente. Se centrifuga a 12.000g y se retira el sobrenadante. Se agrega la solución conteniendo Stx2, se agita y se incuba a temperatura ambiente con agitación 1 hora. Se centrifuga a 12.000g, el sobrenadante que contenía Stx2 libre de LPS. Finalmente la toxina fue alicuotada y guardada a -70 °C.

### **Detección de la cantidad de LPS en la muestra**

La determinación de la cantidad de LPS en la muestra fue realizado con el kit: Endotoxin Unit (EU)/mL. Se usó como control LPS (Sigma, St. Louis, MO, USA).

Se determinó que la solución con Stx2 contenía menos de 0.03 EU/ml.

### **Actividad Biológica de la Stx2**

Se cuantificó la actividad de Stx2 mediante la medición de citotoxicidad en células Vero.

Este ensayo permite saber con certeza si la Stx2 purificada posee actividad biológica, ya que podría encontrarse desnaturalizada, o incorrectamente plegada y aún sería detectada por un SDS-page realizado previamente.

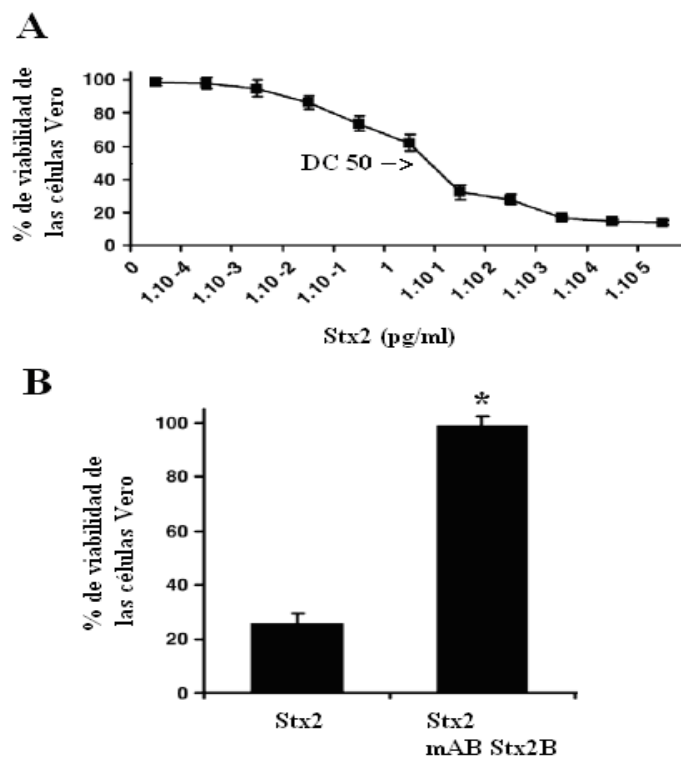
Las diferentes fracciones eluídas se utilizaron para realizar un ensayo de toxicidad



en células Vero<sup>118</sup>. Se midió la viabilidad de las mismas por el ensayo de rojo neutro. Las células Vero fueron cultivadas hasta confluencia en placas de 96 pocillos en medio RPMI completo.

Luego las células fueron lavadas en PBS y expuestas a diferentes concentraciones de la Stx 2 (desde 10<sup>-8</sup> pg/ml hasta 10<sup>6</sup> pg/ml), en condiciones de arresto de crecimiento por 72hrs. A continuación, se agregaron 200 µl de una solución de ácido acético al 1 % en etanol 50% con 1 % de CaCl<sub>2</sub> y 4% de formaldehído. La absorbancia de cada pocillo fue determinada en un espectrofotómetro automático (λ= 546nm). Los resultados fueron expresados como el porcentaje de rojo neutro incorporado, tomando como 100% el valor de las células incubadas bajo condiciones idénticas pero sin el tratamiento con la toxina. La dosis citotóxica 50 % (DC<sub>50</sub>) fue calculada como la dilución de Stx2 requerida para matar al 50 % de las células Vero en cultivo (1 pg/ml)

La actividad citotóxica fue neutralizada mediante la incubación de Stx2 con un anticuerpo monoclonal anti-Stx2B (Sifin, Berlin, Alemania), lo que demuestra que la citotoxicidad se debe a Stx2 (Fig. 2).



**Figura 2: La Stx2 purificada posee acción citotóxica y se inhibe por un anticuerpo anti-Stx2B**

En esta figura se muestran los ensayos de citotoxicidad. La capacidad citotóxica de la Stx2 fue confirmada en un cultivo de monocapa de células Vero (A, DC50=Dosis Citotóxica 50%). La pre incubación de la toxina un anticuerpo monoclonal anti-Stx2B resultó en un aumento significativo en la viabilidad de las células Vero (B). \* p<0.05.

Para los ensayos de neutralización, las células Vero fueron cultivadas tal como se describió previamente. Luego, fueron incubadas durante 24hrs con una mezcla conteniendo 0,1 , 10 o 1000 pg/ml de las fracciones eluídas de Stx2 mezclada previamente durante 30 minutos a 37 °C en agitación con 50 ng/ml del anticuerpo monoclonal anti-Stx2 B (Sifin, Berlin, Alemania).

La preincubación de la toxina con un anticuerpo monoclonal anti-Stx2B (Sifin, Alemania) resultó en un aumento significativo de la viabilidad (Fig. 2 B) mientras que la incubación con un anticuerpo del mismo isotipo monoclonal no tuvo efecto neutralizante (datos no mostrados).

**Animales utilizados**

En el bioterio las ratas se mantuvieron en un lugar sin ruidos y con luz y temperatura controladas. Se les proveyó pellets de comida y agua *ad libitum*.

Los animales fueron observados diariamente, pesándolas y se observaron los cambios comportamentales desde el comienzo del experimento hasta el final, siempre a la misma hora.

**Inyección ICV y Tratamiento**

Ratas macho fueron anestesiadas (ketamina 50 mg/kg–diazepan 0.35 mg/kg, i.p.). Se les implantó una guía de acero usando un aparato estereotáxico en el ventricular lateral en las coordenadas: anteroposterior: -1.80 mm; lateral: 2.4 mm y vertical: 3.2 mm <sup>119</sup> . Se implantó una aguja 21g para alcanzar el área del

ventrículo y minimizar el daño del tejido. Luego se utilizó una aguja 30-g que se extendió 0.5 mm debajo de la cánula guía.

Las cánulas fueron fijadas al cráneo con 3 tornillos y cemento acrílico dental y fueron temporariamente cerradas. Luego de la cirugía, los animales fueron enjaulados individualmente.

Cada rata se asignó al azar a diferentes grupos experimentales y fue usada sólo 1 vez. Luego de una semana de la cirugía, los animales que se movían libremente fueron inyectados vía I.C.V a través una jeringa 30-g conectada a un tubo de polietileno a su vez conectado a un jeringa Hamilton de 20ul. La aguja fue dejada luego de la inyección 20 segundos en el mismo lugar para prevenir el reflujo de la solución inyectada.

La ubicación correcta de la cánula en el ventrículo fue verificado al final de experimento mediante una fijación postmortem y cortado en un vibrátomo Oxford. Los datos obtenidos de animales mal implantados fueron excluidos del análisis.

Las ratas fueron inyectadas con vehículo (solución fisiológica), LPS (Sigma, San Luis, MO) 12 y 24 pg de Stx2+LPS por gramo de animal.

Luego de 2, 4 y 8 días las ratas fueron sacrificadas para realizar estudios de inmunofluorescencia confocal.

Para observar sus cerebros las ratas se anestesiaron con Hidrato de Cloral (350 mg/kg) y se perfundieron transcardiacamente con 0.9% NaCl seguido por un 4% paraformaldehído en 0.1 M buffer fosfato. Los cerebros fueron removidos desde el cráneo y post fijados en paraformaldehído 4% en buffer fosfato por 2 horas.

Las secciones fueron cortadas en un vibrátomo Oxford. Secciones seriadas de 40-µm fueron obtenidas y colectadas en 0.1M buffer fosfato.

Los cortes de cerebro obtenidos fueron procesados para inmunofluorescencia.

Los protocolos experimentales y los procedimientos de eutanasia fueron revisados y aprobados por el Comité Institucional de Uso y Cuidado Animal de la Universidad de Buenos Aires, Facultad de Medicina (Resolución N° 2079/07).

## **Inmunofluorescencias**

### **Visualización de Gb3 y Stx2**

Secciones de cerebro fueron incubadas en flotación con suero normal de cabra 1% (Sigma, St. Louis, MO, USA) durante 1 hora en PBS, luego se incubó con un anticuerpo monoclonal anti-Stx2B, diluido 1:100 (Sifin, Berlin, Alemania) a 4 °C por 72 horas en PBS y luego de varios lavados con el mismo buffer las secciones fueron incubadas con el anticuerpo producido en cabra IgG anti-ratón /Texas Red, dilución 1:200 (Sigma, St. Louis, MO, USA) por 1 hora en PBS, lavado copiosamente en PBS de nuevo e incubado con Hoechst 33342 (azul) 1 µg/ml (Sigma, St. Louis, MO, USA) durante 10 min en PBS.

Luego las secciones fueron incubadas en flotación con un anticuerpo de rata IgM anti-CD77/Gb3 (1:100 Beckman Coulter, Brea, California, USA) en agitación por 96hs a 4 °C. Luego de 3 lavados durante 5 minutos con PBS 10 mM e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario anti-rata IgM conjugado con FITC (1:400; Jackson, PA, USA).

Luego de 3 lavados con PBS, las secciones fueron montadas en portaobjetos y cubiertas con glicerol-PBS (3:1).

Los anticuerpos fueron diluidos en PBS; y el control negativo fue realizado siguiendo el mismo procedimiento pero omitiendo el anticuerpo primario.

### **Visualización de Gb3 y MAP2**

Secciones de cerebro fueron incubadas en flotación con suero normal de cabra 1% (Sigma, St. Louis, MO, USA) durante 1 hora en PBS, luego se incubó con un anticuerpo monoclonal anti-MAP2, dilución 1:500 (Sigma, St. Louis, MO, USA) a 4 °C por 72 h en el mismo buffer y luego de 3 lavados con PBS las secciones se

incubaron con un anticuerpo producido en cabra IgG anti-ratón/Texas Red, dilución 1:200 (Sigma, St. Louis, MO, USA), luego se lavó las secciones con PBS 5 veces. La inmunofluorescencia para localizar Gb<sub>3</sub> fue realizada tal como fue descripta más arriba.

### **Visualización de Gb<sub>3</sub> y GFAP**

Secciones de cerebro fueron incubadas en flotación con BSA 1% (Sigma, St. Louis, MO, USA) durante 1 hora en PBS 10mM, luego se incubó con un anticuerpo policlonal producido en conejo anti-GFAP, dilución 1:500 (Sigma, St. Louis, MO, USA) a 4 °C por 48 h diluido en PBS 10 mM +0.2% Tritón X-100. Luego de eso, se incubó por 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpo secundario producido en cabra IgG anti-conejo. La inmunofluorescencia para localizar Gb<sub>3</sub> fue realizada tal como fue descripta previamente.

### **Visualización de Bax**

Secciones de cerebro fueron incubadas en flotación con suero normal de cabra 2% (Sigma, St. Louis, MO, USA) durante 1 hora en PBS, luego se incubó con un anticuerpo monoclonal producido en ratón anti-Bax, dilución 1:500 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) en PBS 10 mM +0.2% Tritón X-100 a 4 °C por 48 h. Luego de 3 lavados con PBS se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado producido en cabra IgG anti-ratón en una dilución 1:200 (Invitrogen Molecular Probes, Carlsbad, California, USA) en PBS 10 mM por 1 hora y luego de 5 lavados se incubó con Streptavidina Alexa Fluor 488 (Invitrogen Molecular Probes, Carlsbad, California, USA) por 1 hora en PBS 10mM.

### **Controles**

Los controles negativos fueron realizados usando el mismo procedimiento pero omitiendo el anticuerpo primario. Además se usaron controles de isotipo,

anticuerpo monoclonal ratón anti-BrdU (Sigma, St. Louis, MO, USA), ratón IgG (Sigma, St. Louis, MO, USA) (controles para Stx2 y MAP-2 respectivamente), anticuerpo rata IgM (1:50) (F104UN, American Qualex, San Clemente California) (para control de isotipo de Gb<sub>3</sub>).

### **Imágenes confocales**

Las imágenes confocales fueron tomadas en escala de grises (12 bit), con un microscopio confocal Olympus FV300 usando el láser helio-neón (verde, 543nm) y argón (488nm). Las fotos fueron tomadas con el software Fluo View. Se tomaron series de cada sección con Simple 32 C-imaging cada 1 µm con un Uplan Apo de 20× or 40×. Los softwares Adobe Photoshop y Image J (NIH) fueron usados para montar y hacer las combinaciones (merge) de las imágenes. La colocalización de Stx2 y Gb<sub>3</sub> fué tomada con una microscopio Zeiss Axiophot.

### **Densidad óptica (IOD) y análisis de Gb3**

Las células inmunopositivas para Gb<sub>3</sub>, MAP2 y GFAP fueron visualizadas usando objetivos ×10 y ×40. Todos los análisis fueron llevados a cabo en áreas comparables en las mismas condiciones de luz. Las imágenes confocales fueron tomadas usando la misma configuración para el microscopio confocal.

La densidad integrada de inmunofluorescencia dentro de cada cuerpo celular fue medida con el software ImageJ (NIH), la intensidad del background también fue medida y calculada para obtener la densidad integrada corregida (densidad total integrada corregida –intensidad del background) para cada foto. Para contar las células se usó la tinción nuclear con Hoechst.

Los resultados se expresaron como promedio ±SE. Se usaron los test de Student, ANOVA de una vía seguido por Student–Newman–Keuls para comparaciones múltiples o ANOVA de dos vías para comparaciones múltiples. El criterio de significancia fue de p<0.05.

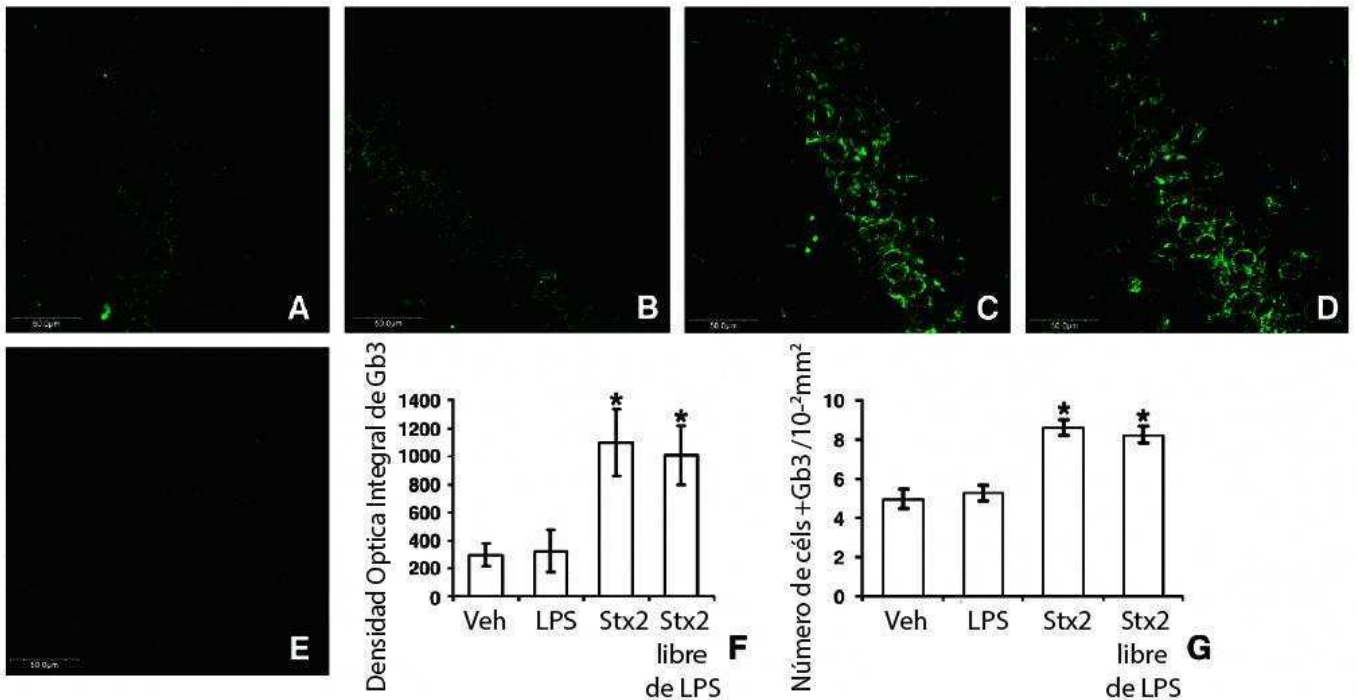
## **Resultados**

### **Manifestaciones neurológicas**

Las alteraciones neurológicas por efecto de la toxina comienzan a manifestarse a partir del día 4 de tratamiento. Se observó hipoquinesia seguida de letargia generalizada y subsecuente parálisis de los miembros traseros. Por otra parte se observaron convulsiones espontáneas a partir del día 6 de de tratamiento. Por otra parte, los animales controles no presentaron ni pérdida de peso ni alteraciones neurológicas.

### **Stx2 aumenta la expresión del receptor Gb3 en neuronas**

Para determinar si Stx2 es responsable del aumento de la expresión de Gb<sub>3</sub>, las ratas fueron canuladas e inyectadas con Stx2 libre totalmente de LPS, LPS o vehículo (Figura 3). Observamos que luego de 8 días de la inyección ICV de LPS la expresión de Gb<sub>3</sub> no se diferenció significativamente del vehículo en la región CA1 del hipocampo (Fig 3B, A). Por otra parte, la expresión de Gb<sub>3</sub> aumentó significativamente en las neuronas CA1 del hipocampo después de la inyección ICV de Stx2 (Fig. 3C) comparada con el vehículo o con LPS (Fig. 3A, B). No se encontraron diferencias en la expresión neuronal en esta área entre las inyecciones icv con Stx2 y con Stx2 libre de LPS (Fig. 3C, D). Estos datos obtenidos fueron confirmados por la medición de los niveles de expresión de Gb<sub>3</sub> (densidad óptica integrada (IOD) Fig. 3F). Además el número de neuronas positivas para Gb<sub>3</sub> fue el mayor ( $p < 0.05$ ) después de una inyección con Stx2 y/o con Stx2 libre de LPS comparado con la de LPS o vehículo (Fig. 3G).



**Fig. 3: Stx2 provoca el aumento de la expresión del receptor Gb<sub>3</sub> en neuronas.**

El área observada en este estudio se localiza en la zona CA1 del hipocampo de rata. Las micrografías de inmunofluorescencia confocal muestran que la inyección ICV de 24pg/g de Stx2 por gramo de peso del animal o de 24pg/g de Stx2 libre de LPS aumentaron la expresión de Gb<sub>3</sub> en el hipocampo (C y D respectivamente) y que la expresión de Gb<sub>3</sub> disminuyó luego de la inyección ICV con 50ng/ml de LPS o vehículo (B y A respectivamente). Las mediciones de densidad óptica integrada (DOI) (F) confirmaron que el nivel de expresión de Gb<sub>3</sub> fue más alto en los cerebros tratados con Stx2 y Stx2 libre de LPS, comparados con los de tratados con LPS solo o vehículo. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de Gb<sub>3</sub> en ratas inyectadas con Stx2 o con aquellas ratas inyectadas con Stx2 libre de LPS (F). El número de células inmunopositivas para Gb<sub>3</sub> fue mayor en los cerebros tratados con Stx2 o con Stx2 libre de LPS comparados con aquellos tratados con LPS solamente o vehículo (G). Se muestra un control de isotipo que es negativo para la inmunofluorescencia para detectar Gb<sub>3</sub> (E) \*p < 0.05.

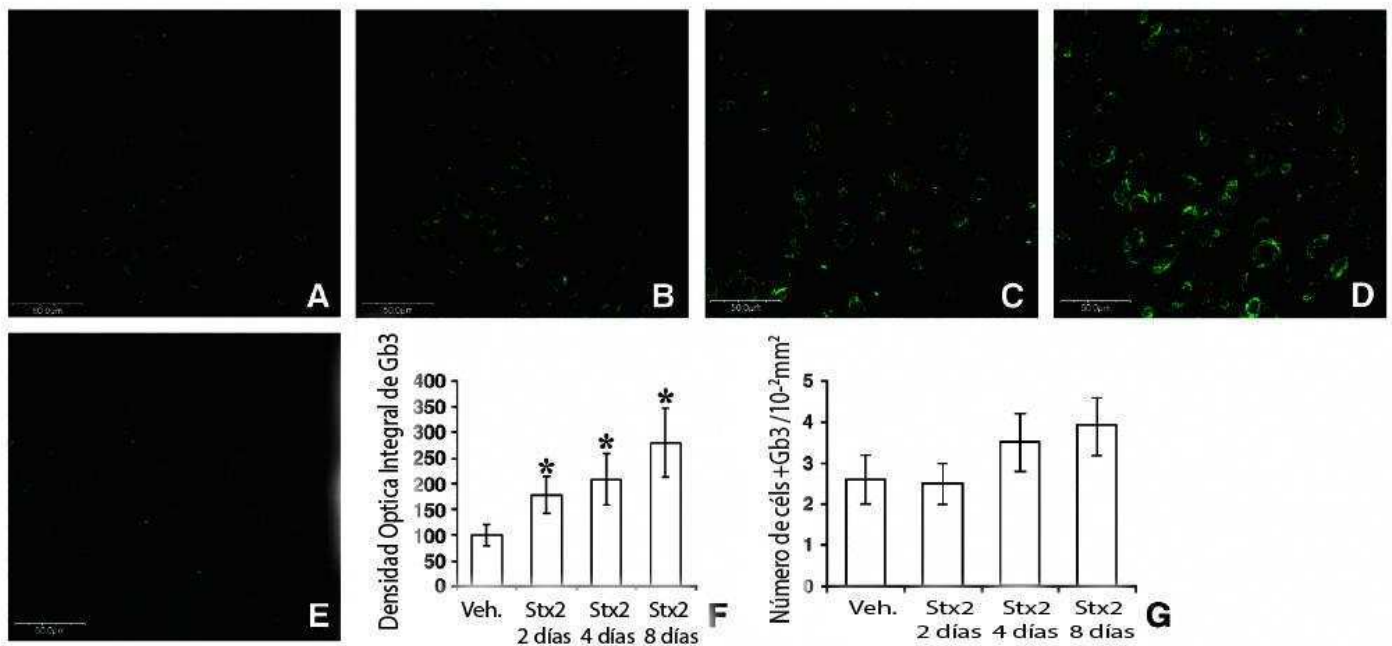
### **La administración local de Stx2 aumenta la expresión de Gb<sub>3</sub> hasta el día 8 de tratamiento**

Para testear si Stx2 inyectada vía ICV aumenta la expresión del receptor Gb<sub>3</sub>, cerebros de rata tratados con vehículo o con toxina fueron analizados por inmunofluorescencia confocal (Fig. 4). Se encontró que la expresión de Gb<sub>3</sub> fue



significativamente más alta en los cerebros tratados que en los controles a partir del día 2 hasta el día 8 (Fig. 4A–D).

Las imágenes obtenidas por inmunofluorescencia fueron analizadas por DOI (Fig. 4F). Sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre el número de neuronas que expresan el receptor entre los diferentes días (Fig. 4G).

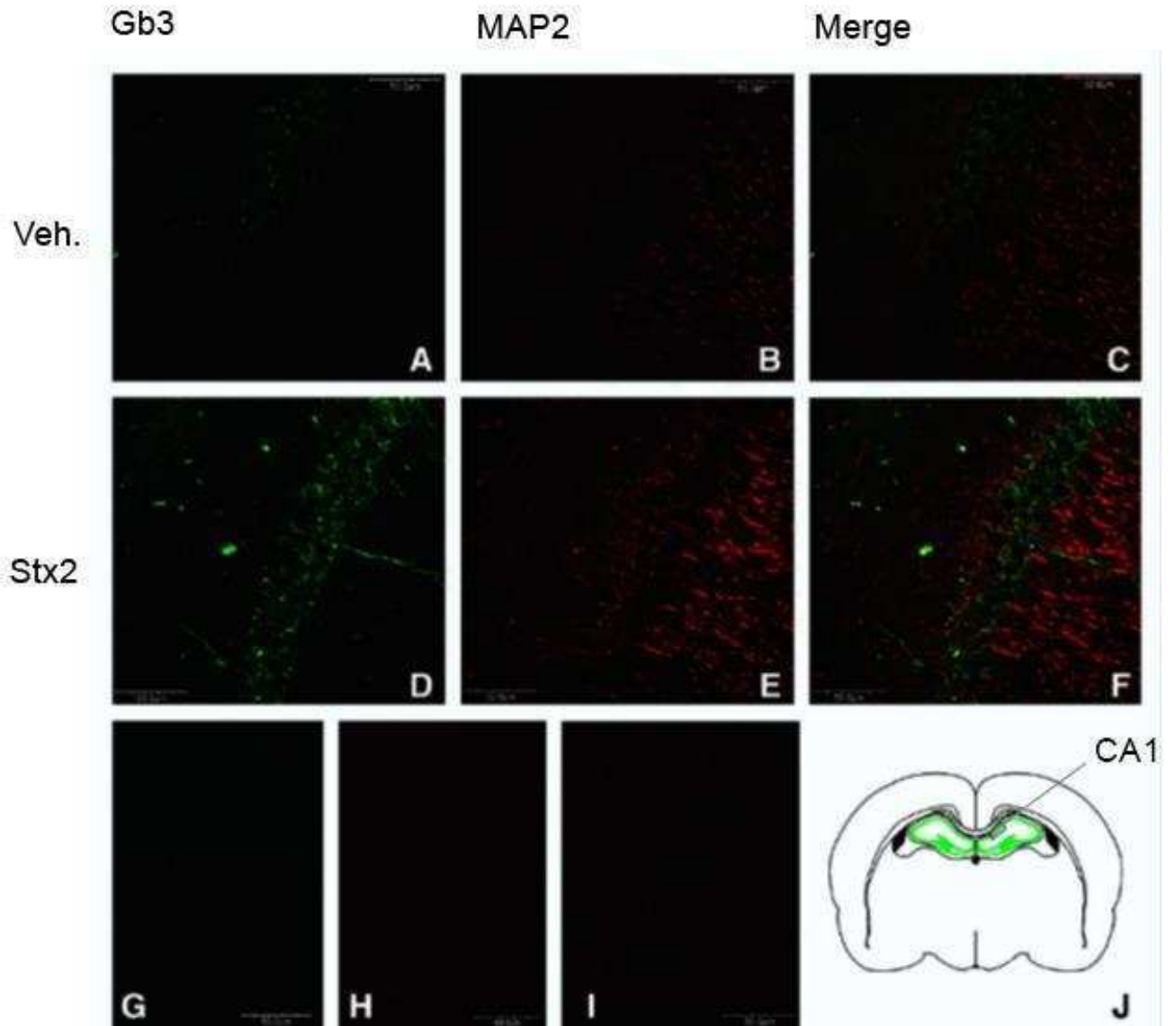


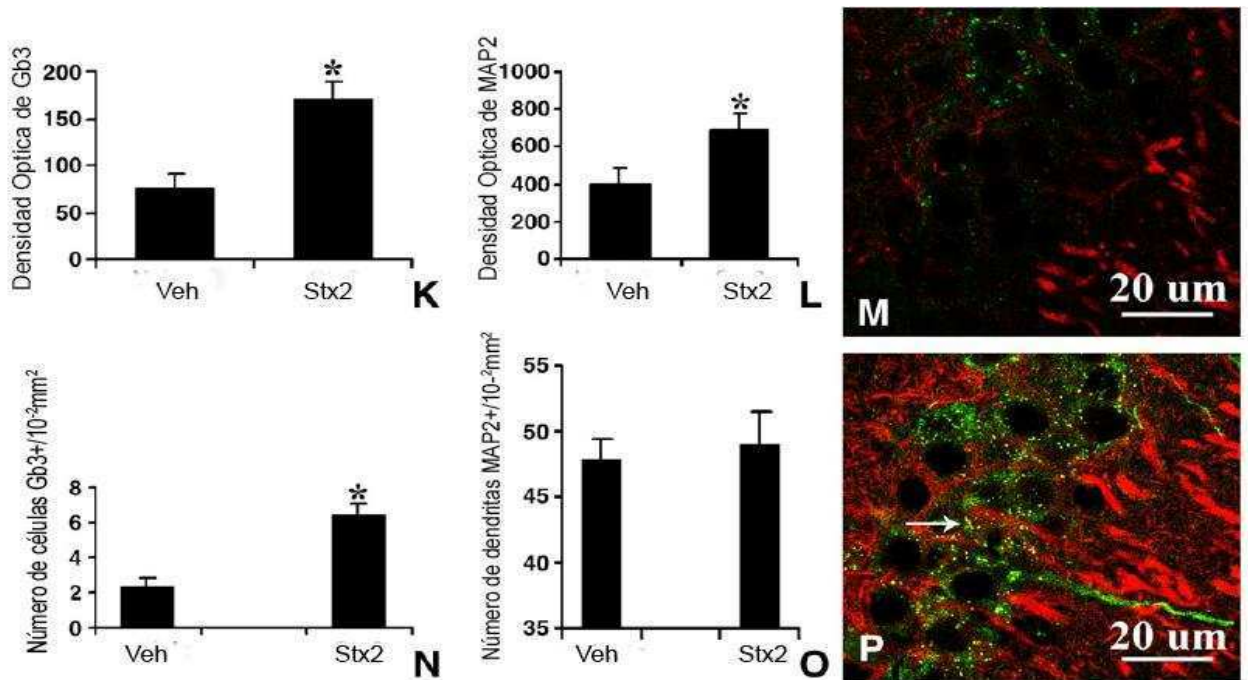
**Fig. 4. La administración local de Stx2 aumenta la expresión de Gb3 hasta el día 8.**

En esta figura se muestra la inmunolocalización del receptor Gb2 en el cuerpo estriado luego de la inyección de Stx2 (A–D). Las fotos de micrografía confocal muestran un control obtenido de las ratas inyectadas con vehículo (A). Luego de 2, 4 y 8 días de ser administrada Stx2 vía ICV (B–D) se observa el aumento en la expresión de Gb3. La figura E muestra un control de isotipo. Las mediciones de DOI (F) confirman que el nivel de expresión aumentó hasta el día 8 luego de inyectada la toxina. No se encontraron diferencias significativas en el número de neuronas que expresan Gb3 (G). \*p < 0.05.

**La administración local de Stx2 aumenta la expresión del receptor Gb3 y altera la expresión de MAP2 en diferentes poblaciones neuronales de cerebros de rata**

Se usó doble inmunofluorescencia para medir la distribución del receptor Gb<sub>3</sub> y MAP2, una proteína del citoesqueleto neuronal localizada en dendritas post-sinápticas y en cuerpos neuronales.





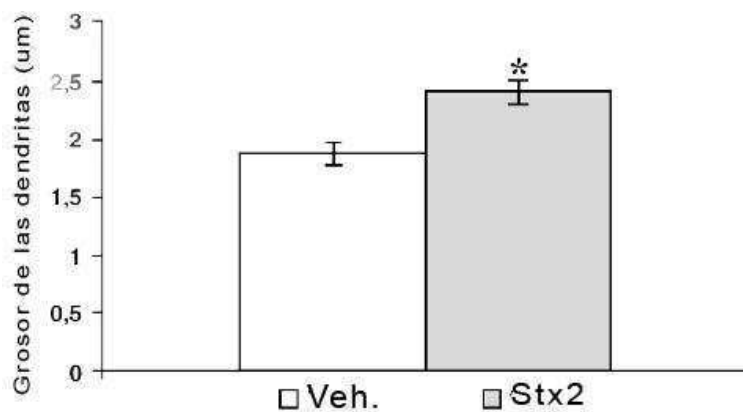
**Fig. 5. La administración local de Stx2 aumenta la expresión del receptor Gb<sub>3</sub> en el CA1 del hipocampo**

Vehículo (A-C) y Stx2 (D-F). Stx2 aumenta la expresión de Gb<sub>3</sub> (D) y también aumenta la expresión de MAP2 (E) comparado con los animales tratados con la administración ICV de un vehículo (A y B, respectivamente). Los controles de isotipo para Gb<sub>3</sub> y MAP2 (G y H) no mostraron inmunoreacción. I es un control negativo para MAP2. El área estudiada se muestra en J. Las intensidades de las inmunofluorescencias observadas fueron medidas por DOI en el cual se muestra que Stx2 induce la expresión de Gb<sub>3</sub> (K) y aumenta el número de células positivas para Gb<sub>3</sub> por campo (N). Las células se identificaron con Hoechst (Fotos representativas en la Fig.11). El análisis DOI muestra que MAP2 aumentó luego de la ICV Stx2 (L), aunque el número de dendritas positivas no mostró cambios (O). Se muestra una magnificación del vehículo (M) y los tratados con Stx2 (P). La colocalización entre Gb<sub>3</sub> y MAP2 se muestra en amarillo y se observa una forma granulada (flecha, P). Esto no se observa en las ratas tratadas con vehículo (M). Los controles de isotipo para Gb<sub>3</sub> y MAP2 (Fig. 5G y H respectivamente) y el control negativo para MAP2 (Fig. 5I) validaron estos datos. La significancia estadística se muestra con un asterisco,  $p < 0.05$ .

Las neuronas de la región CA1 del hipocampo (Fig. 5J) expresan Gb<sub>3</sub> y MAP2 (Fig. 5C, F, M, P). La expresión basal de Gb<sub>3</sub> se inmunolocalizó en neuronas de la región hipocampal CA1 (Fig. 5A). Luego de la administración IVC de la toxina, la expresión del receptor Gb<sub>3</sub> aumentó en comparación con los animales en los que se administró el vehículo (Fig. 5D, A). Estos datos fueron respaldados por el

análisis de densidad óptica (Fig. 5K,  $p < 0.05$ ). Incluso, el número de neuronas que expresan Gb<sub>3</sub> fue mayor en las tratadas con la toxina que en las controles (Fig. 5N,  $p < 0.05$ ).

La expresión de MAP2 en neuronas de la capa CA1 del hipocampo de animales inyectados con vehículo se inmunolocalizó particularmente en las fibras neuronales (Fig. 5B), mientras que en los animales tratados con la toxina MAP2 no sólo se observó en las fibras neuronales sino que también aumentó en el citoplasma neuronal (Fig. 5E). Mientras que no se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el número de dendritas que inmunoexpresó MAP2 en los tratados de los controles (Fig. 5O), sin embargo el análisis de imágenes mostró que los hipocampos tratados con toxina inmunoexpresaron más MAP2 que los tratados con vehículo (Fig. 5L) ( $p < 0.05$ ).

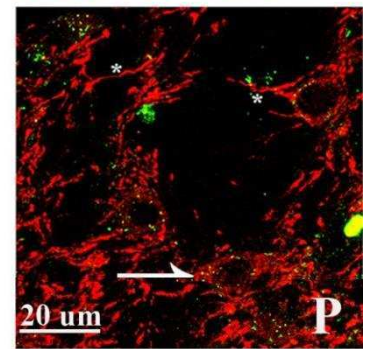
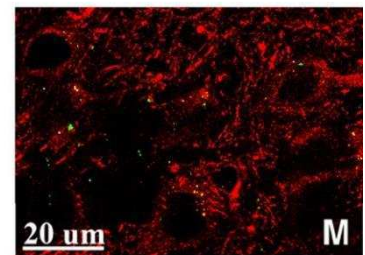
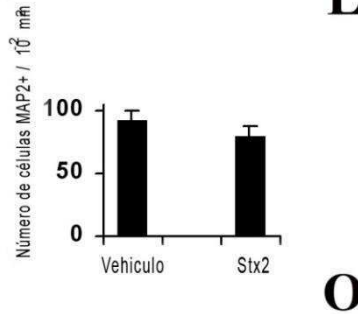
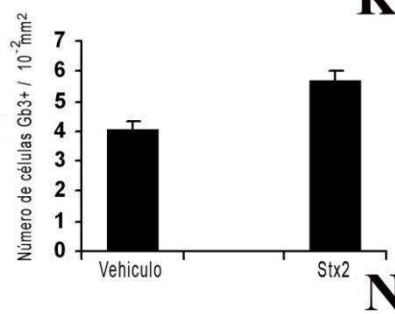
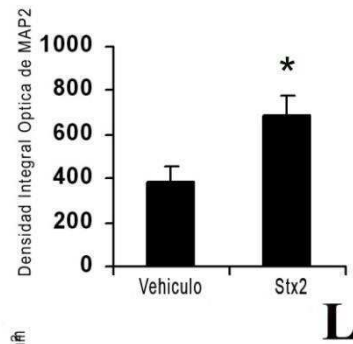
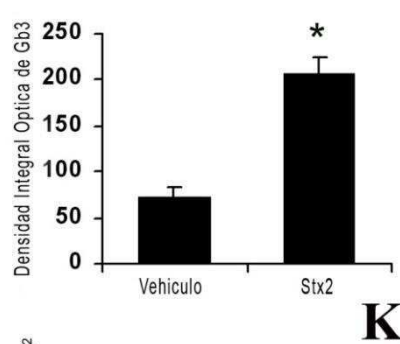
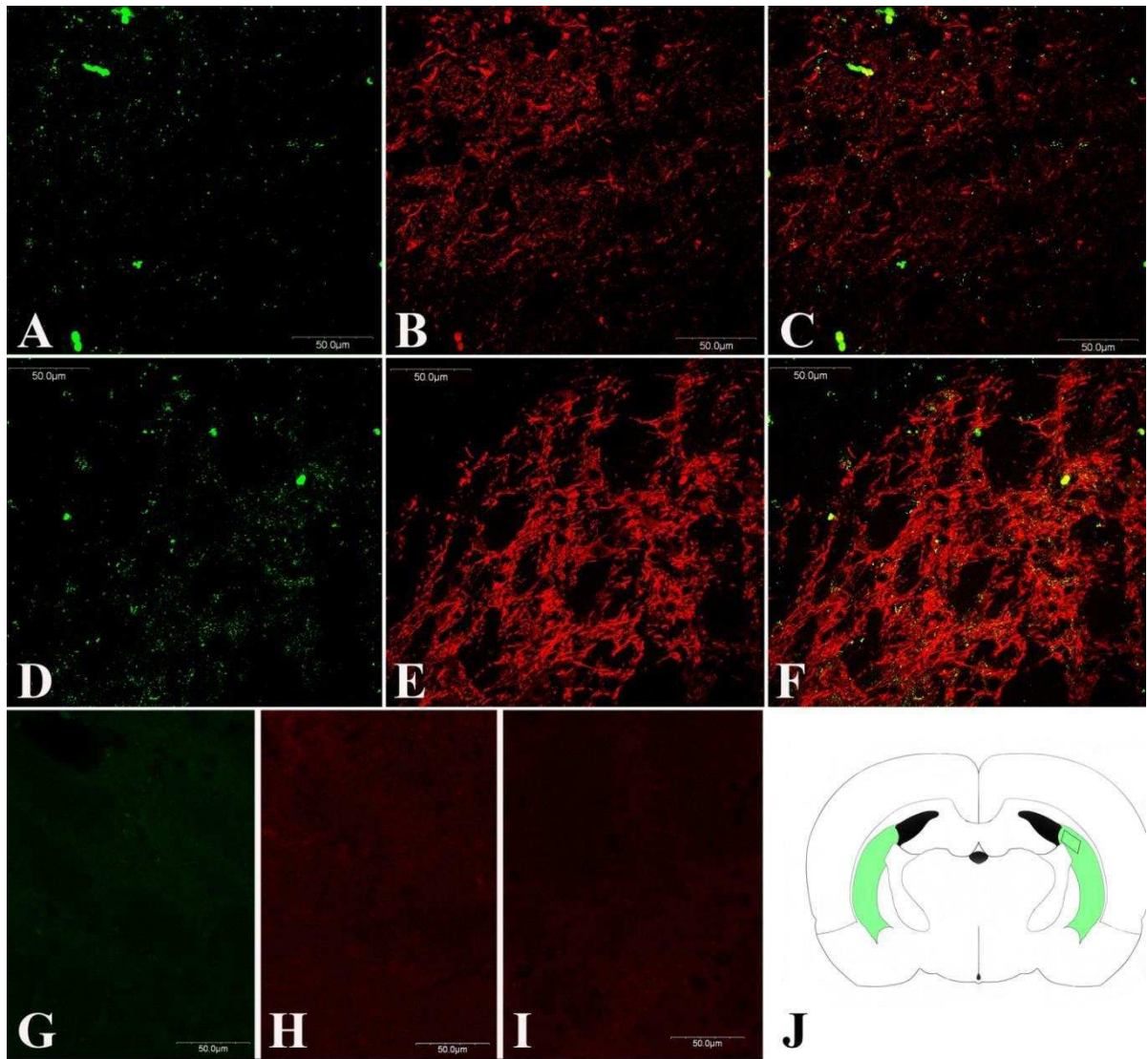


**Fig. 6: Se encontró una diferencia significativa entre el grosor de las dendritas de la capa CA1 del hipocampo de las ratas con la inyección de Stx2 y aquellas tratadas con un vehículo \* $p < 0.05$ .**

En consecuencia a lo antedicho se observa que, las dendritas de la región CA1 del hipocampo al ser tratadas con Stx2 resultaron ser más gruesas que las tratadas con el vehículo (Fig. 6).

Las imágenes que combinan MAP2 y el receptor Gb<sub>3</sub> también fueron inmunolocalizadas en las neuronas tanto en los vehículos como en el estriado de las ratas tratadas (Fig. 7C, F, J, L, O). El receptor Gb<sub>3</sub> se encontró en forma de gránulos en neuronas estriatales de animales controles y la inmunoexpresión de Gb<sub>3</sub> aumentó luego del tratamiento con toxina (Fig. 7A, D). Estos datos fueron

validados por el análisis densitométrico (Fig. 7K,  $p < 0.05$ ). Sin embargo no se hallaron diferencias significativas entre el número de neuronas que expresó el receptor en ninguno de los dos tratamientos (Fig. 7N,  $p < 0.05$ ).

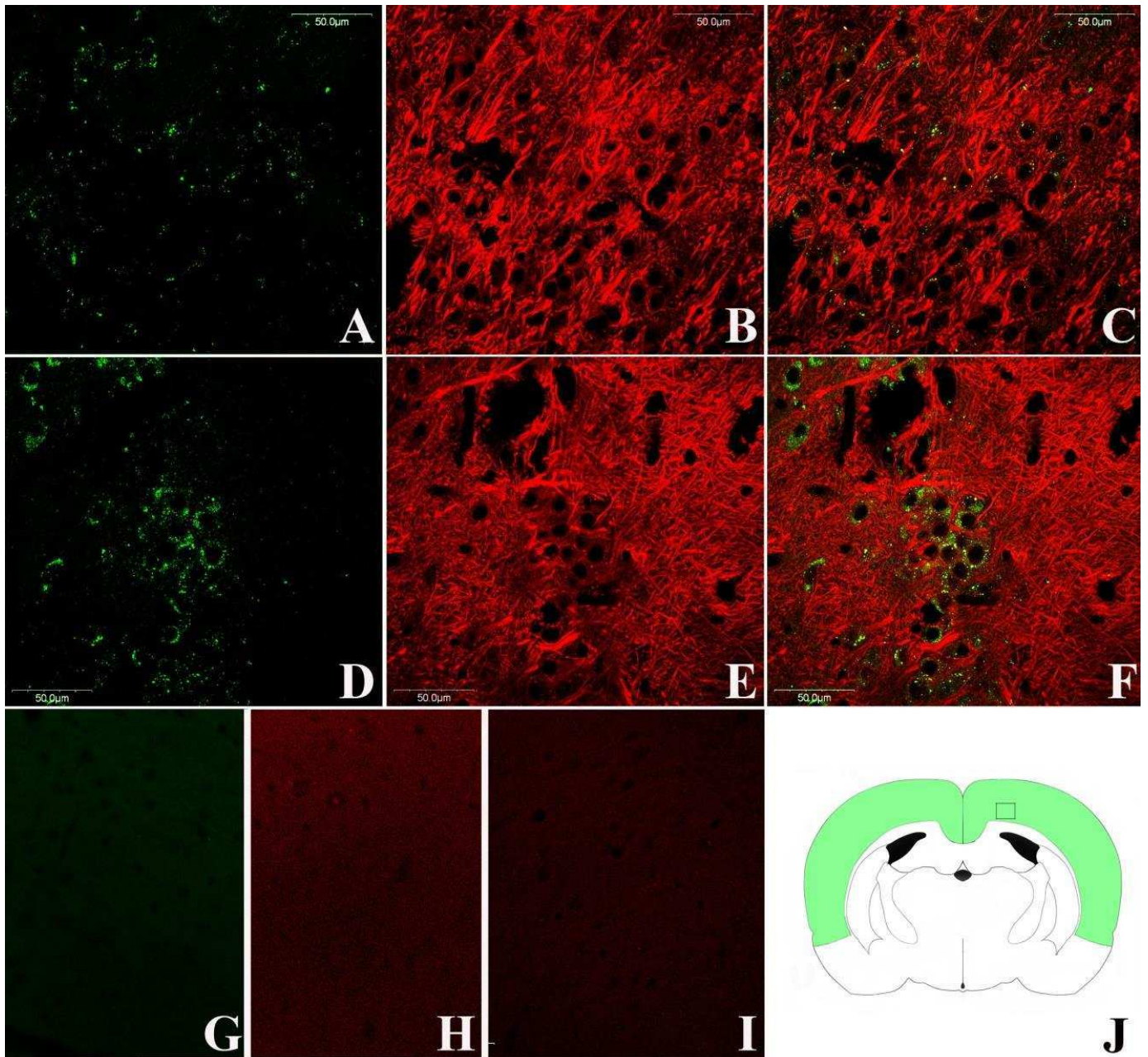


**Fig. 7. La administración local de Stx2 aumentó la expresión del receptor Gb3 en el estriado dorsal de rata.**

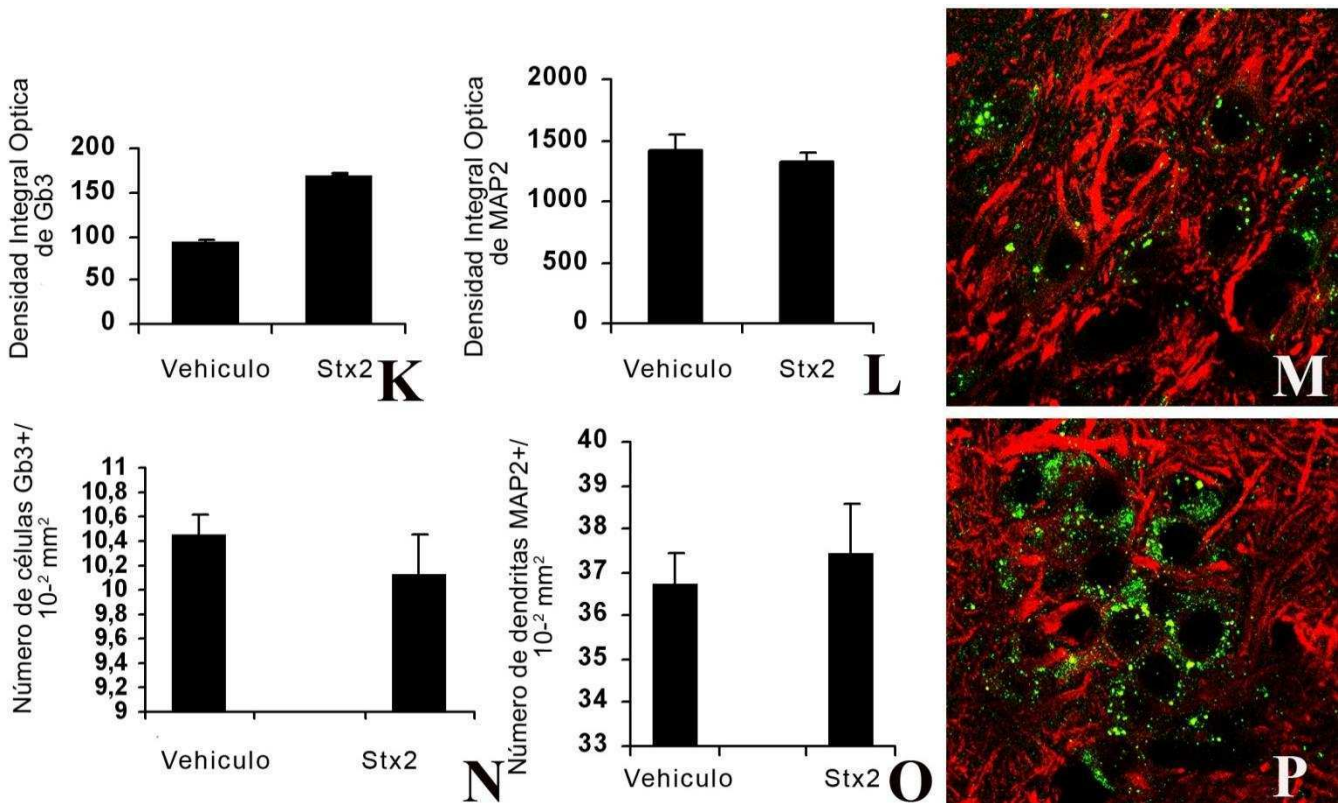
Las micrografías de inmunofluorescencia confocal para Gb<sub>3</sub> y MAP2 se muestran en verde (A y D) y rojo (B y E) respectivamente, la combinación de imágenes se muestra en C y F. Se muestran los animales vehículo (A-C) y los tratados con Stx2 (D-F). Stx2 aumenta la expresión de Gb<sub>3</sub> (D) en neuronas y además aumenta la expresión de MAP2 debido al hinchazón de las dendritas (E) comparado con las ratas tratadas con un vehículo (A y B respectivamente). Los controles de isotipo para Gb<sub>3</sub> (G) y MAP2 (H) no muestran inmunofluorescencia, ni para MAP2 (control negativo)(I). El área que se observa en este estudio está marcada en verde en J. Todos los datos obtenidos fueron analizados por DOI. Se observa que el tratamiento con Stx2 induce la expresión de Gb<sub>3</sub> (K) mientras que no se ven diferencias significativas en el número de células inmunopositivas para Gb<sub>3</sub> en ninguno de los dos grupos (N). Las células fueron identificadas por tinción nuclear de Hoechst (observar Fig. 11). El análisis de DOI también muestra que MAP2 aumentó luego de la administración ICV Stx2 (L), aunque el número de dendritas positivas para MAP2 no mostró cambios (O). En una magnificación mayor se muestra una sección tratada con un vehículo (M) y otra tratada con Stx2 (P). Las diferencias significativas se muestran con un asterisco,  $p < 0.05$ . La hinchazón de las dendritas se muestra en P.

Mientras que no se encontraron diferencias significativas en el número de dendritas que expresan MAP2 en ambos tratamientos (Fig. 7O,  $p < 0.05$ ), la DOI de MAP2 fue mayor en las fibras y en los citoplasmas de neuronas tratadas con Stx2 (Fig. 7L  $p < 0.05$ ) (Fig. 7B, E). Los controles de isotipo para Gb<sub>3</sub> y MAP2 (Fig. 7G y H respectivamente) y el control negativo para MAP2 (Fig. 7I) validaron estos datos.

Se obtuvieron micrografías donde se observan neuronas de la corteza que expresan MAP2 y el receptor Gb<sub>3</sub> en animales tratados con un vehículo o con Stx2 tanto del vehículo como de los animales tratados con Stx2 (Fig. 8C, F, J, M, P).







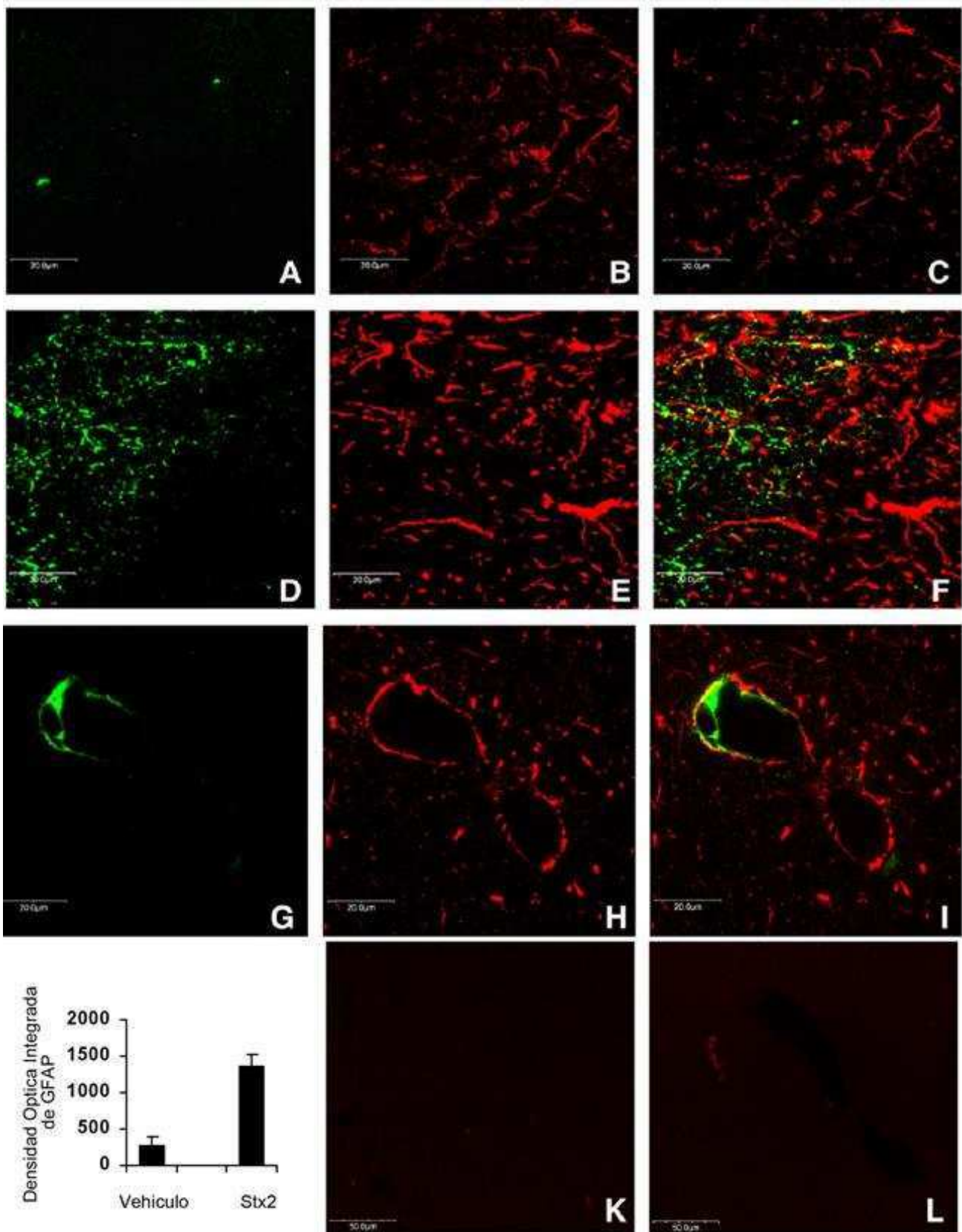
**Fig. 8. La administración local de Stx2 aumentó la expresión de Gb3 en la corteza interna.**

Se muestran micrografías de inmunofluorescencia para Gb3 (verde A y D) y MAP2 (en rojo, D y E), la superposición de ambas se observa en amarillo en C y F. animales tratados con un vehículo (A-C), animales tratados con Stx2 (D-F). Stx2 aumenta la expresión de Gb3 en neuronas (D). No se observa inmunofluorescencia en los controles de isotipo para Gb3 y MAP2 (G y H). I es una micrografía que muestra la ausencia de inmunofluorescencia en un control que se omite el anticuerpo primario anti MAP2. El área estudiada se muestra en J. Las imágenes fueron analizadas por DOI. Stx2 induce la expresión de Gb3 (K) pero no hay diferencias significativas entre ambos grupos en cuanto al número de células Gb3 inmunopositivas (N), los niveles de expresión de MAP2 (L) ni tampoco el número de dendritas MAP2 inmunopositivas (O) luego de la administración ICV de Stx2. La micrografía M y P muestra una mayor magnificación la zona estudiada en un vehículo y Stx2 respectivamente. Se muestra una magnificación más alta del vehículo (M) y los tratados con Stx2 (P). ( $p < 0.05$ )

Se inmunolocalizó el receptor Gb3 en neuronas corticales de los animales inyectados con vehículo (Fig. 8A). Luego de la administración de Stx2, la expresión de Gb3 aumentó predominantemente en neuronas de la corteza interna (Fig. 8D). Estos datos fueron convalidados por DOI (Fig. 8K,  $p < 0.05$ ). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre el número de

neuronas de la corteza interna que expresan Gb<sub>3</sub> entre los animales tratados con la Stx<sub>2</sub> y el tratamiento con el vehículo (Fig. 8N). Por otra parte, la inmunopresión de MAP2 no mostró diferencias entre los dos tratamientos (Fig. 8L, O).

La expresión aumentada de Gb<sub>3</sub> luego de la administración de Stx2 se localizó en las zonas donde se encontraron astrocitos reactivos



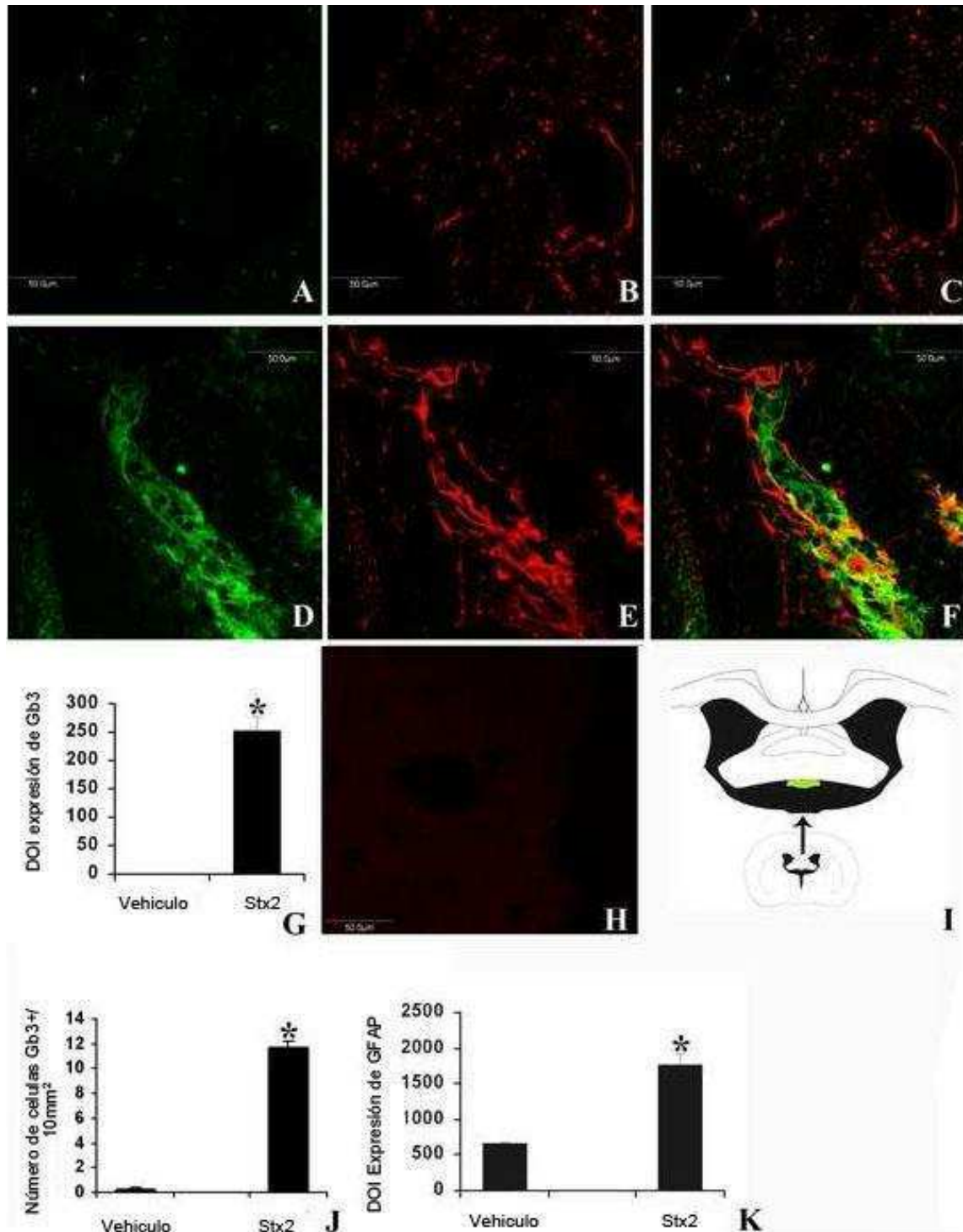
**Fig. 9. Aumento de Gb3 en reacción astrocitaria.**

Micrografía de una sección de cerebro de rata correspondiente al estriado tratado con la administración ICV de un vehículo (A-C) ó Stx2 (D-F). Se muestra la inmunofluorescencia para Gb3 en verde (A, D y G), GFAP en rojo (B, E y H) y la superposición de ambos (C, F e I). Se observan astrocitos reactivos en cerebros tratados con Stx2 (E) pero no en los tratados con vehículo (B). Por otra parte, Gb3 se inmunolocalizó distribuido en forma de parches y yuxtapuesto a los astrocitos reactivos (F) y está ausente en los controles (C). Una mayor magnificación muestra la inmunoexpresión de Gb3 (G) entre un pie chupador de astrocito (H) y el endotelio (I). La densitometría de GFAP de ambos tratamientos confirmó la reactividad astrocitaria en los cerebros de los animales tratados (J). Los controles de isotipo y negativos para GFAP (K y L) no muestran reactividad.

La administración local de Stx2 indujo la expresión de Gb3 en una región circunscripta del estriado en que se observa reacción astrocitaria (Fig. 9D–F). Además se observaron astrocitos reactivos en los controles en una región casi sin Gb3 (Fig. 9A–C). En esta misma región la inducción de Gb3 coincidió con la inmunolocalización con los astrocitos reactivos (Fig. 9F). Además, la expresión del receptor Gb3 se inmunolocalizó en parches en los procesos astrocitarios del estriado dorsal (Fig. 9F) y no se encontró en los controles que tenían astrocitos no reactivos (Fig. 9C). Una posibilidad para la topología de Gb3 descrita es que algunos procesos neuronales o cuerpos conteniendo el receptor pudieran estar en contacto con astrocitos reactivos, por lo que en el confocal se vería en color amarillo (Fig. 9F).

Algunos receptores Gb3 que se observaron en verde (Fig. 9D) no fueron inmunolocalizados con astrocitos reactivos (Fig. 9E), probablemente debido a su localización en fibras y cuerpos neuronales (Fig. 9D). La reacción astrocitaria resultó ser significativa entre los 2 tratamientos (Fig. 9J).

También se detectó la expresión de Gb3 de la microvasculatura (Fig. 9G) (Fig. 9G–I). Los pies de los procesos astrocitarios en contacto con las microvasculatura pueden ser visualizados por inmunofluorescencia usando un anticuerpo anti-GFAP (rojo) (Fig. 9H). En ese punto la expresión de Gb3 se encontró en las células endoteliales con los pies de los procesos astrocitarios (Fig. 9I). Los controles de isotipo y negativos para GFAP no mostraron reacción (Fig. 9K, L).



**Fig. 10. La expresión de Gb3 aumenta en la zona subfornical.**

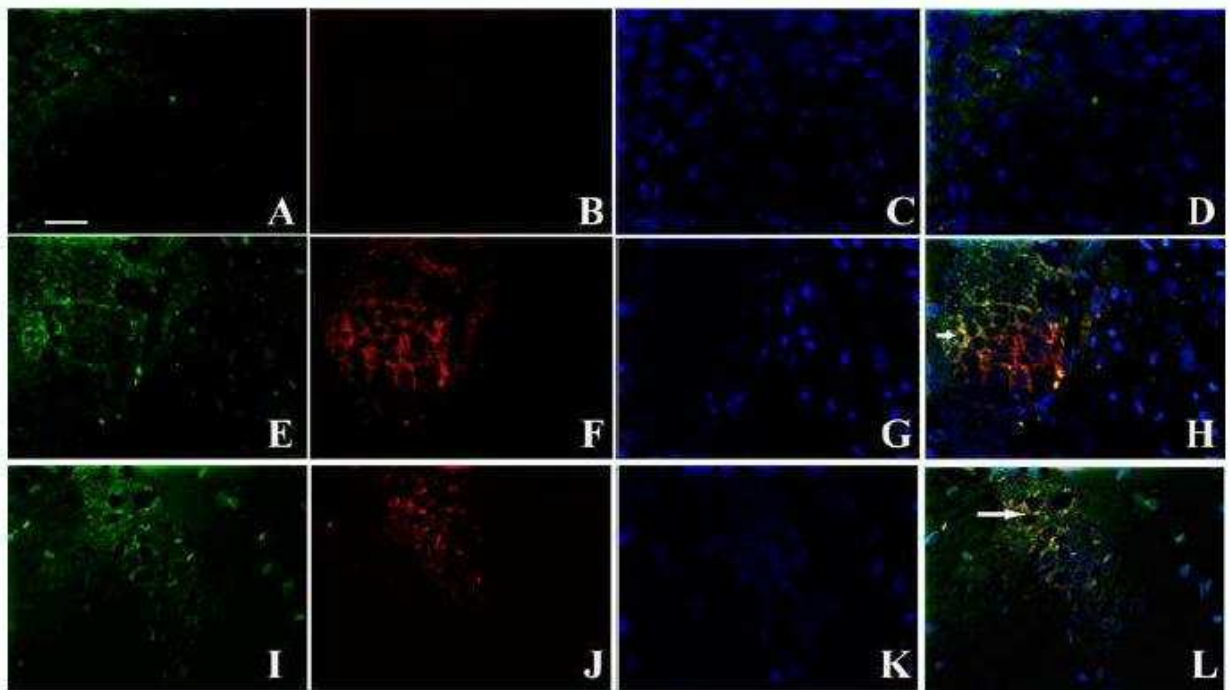
Micrografías de alta magnificación de la zona subfornical. Se muestra la inmunodetección de Gb3 en verde (A y D) y GFAP en rojo (B y E) y la superposición de imágenes anti Gb3 y GFAP (C y F). Se observan astrocitos reactivos en los animales tratados con Stx2 (E) pero no en secciones de cerebros tratados con un vehículo vía ICV (B). En los del vehículo (B) Gb3 colocaliza con procesos astrocitarios reactivos (amarillo) en contacto con neuronas Gb3 positivas (verde) (F), Este no se observa en los controles con

astrocitos no reactivos (C). La densitometría para medir los niveles de expresión de GFAP entre los animales tratados con un vehículo y los tratados con Stx2 mostraron diferencias significativas (K). Controles de isotipo para GFAP (H). La expresión aumentada de Gb<sub>3</sub> en la zona subfornical tratada con Stx2 fue confirmada por el análisis de imágenes DOI. También se observó un mayor número de células positivas para Gb<sub>3</sub> por campo (J). I muestra el área estudiada.

En el órgano subfornical (Fig. 10I) los astrocitos reactivos observados en los animales tratados con Stx2 (Fig. 10E, K) pero no en animales tratados con vehículo (Fig. 10B, K). La inmunodetección del receptor Gb<sub>3</sub> fue encontrada en las secciones tratadas con la toxina (Fig. 10D, F, G, J). También el receptor Gb<sub>3</sub> se encontró en procesos astrocíticos que estaban en contacto con neuronas que lo contenían (Amarillo) (Fig. 10F) pero esto no se observó en las secciones tratadas con el vehículo (Fig. 10C). Los controles negativos en el área subfornical no mostraron inmunofluorescencia (Fig. 10H).

### **El receptor Gb<sub>3</sub> colocaliza con Stx2 en neuronas**

Estudios previos mostraron que Stx2 es capaz de pasar la barrera hematoencefálica. En nuestro modelo ICV se confirmó la inmunolocalización de Stx2 en células del cerebro<sup>120</sup>. En los experimentos mostrados en esta tesis, usando microscopía confocal y luego deconvolución de imágenes demostramos que Stx2 colocaliza con su receptor Gb<sub>3</sub> en neuronas luego de la administración ICV de Stx2. Esto es evidente en el estriado dorsal (Fig. 11E–H) y en las neuronas de la capa CA1 del hipocampo (Fig. 11I–L). Los cerebros tratados con vehículo no mostraron esta colocalización (Fig. 11A–D).

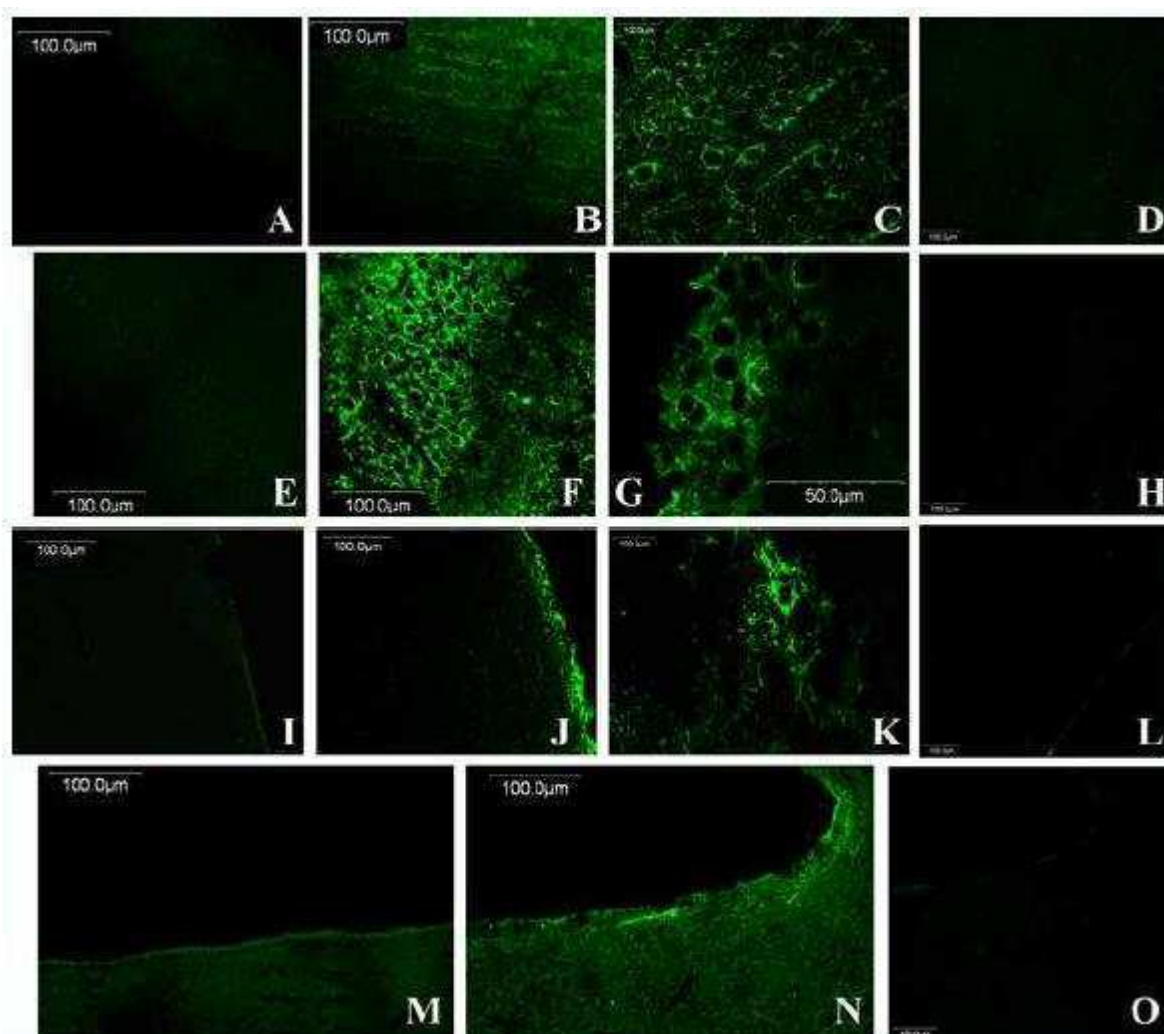


**Fig. 11. Stx2 colocaliza con Gb3 en neuronas luego de la administración ICV de Stx2**

Microscopía de inmunofluorescencia deconvolucionada para Gb3 (A, E, I), Stx2 (B, F y J) y tinción para núcleos Hoechst (C, G, K). Combinación de las imágenes (D, H, I). Los vehículos de la zona estriatal (A-D). El tratamiento de Stx2 en la zona estriatal (E-H) e hipocampal CA1 tratada con Stx2 (I-L). Stx2 colocaliza con su receptor en neuronas (amarillo) luego de la administración ICV de la toxina como se muestra en H y L (flecha), mientras que esto no se observó en los controles (D). Barra de Escala: 30um en A-L

Además las micrografías deconvolucionadas presentadas apoyan la evidencia de que en el estriados dorsal de animales tratados con Stx2 se expresa más el receptor Gb3 que en los tratados con vehículo (Fig. 11E, A respectivamente)

**La proteína proapoptótica Bax se inmunolocalizó en neuronas de poblaciones de varias regiones cerebrales luego de la administración ICV de Stx2**



**Fig. 12. La inducción de la proteína proapoptótica Bax en neuronas por Stx2**

No se inmunodetectó Bax en los cerebros tratados con vehículo (A, E, I y M). Se inmunodetectó Bax en la corteza interna (B), en fibras y en citoplasma de neuronas (C). Además, se inmunolocalizó en neuronas y otros tipos celulares en la capa CA1 del hipocampo (F), en la zona subventricular subyacente al estriado dorsal (J) y en la zona periventricular hipotalámica (N). Las magnificaciones del hipocampo y el estriado dorsal se muestran en G y K. Los controles negativos no presentaron reacción (D, H, L y O).

La distribución de la proteína proapoptótica Bax encontrada en neuronas de la capa CA1, (Fig. 12) coincidió con las regiones donde se encontró Stx2 luego de la administración ICV. También se observó localización de Bax en poblaciones neuronales de la corteza interna (Fig. 12B). En una magnificación mayor, se observó en detalle la proteína localizada en el citoplasma y en fibras (Fig. 12C).

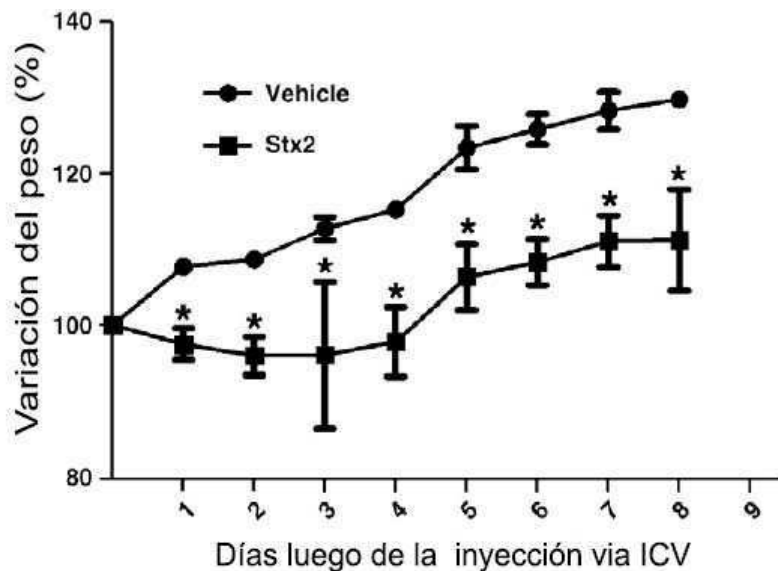


La inmunoexpresión de Bax en zonas subventriculares (Fig. 12J), se observó en el citoplasma de células adyacentes al ventrículo lateral en el estriado dorsal (Fig. 12K). Además en el tercer ventrículo el nivel de expresión de Bax se encontró localizado en el citoplasma de células ependimales y periventriculares (Fig. 12N). Por otro lado no se localizó la inmunoexpresión de Bax en neuronas de animales a los cuales se les administró el vehículo (Fig. 12A, E, I, M), ni se observó inmunolocalización de Bax en controles negativos (Fig. 12D, H, L, O).

### Variación del peso del animal como consecuencia de Stx2

En trabajos anteriores de nuestro laboratorio se demostró que el mayor daño neurológico se produce luego de 8 días de administrada via ICV la toxina<sup>121</sup>.

Se determinó la variación del peso para los diferentes grupos a lo largo de los 8 días.



**Fig. 13. Variación de peso luego de la inyección ICV con Stx2.**

El peso se monitoreo durante los 8 días del experimento y se hallaron significativas diferencias entre tratamientos desde el primer día de tratamiento (\* $p \leq 0.05$ ).

Ambos grupos presentaron una ganancia de peso comparados con el peso inicial. Sin embargo, los animales perdieron peso luego de la inyección con Stx2 en todos los tiempos medidos, desde la inyección hasta el día 8. Una diferencia estadísticamente significativa de pérdida de peso se observó en las ratas tratadas con Stx2 desde el día 1 hasta el final del experimento (\* $p \leq 0.05$ ).

## Discusión

El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar el rol del receptor de Stx2, Gb<sub>3</sub> cuando la toxina alcanza el SNC. Por lo que se determinó la expresión neuronal de Gb<sub>3</sub> luego de una administración ICV de Stx2 o vehículo en cerebro de ratas.

Encontramos una fuerte evidencia que avala la hipótesis de que la expresión de Gb<sub>3</sub> es regulada positivamente luego de la administración local de Stx2, y que entonces el receptor puede estar implicado en el daño cerebral afectando los estados funcionales neuronales y gliales normales.

Se detectó la expresión de Gb<sub>3</sub> por inmunofluorescencia confocal en diferentes áreas del cerebro. Este es el primer estudio, donde se muestra la localización de Gb<sub>3</sub> neuronal en diferentes áreas del cerebro de rata.

Todas las ratas fueron mantenidas en las mismas condiciones. El LPS comercial usado no aumentó la expresión de Gb<sub>3</sub> comparado con los controles, dada la cantidad que tenía la solución de Stx2, luego de remover el LPS. Aunque se ha reportado que diferentes combinaciones de LPS con Toxina Shiga tiene un efecto sinérgico citotóxico sobre las células endoteliales vasculares humanas *in vitro*<sup>122</sup>, esto no ocurrió en las cantidades estudiadas en nuestro modelo de administración por ICV.

Esto se debe a que el efecto sinérgico conjunto de Stx2+LPS realizado por otros autores fue observado en concentraciones entre 0.1 y 1.0  $\mu\text{g/ml}$  de LPS, que resulta citotóxico a una concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$ <sup>123</sup>, mientras que el remanente de LPS observado en nuestro trabajo es de 0.05  $\mu\text{g/ml}$ .

A la luz de estos resultados, esta acción sinérgica encontrada *in vitro* en otros tipos celulares<sup>124</sup> que no son neuronas no se observó en el trabajo presentado en este capítulo. Además los efectos sinérgicos observados en los experimentos *in vitro* pueden no reflejar las condiciones que se dan *in vivo*. Sin embargo, no debe descartarse que el LPS pueda estar involucrado en la regulación de la expresión neuronal de Gb<sub>3</sub>, aunque no en nuestras condiciones experimentales.

La técnica ICV usada en este capítulo nos permitió micro inyectar la toxina en una zona de interés específica del cerebro utilizando un estereotáxico.

Para evitar daño mecánico del tejido colocamos la cánula en el ventrículo lateral. Por otra parte las técnicas utilizadas para observar neuronas inmunopositivas para Stx2 fueron convalidados previamente<sup>125</sup>, donde se determinó la capacidad de Stx2 de alcanzar el parénquima cerebral. Mientras que la inmunolocalización de Stx2 se observó en neuronas, no se observó inmunofluorescencia específica para Stx2 cuando se incubó con un anticuerpo de isotipo (usado como control de para Stx2) ni cuando se omitió el anticuerpo primario. Estas técnicas fueron corroboradas por diferentes controles realizados en este capítulo.

La concentración de toxina utilizada en la inyección ICV fue de 24 pg/gr de peso. La cantidad de toxina administrada vía ICV se encuentra dentro del rango utilizado por otros autores cuando se la administraba vía periférica. Se observó que tanto 250pg/gr de Stx2<sup>126</sup> y 5000 pg/gr de peso<sup>127128</sup> por inyección intravenosa, y desde 0.4 pg/gr<sup>129</sup> por una inyección intratecal dieron como resultado un efecto tóxico fuerte que causó daño cerebral. Otros reportes que validan el presente modelo ICV muestran que la concentración de Stx2 en el fluido cerebroespinal (CSF) fue de 200-300pg/ml durante las primeras 6h en conejos luego una inyección intravenosa de 6 µg Stx2 por animal. Similarmente otros autores determinaron que la concentración de Stx2 en el CSF fue entre 100 y 1000 pg/ml durante las primeras horas luego de una inyección intravenosa de 5 µg/kg<sup>130</sup>.

En la corteza, estriado e hipocampo los niveles de expresión de Gb<sub>3</sub> aumentaron luego de la administración de Stx2, al igual que MAP2, una proteína del citoesqueleto localizada en el citoplasma neuronal y en las dendritas que

contenían Gb<sub>3</sub>. En condiciones fisiológicas, MAP2 puede estar involucrada en la modulación de la plasticidad sináptica<sup>131</sup>. En condiciones patológicas la sobreexpresión de MAP2 y el crecimiento de las dendritas puede deberse a una excesiva liberación de neurotransmisores en respuesta a un daño en zonas específicas del cerebro<sup>132</sup>. Se ha reportado que la Stx2 en cortes de cerebro de ratón se produce una excesiva liberación de neurotransmisores<sup>133</sup>. Se observaron dos características patológicas en las dendritas tratadas con la Stx2: el engrosamiento (Figs. 5 y 6) y ensanchamiento (Fig. 7). El primero fue descrito por inmunofluorescencia contra MAP2 en la zona CA1 del hipocampo en pacientes esquizofrénicos<sup>134</sup>, luego de convulsiones<sup>135</sup>, o luego de estimulación eléctrica en modelos animales<sup>136</sup>. El ensanchamiento dendrítico fue observado luego de una exposición a NMDA en el cual se observó un cambio en la distribución de MAP2. Por lo que se observó disminución de las dendritas distales y aumento de las dendritas proximales y del soma neuronal<sup>137</sup>. Una consecuencia del ensanchamiento puede deberse a la pérdida de las dendritas y la carencia de las conexiones sinápticas axonales. Esto está relacionado con una organización anormal de las proteínas del citoesqueleto que puede ocurrir en situaciones de edema<sup>138</sup>, lo cual coincide con otros casos descritos de edema cerebral en pacientes intoxicados por STEC<sup>139</sup> y en modelos animales de intoxicación por Stx2<sup>140141</sup>. Los cambios patológicos en las dendritas ocurridos luego de la administración ICV de Stx2 pueden deberse entre otras causas, al remodelamiento del citoesqueleto incluyendo MAP2<sup>142143</sup>. Estos resultados coinciden con nuestras observaciones ultraestructurales previas donde se encontraron dendritas hipertrofiadas luego de la administración ICV de Stx2<sup>144</sup>.

Se inmulocalizó Gb<sub>3</sub> en el cerebro de rata en astrocitos reactivos (GFAP) rodeando, entre los pies de los astrocito y las células endoteliales y en células de la zona subfornical luego del tratamiento con Stx2. En un reporte previo Stx2 cambió la expresión de GFAP en astrocitos en una forma dosis dependiente<sup>145</sup>. La colocalización entre GFAP y Gb<sub>3</sub> puede deberse a que procesos neuronales conteniendo Gb<sub>3</sub> se encuentran en contacto con astrocitos. Otra posibilidad es que haya un receptor Gb<sub>3</sub> glial. Sin embargo la presencia de este receptor en este tipo de células no ha sido aún establecida. Es interesante observar que no se

inmunolocalizó Gb<sub>3</sub> en astrocitos no reactivos en los cerebros de ratas tratadas con vehículos. Mientras algunos autores sostienen que los astrocitos reactivos puedan tener un rol neuroprotector<sup>146</sup>, otros afirman que los astrocitos reactivos pueden provocar la pérdida neuronal<sup>147148149</sup>.

En este capítulo también demostramos la co-inmunolocalización de Gb<sub>3</sub> y Stx2 en estriado e hipocampo. La técnica usada para observar las células inmunopositivas para Stx2 fue previamente validada<sup>150</sup>.

Por otra parte la participación de citoquinas en la inducción de Gb<sub>3</sub> y la consecuente muerte celular ya ha sido determinada en otros tipos celulares<sup>151152</sup>. Se ha demostrado que los astrocitos pueden liberar mediadores como citoquinas<sup>153</sup> o factores neurotróficos<sup>154155</sup> que pueden ser neurotóxicos. La posible participación activa de citoquinas y también de factores neurotróficos en el modelo presentado yace como una hipótesis abierta.

Se inmunodetectó Bax en neuronas y otras poblaciones celulares en la corteza, hipocampo y las regiones subventricular y periventricular que incluyen las células del epéndimo correspondientes al tercer ventrículo hipotalámico. El marcador pro apoptótico Bax se expresa en neuronas pro apoptóticas lo que puede indicar daño mitocondrial luego de una isquemia cerebral<sup>156</sup>. Además otros autores han determinado la expresión de Bax luego de la administración de Stx2<sup>157158</sup>. En este trabajo se observan neuronas que expresan Bax en el estriado y la corteza motora, regiones asociadas con el movimiento<sup>159</sup>, y coincide con la expresión de Gb<sub>3</sub> en las mismas regiones luego del tratamiento con la toxina. El estriado está principalmente relacionado en pacientes con SUH que sufrieron de hemiparesis, convulsiones, coma y estados mentales alterados y temblores<sup>160161</sup>. El daño en las neuronas del estriado puede contribuir a un estado de hipoquinesia. Por lo tanto, Stx2 puede afectar la respuesta motora y también afectar las neuronas que controlan niveles superiores del cerebro. En otros estudios se observó que los animales tratados con Stx2 tienden a perder peso, posiblemente por alguna disfunción renal<sup>162</sup>. En nuestro trabajo los animales tratados con toxina tienden a ganar peso al mismo nivel que los tratados con vehículo, lo que puede reflejar la ausencia del compromiso renal. Sin embargo, las ratas tratadas con Stx2

desarrollaron alteraciones neurológicas en el sistema nervioso central y murieron. Por lo que la pérdida de peso observada comparada con los controles luego de la administración de la toxina comparada con los controles puede indicar disfunciones autonómicas o endócrinas<sup>163</sup>.

Por ejemplo, el óxido nítrico del núcleo paraventricular puede regular la expresión de neuropéptidos relacionados en el balance energético<sup>164</sup>. En nuestro trabajo observamos que la Stx2 en el cerebro aumentó la expresión de óxido nítrico en las neuronas de esa región<sup>165</sup> y puede estar relacionado con la variación de peso. Otra causa posible para la variación de peso puede ser la acción de citoquinas en la señalización de la melacortina producida en el hipotálamo por inflamación o enfermedades crónicas<sup>166</sup>.

En conclusión, la administración de Stx2 aumenta la expresión del receptor Gb<sub>3</sub> neuronal en diferentes áreas del cerebro de rata. Esta acción puede producir estados funcionales alterados en neuronas como los observados en la postsinapsis, como un aumento del tamaño dendrítico. Los astrocitos reactivos pueden jugar un rol tanto protector como neurotóxico en el daño cerebral, aunque la expresión de Bax encontrada parece sugerir eventos neurotóxicos. Los resultados obtenidos por el tratamiento con Stx2 en este modelo animal pueden utilizarse para entender las encefalopatías generadas en pacientes afectados con SUH. El receptor Gb<sub>3</sub> se constituye como el candidato más importante que puede mediar la citotoxicidad producida por Stx2.

## **Capítulo 3**

### **Estudio translacional de un modelo murino de intoxicación sub-letal con toxina Shiga 2 en cerebros**

## Capítulo 3

### Estudio translacional de un modelo murino de intoxicación sub-letal con toxina Shiga 2 en cerebros

#### Introducción

Como se mencionó en el capítulo anterior, la infección con STEC causa SUH, que incluye falla renal aguda y compromiso del sistema nervioso. La mortalidad causada por SUH puede llegar al 5% de los casos, pero cuando hay compromiso neurológico puede elevarse hasta un 40%<sup>167</sup>.

El brote de SUH que ocurrió en Alemania fue un ejemplo de la alta tasa de mortalidad cuando existe un compromiso neurológico<sup>2</sup>. El consumo de alimentos contaminados con una cepa inusual de *E. coli* O104:H4 que incluía Stx2 resultó en 3816 casos de gastroenteritis, de los cuales 845 desarrollaron SUH y 54 personas murieron. Mientras que las EHEC usualmente producen SUH en niños, en este caso la mayoría de los afectados fueron adultos, principalmente mujeres<sup>168</sup>.

Las publicaciones que se refieren los casos neurológicos de este brote están siendo publicados en la actualidad. Un reporte observó que el 48% de los 217 pacientes hospitalizados con STEC desarrollaron severos síntomas neurológicos<sup>169</sup>. En la misma se analiza que los síntomas neurológicos ocurren 5 días después de la primera diarrea y 4 días después del establecimiento del SUH. En los pacientes con síntomas neurológicos el 67% presentaron problemas



cognitivos y afasia. Durante el transcurso de la enfermedad, el 20% de los pacientes desarrollaron convulsiones epilépticas. Al tiempo en que los síntomas neurológicos aparecen, se observa un aumento la urea en sangre y la creatinina en suero. Los hallazgos más comunes en los 70 pacientes a los cuales se les realizó RMI fueron: hiperintensidades simétricas en la región del núcleo abducens y el tálamo lateral. En los scans que siguieron esas anormalidades desaparecieron. El análisis neuropatológico reveló astrogliosis y microgliosis, predominantemente en el tálamo y en el tronco del encéfalo y expresión neuronal del receptor Gb3. Sin embargo, no se encontraron signos de micro hemorragias, infarto isquémico u oclusión de vasos. Los estudios neuropatológicos y de RMI muestran un mecanismo inflamatorio y tóxico neuronal que luego se revierte.<sup>170</sup>

La mortalidad y las secuelas causadas por STEC son un problema de salud pública mundial. En niños, los síntomas neurológicos aparecen unos 8 días después del establecimiento de la diarrea. Los síntomas incluyen irritabilidad, hemiparesis, afasia y alteraciones cognitivas y motoras. Dentro del 39% de los niños que sobreviven continúan con déficit cognitivo, problemas visuales corticales, hemiparesis y afasia.

Aunque los efectos mortales sobre el CNS debido a la infección con STEC son drásticos y atraen la atención de los medios y de la sociedad, los mecanismos patogénicos por los cuales Stx2 provoca la disfunción del SNC todavía no han sido elucidados.

**Modelos animales utilizados en el estudio de los efectos de la toxina Shiga**

## en el SNC

Existen diferentes modelos animales utilizados para estudiar el efecto de la toxina Shiga en el SNC, a continuación una breve introducción a cada uno de los modelos usados y sus principales hallazgos.

### Ratones

Algunos modelos incluyeron la colonización bacteriana del tracto gastrointestinal de ratones luego de reducir la flora con un pre tratamiento con antibiótico<sup>171</sup>, o mal nutrirlos para poder establecer la infección<sup>172</sup>, o un modelo gnotobiótico, que usa ratones de 10 días de edad para que se establezca la bacteria<sup>173174</sup>.

En todos los modelos los síntomas descritos relacionados con el SNC son parálisis y convulsiones. Daño endotelial en la corteza cerebral, hipocampo y cerebelo<sup>175176177178179</sup>.

En los modelos de inyección periférica de Stx2, también se encontraron casos de parálisis de los miembros<sup>180</sup>, letargia, y convulsiones<sup>181</sup>. Al microscopio se observaron cambios vasculares y gliales<sup>182183184</sup>. Mediante inyecciones intraperitoneales con Stx2 se observaron procesos gliales bloqueando una sinapsis de una neurona motora<sup>185</sup>.

### Rata

En el modelo de inyección ICV intracerebroventricular con Stx2, la observación ultraestructural reveló neuronas en degeneración, desmielinización, astrogliosis y

oligodendrocitos patogénicos en el área de la inyección con Stx2<sup>186187</sup>.

### **Conejos**

En modelo de Conejos la administración de Stx2 produjo alteraciones en las capas de mielina, degeneración neuronal, reacción glial, cambios vasculares y hemorragia en la corteza cerebral, hipocampo, cerebelo, encéfalo, hipotálamo y espina dorsal<sup>188189190</sup>.

### **Cerdos**

En un modelo vía oral desarrollado en cerdos, se ha encontrado que Stx2 provoca edema, ataxia y tienen problemas con la coordinación motora<sup>191</sup> y parálisis<sup>192193194</sup>. Además patológicamente se reportan síntomas como los de la hipoxia-isquemia en la corteza cerebral y el tálamo y micro hemorragias en el cerebelo<sup>195</sup>, necrosis en la capa granular e hinchazón de las arteriolas ocluidas<sup>196</sup>.

### **Monos**

En monos, las convulsiones progresaron hasta el coma y posterior muerte luego de una administración endovenosa de Stx2 (0.1 mg/kg)<sup>197</sup>.

### **En seres humanos**

La resonancia magnética por imágenes (RMI) realizada en pacientes reveló que el compromiso de los ganglios basales es altamente frecuente en esta patología<sup>198</sup>

En pacientes con coma, se ha reportado frecuentemente la correlación entre déficit neurológico e imágenes radiológicas relacionadas con los ganglios basales. Sin embargo los efectos de dosis sub-letales de Stx2 aún no han sido estudiados en ningún modelo animal.

En este capítulo de la tesis se describirán los cambios ultraestructurales producidos en el estriado y en el hipocampo y se analizará en qué medida pueden asemejarse con lo encontrado en pacientes.

El cuerpo estriado modula el sistema motor y es una de las regiones más importantes relacionada con los desórdenes motores en pacientes con STEC<sup>199200</sup>

Los métodos no invasivos como el RMI permite diagnosticar este desorden en pacientes<sup>201202</sup> pero no son capaces de indicar qué tipo de célula está dañada. En cambio, la microscopía electrónica es una técnica suficientemente sensible como para detectar el daño ultraestructural de las células observadas.

## **Objetivo**

El objetivo de este capítulo es determinar si dosis subletales de Stx2 son capaces de generar daño y si es posible, caracterizar este daño tanto en forma estructural como comportamental y de esta forma establecer un modelo de acción para Stx2 y analizar la similitud entre nuestros resultados con aquellos que se producen en pacientes.

## Protocolos y métodos

### Animales utilizados

Se trabajó con ratones machos NIH endocriados de 20gr (28-30 días) (origen, Bioterio Central del ANLIS Malbrán).

La cepa NIH (o NIH/Ola)<sup>203</sup> deriva de la cría de ratones Swiss. Los ratones NIH tienen una buena respuesta de anticuerpos.

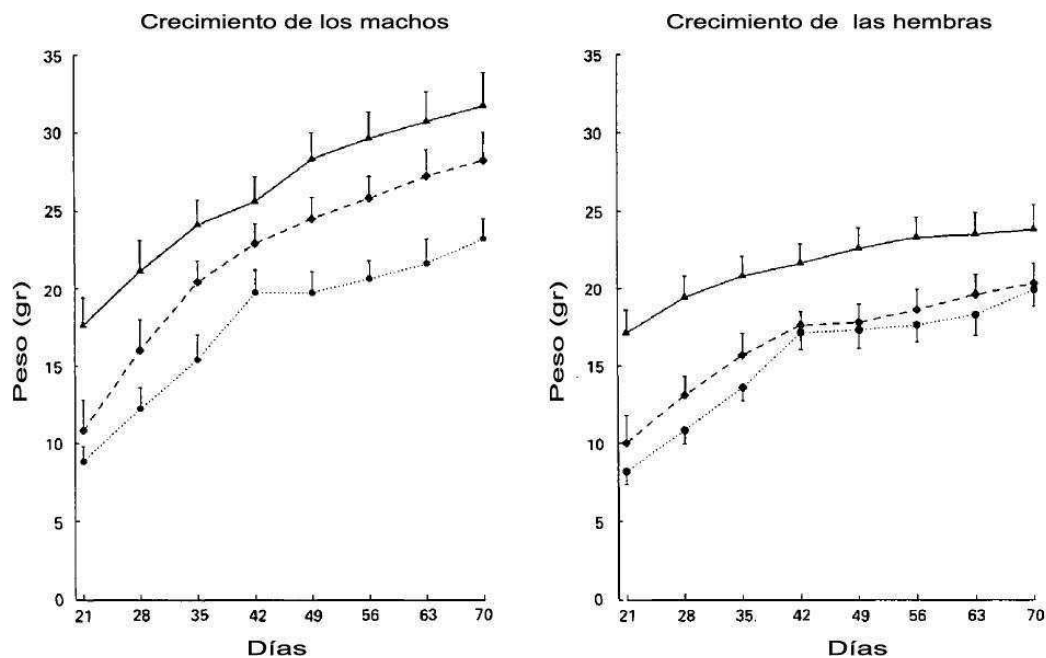


Fig.13. Crecimiento en función del tiempo de los ratones NIH

En el bioterio se mantuvieron en condiciones de luz y temperatura controladas y se les proveyó comida y agua ad libitum. Los animales fueron monitoreados diariamente por signos de manifestaciones neurológicas.

Los protocolos experimentales y de eutanasia fueron revisados y aprobados por el

Instituto de Cuidado y Uso Animal de la Universidad de Buenos Aires, Facultad de Medicina (Resolución N° 1099/10). Todos los protocolos y procedimientos se realizaron en acuerdo con las guías de uso de animales experimentales (EEC Council 86/609).

### **Determinación de la dosis letal 50 Stx2 (DL50)**

El efecto letal de Stx2 purificada fue caracterizado en ratones de 20gr (6 animales por dosis). Se administraron diferentes dosis de Stx2 (de 5 a 0.44ng por animal) o solución fisiológica. Se registró el tiempo de supervivencia con 1 y con 2 dosis de Stx2. Cuando se administró dos dosis, la segunda dosis se inyectó 24hs posteriores a la primera inyección. Se considera tiempo 0 el tiempo de la primera inyección.

### **Determinación de la Dosis subletal de Stx2**

El efecto subletal de dos dosis de Stx2 purificada fue caracterizado en ratones (n=6 por dosis). Diferentes dosis de Stx2 fueron administradas de forma intravenosa en ratones NIH de 20gr. El tiempo de supervivencia fue registrado. La dosis subletal usada fue de 0.5ng/ratón.

### **Modos de administración de Stx2**

## **Intravenoso**

La toxina y la solución fisiológica fueron inyectadas en forma endovenosa a través de la vena caudal de la cola de los ratones.

## **Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)**

Para realizar los estudios de microscopía óptica y electrónica los ratones fueron anestesiados con hidrato de cloral (350 mg/kg) y perfundidos transcárdiacamente con una solución 0.9% de NaCl seguido de 2.5% glutaraldehído en 0.1 M buffer fosfato (PBS) [fijador por peso del animal (ml/g)]. Los cerebros fueron removidos del cráneo y luego post-fijados en la misma solución por 2h. Se obtuvieron muestras de 3mm<sup>2</sup> del estriado dorsal, corteza, hipotálamo, hipocampo, tronco encefálico en 0.1M buffer fosfato. Las muestras fueron primero analizadas por microscopía óptica con azul de toluidina para seleccionar las muestras a usar por TEM<sup>204</sup>. Las secciones ultra finas se contrataron con 1% OsO<sub>4</sub> y 1% acetato de uranillo, deshidratado y embebido en Durcupán. Las secciones fueron contrastadas con citrato, examinadas y fotografiadas con un microscopio electrónico Zeiss 109. Se usó el software Adobe Photoshop para hacer el ensamblado de las imágenes (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA).

## **Estudios Hematológicos**

Durante el sacrificio, se tomaron muestras de sangre de todos los ratones. La sangre fue colectada en tubos tratados con EDTA y no tratados con EDTA. El

suero fue separado por centrifugación a 1000 g por 5 minutos a 4 °C.

El análisis bioquímico fue realizado en un aparato CCX Spectrum (Abbott Diagnostics Systems, Buenos Aires, Argentina) siguiendo las instrucciones standard (Laboratorio Química Clínica I del Departamento de Bioquímica Clínica, Hospital de Clínicas "José de San Martín", UBA).

### **Variación de masa corporal**

Se midió la variación en la masa corporal con los diferentes tratamientos. El peso de los ratones fue monitoreado el día 0 y el día de sacrificio, y se calculó la diferencia de peso.

### **Marcación con Fluorjade-B**

Luego de la fijación, las secciones de los cerebros de ratón de 25um fueron montadas en portaobjetos y secadas toda la noche en una estufa a 60C. Luego fueron sumergidas en una solución conteniendo 1% NaOH en 80% EtOH por 5 minutos. Luego 2 minutos en 70% alcohol y 2 minutos en H<sub>2</sub>O destilada. Luego se transfirió los portaobjetos a una solución con 0.06% de permanganato de potasio por 10 minutos en un agitador con rotación suave. Se lavaron los cubreobjetos en H<sub>2</sub>O destilada por 2 minutos. La solución de Fluoro-Jade fue preparada de un stock de 0,01% de Fluorjade B <sup>205</sup>(Histo-Chem Inc. Jefferson AR). Para obtener 100ml de solución, 4ml de Stock de Fluorjade B fueron mezclados con 96ml de 0,1% ácido acético. Esto resulta en una concentración final de 0.0004%. Las



secciones luego fueron visualizadas por epifluorescencia usando luz azul (450 – 490 nm) en un microscopio Axiophot Zeiss. El Fluor Jade-B tiene un pico de emisión a los 450nm y de excitación a los 530nm.

### **Inmunofluorescencia**

El protocolo de GFAP es el mismo que el detallado en el capítulo anterior.

### **Visualización del núcleo neuronal (NeuN)**

Secciones de cerebro fueron incubadas en flotación, primero con Tx-100 3% diluido en PBS 10 mM durante 30 minutos y luego con suero normal de cabra al 10 % (Sigma, St. Louis, MO, USA) en PBS 10 mM Tx-100 al 0.2% por 1hr a temperatura ambiente. A continuación se los incubó con un anticuerpo anti-NeuN hecho en ratón (1:500; Millipore, Massachusetts, USA) con Tx-100 al 0.2% a 4 °C en agitación por 48 horas. Las secciones fueron lavadas varias veces con PBS 10 mM e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo de cabra IgG anti-ratón conjugado con Alexa 594 (1:250 ; Invitrogen Corporation, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Finalmente, luego de varios lavados con PBS, las secciones fueron montadas en portaobjetos y cubiertas con glicerol-PBS (3:1).

Todos los anticuerpos fueron diluidos en PBS 10 mM; y los controles negativos fueron realizados siguiendo el mismo procedimiento pero omitiendo los anticuerpos primarios.

### **Visualización del endotelio (Lectinas)**

La lectina de tomate, *Lycopersicon esculentum* (LEA) es un efectivo marcador de endotelio para el estudio de la vasculatura del sistema nervioso central. LEA se une selectivamente a los glucoconjugados concentrados en el glicocalix y en la membrana basal.

Los cortes fueron incubados 24 horas en flotación con LEA-Biotinilada (Sigma, St. Louis, MO, USA) en una concentración de 10ug/ml con 0.3% de TX-100 a 4 ° C en agitación. Transcurrido ese tiempo se lavaron los cortes varias veces PBS 10 mM. Luego se incubó con Streptavidina-Texas Red RPN 12334 (GE healthcare, Suecia) en un concentración de 1:100 con 0.3% de Tritón X-100 durante 1 hora a temperatura ambiente.

Finalmente, luego de varios lavados con PBS, las secciones fueron montadas en portaobjetos y cubiertas con glicerol-PBS (3:1).

Todos los anticuerpos fueron diluidos en PBS 10 mM; y los controles negativos fueron realizados siguiendo el mismo procedimiento pero omitiendo los anticuerpos primarios.

### **Visualización y procesamiento de las imágenes**

El análisis de los parámetros morfométricos fue realizado con el software libre NIH Image J. Se obtuvo el Mean Gray Value como medida de intensidad de la inmunomarcación. Para el caso de LEA, además de la intensidad, se calculó el número de partículas (estructuras de la microvasculatura) inmunodetectadas y el

tamaño de las mismas. Para ello, las imágenes fueron transformadas a una escala de grises de 8 bits y se seleccionó un umbral de marcación que minimizara el background. Una vez determinado dicho umbral, se indicó el tamaño mínimo y máximo esperado para las estructuras y se procedió a la identificación de las estructuras usando el software.

El programa Adobe Photoshop fue utilizado para visualizar y editar las imágenes.

## **Estudios Comportamentales**

### **Características generales**

El objetivo es determinar y cuantificar el efecto de dosis subletales en la acción de la toxina Shiga en el comportamiento de roedores. Los experimentos determinarán el efecto de la Stx2 principalmente en lo que concierne a memoria y actividad motora.

Experimentos realizados en la primera parte de la tesis indicaron que la toxina administrada intracerebroventricularmente afecta las neuronas de la corteza y el hipocampo lo que nos llevó a pensar que esto inevitablemente trae aparejado un deterioro en la memoria a largo o corto plazo.

En la clínica, los niños con encefalopatía pueden presentar convulsiones, tanto generalizadas como localizadas.

No existen experimentos comportamentales previos en roedores que indiquen el efecto de dosis subletales de la toxina shiga, por lo cual este es el primer trabajo

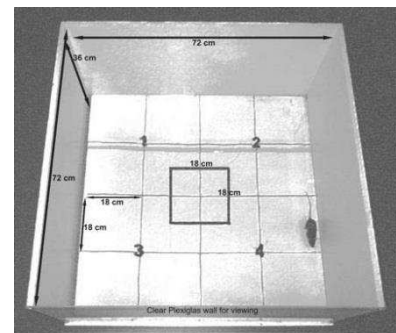
en reportarlo. Estos experimentos fueron realizados en colaboración con Ghuillerme Gomes, Carlos Melo y Maribel Antonello-Rubin del Laboratorio de Neurofarmacología, UFSM, Brasil.

### **Inyecciones Intravenosas en Campo Abierto, Mazo Elevado, Rotarod y Reconocimiento de Objetos**

Los animales fueron inyectados con dos dosis de Stx2 como en la primera parte de la tesis, pero se decidió evaluar una dosis 10 veces menor (indicada como 1:10 dsStx2), debido que la dosis subletal utilizada previamente, los ratones presentaban problemas motrices y esto hacía que no se pudiera evaluar los otros parámetros como la memoria. Todos los tests fueron realizados 4, 7 y 20 días después de la primera inyección con Stx2.

#### **Campo Abierto (Open Field)**

Este test se llevó a cabo para identificar los problemas motores que pueden influenciar luego la performance en los tests subsiguientes, ya que si los animales tienen problemas motores no podrán cumplir las tareas del test de Reconocimiento de Objetos.

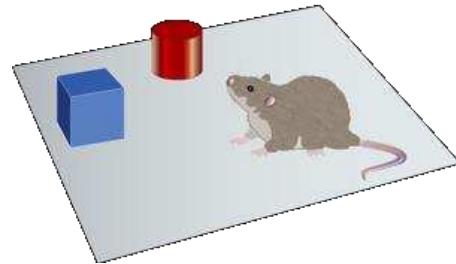


4, 7 y 20 días después de la primera inyección con Stx2 los animales fueron transferidos a un Campo Abierto (56 × 40 × 30 cm, con el piso dividido en 12 cuadrados midiendo 12 × 12 cm cada uno). La sesión de Campo Abierto duró 5

minutos y durante ese tiempo el observador registró manualmente el número de cruzamientos y de levantamientos (rearing).

### **Reconocimiento de Objetos (Object recognition)**

Se realizó el experimento de Reconocimiento de Objetos según Wang y colaboradores luego de la inyección inicial con Stx2<sup>206</sup>. Los



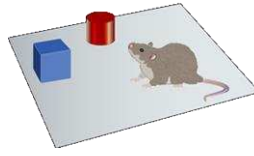
animales son puestos en un aparato y se les permite explorar un objeto. Luego de este intervalo el animal es vuelto a poner en la caja con un objeto nuevo y el otro que ya le es familiar. El reconocimiento de objetos se distingue a medida que pasa más tiempo interaccionando con el objeto nuevo. La tarea de reconocimiento de objetos es una tarea compleja y afecta no sólo un área sino varias, hipocampo, lóbulo temporal, amígdala. <sup>207</sup>

La tarea de reconocimiento de objetos fue realizada en una cámara de madera de 30x30x30 cm, con las paredes pintadas de negro, la parte del frente hecha de Plexiglas y el piso cubierto de EVA (etil vinil acetato). Una luz colgando a 60cm del aparato de comportamiento proveyó de una iluminación constante de 40 lux y el aire acondicionado proveyó de un ruido de background constante. Los objetos usados fueron ladrillos de plástico con diferentes formas y colores pero del mismo tamaño. Con el correr de los experimentos los objetos se usaron en una manera balanceada y los animales no mostraron preferencias por ninguno de los objetos. Las cámaras y los objetos fueron limpiados antes y después de cada experimento

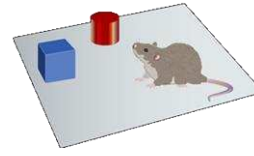
con 30% de etanol.



Habitación



Entrenamiento



Testeo

### Esquema del experimento de Reconocimiento de Objetos

La tarea consistió de habituación, entrenamiento y testeo, cada una con una duración de 8 minutos. En la primera sesión, los ratones fueron habituados al aparato de comportamiento y luego fueron devueltos a su jaula. 24hs después, se realizó la sesión de entrenamiento, donde los animales fueron expuestos a 2 objetos iguales (objeto A), y luego el tiempo de exploración fue registrado con 2 cronómetros.

Se consideró exploración cuando el animal tocaba o alcanzaba un objeto con la nariz a una distancia menor de 2cm. Treparse o sentarse sobre un objeto no se consideró exploración. Al día siguiente, se llevó a cabo la sesión de testeo. Los ratones fueron colocados nuevamente en la cámara de comportamiento y uno de los objetos familiares (por ejemplo el A) fue reemplazado por un objeto nuevo (por ejemplo el objeto B). Se registró el tiempo explorando el objeto familiar y el nuevo. Se calculó un índice de discriminación tomando en tiempo la diferencia entre el tiempo explorando el objeto nuevo y el familiar y eso se usó como parámetro cognitivo: 
$$\left[ \frac{(T_{\text{nuevo}} - T_{\text{familiar}})}{(T_{\text{nuevo}} + T_{\text{familiar}})} \right] \times 100 (\%)$$
.

### Mazo en T elevado (Elevated Plus Maze)

El test sirve para estudiar ansiedad en ratones, sustancias ansiolíticas y ansiogénicas, drogas de abuso y hormonas así como los efectos de la senescencia reproductiva y la exposición a factores de stress, además puede usarse para estudiar el sistema límbico, el hipocampo, la amígdala, etc.<sup>208209</sup>.



El aparato consiste en 2 brazos abiertos de 30x5cm y 2 brazos cerrados (30x 5 x 15 cm) ubicados 40cm sobre el suelo. La unión de los 4 brazos forma una plataforma cuadrada (5 x 5 cm).

Previo al test los ratones recibieron las inyecciones de Stx2 o solución fisiológica en los diferentes tiempos. Cada animal se ubicó en la plataforma central mirando los brazos abiertos y le fue permitido explorar libremente por 5 minutos. Los parámetros comportamentales fueron el número de entradas a los brazos abiertos y el porcentaje de tiempo pasado en los brazos cerrados y abiertos.

### Rotarod

Experimento para medir la actividad motriz y la coordinación inducida de los animales<sup>210</sup>.

El aparato consiste de una barra giratoria (de



3.7cm de diámetro) dividida en 5 compartimentos separados que se sitúa a una altura de 25cm y rota a una velocidad fija de 8 rpm. Los animales fueron entrenados 24hs antes del testeo. En el día del testeo, los animales fueron inyectados con Stx2 o solución fisiológica, luego en los diferentes tiempos (4, 7 y 20d) fue realizado el test. En cada sesión se registró la latencia a la primera caída y el número total de caídas en un periodo de 4 minutos.

### **Análisis Estadístico de los Tests Comportamentales**

Los resultados se expresaron como la media $\pm$  SEM. Se usó el test de Student y ANOVA cuando corresponde. La significancia estadística se muestra con un asterisco en la mayoría de los gráficos.

### **SHIRPA**

Los parámetros conductuales y funcionales se evaluaron a 2, 4 y 8 días utilizando una batería de exploración llamada SHIRPA (SmithKline/ Harwell/ Imperial College/Royal Hospital/ Phenotype Assessment). El SHIRPA fue concebido como una multi-prueba general de aspectos conductuales en la que se utiliza materiales y normas estandarizadas, si bien no permite cuantificar los cambios el protocolo incluye alrededor de 44 pruebas conductuales organizadas en diferentes categorías funcionales<sup>211</sup>.

El Shirpa se realizó administrado la dsStx2 o vehículo. Sólo se muestran los datos relacionados con los parámetros motrices.

Se realizaron tres experimentos con 12 ratones por tratamiento. Los animales se ubicaron en cajas individuales y se registró el comportamiento espontáneo durante 5 minutos sin molestar al animal (ejemplo: si el animal tenía actividad vigorosa, moderada o nula), elevación pélvica (si los animales podían elevar su



cuerpo más de 3mm del eje horizontal) y movimientos en las patas (si el animal tenía actividad normal o actividad limitada). A cada animal se le asignó un score basado en su capacidad motora en los tests. La actividad normal (actividad vigorosa, postura correcta, cuerpo no desviado del axis y actividad en las patas normal) se les dio un score de 0, y las respuestas anormales se les dio un score de 1. Para calcular el score SHIRPA:

$$(\text{Sum (respuesta anormal comportamental)} / N) / + SD$$

Donde N es el número de experimentos, 4.

## Resultados

### Administración endovenosa de Stx2

Se caracterizó el efecto de Stx2 purificada en una o dos dosis y con diferentes concentraciones sobre la supervivencia de ratones.

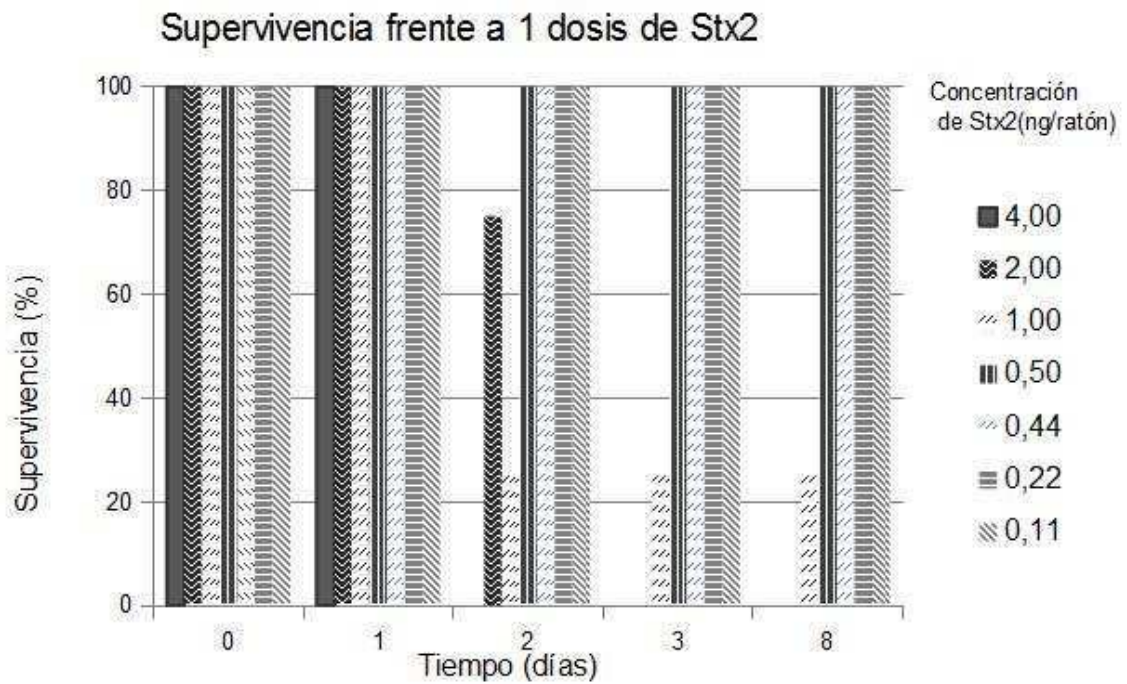
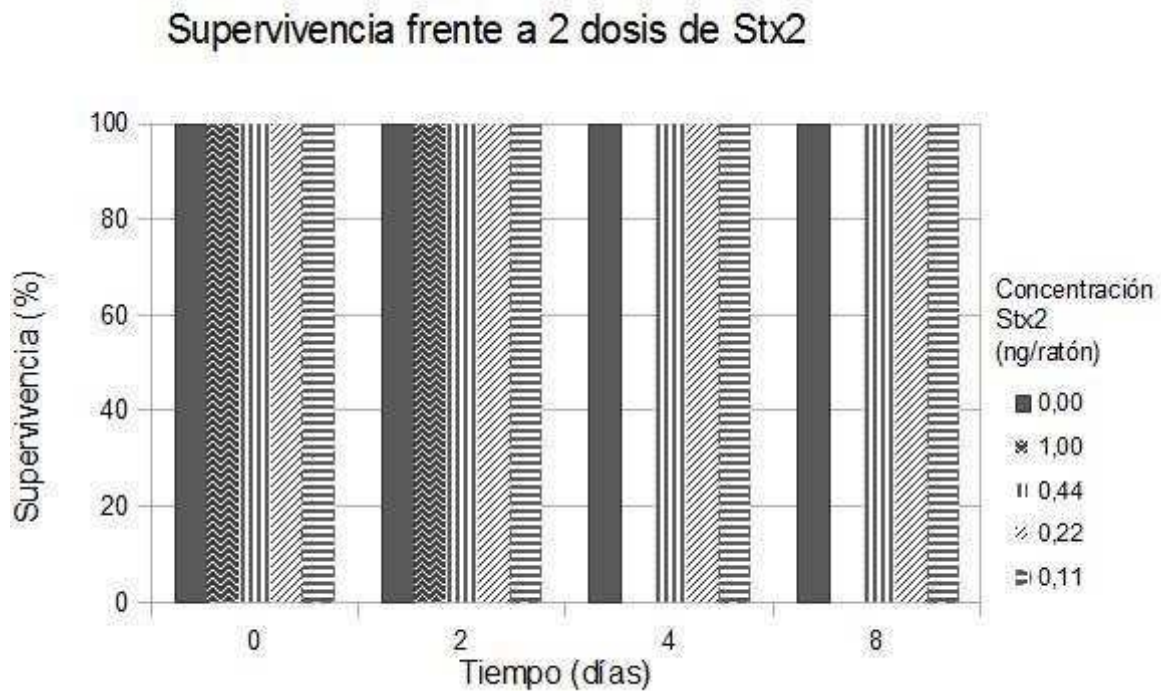


Fig 16. Supervivencia de ratones frente a una sola administración de Stx2



**Fig 17. Supervivencia de ratones frente a dos administraciones de Stx2.**

La segunda dosis se inyectó a las 24hs de la primera. Todos los ratones sobrevivieron 0,44ng, 0,22ng y 0,11ng sobrevivieron al menos 8 días.

El 100% de los animales sobrevivieron con dos inyecciones de 0,44ng de Stx2. Decimos usar 0,5ng, por lo que consideramos esta cantidad como la dosis subletal a utilizar y la cual usamos en todo este trabajo cuando hablamos de dosis subletal o sea 0,25ng/ratón, en total 0,5ng con las dos dosis.

Cuando en los experimentos comportamentales hablamos de 0,1 dsStx2, significa 0,05ng por ratón.

El objetivo de inyectar dos dosis separadas por 24hs de la dosis subletal es tratar de simular una infección por STEC en el cual no se produce mortalidad pero si durante un periodo de tiempo la bacteria produce Stx2. Además establecer si se

produce daño en las infecciones que se producen por STEC y que no llegan a ser letales para los individuos.

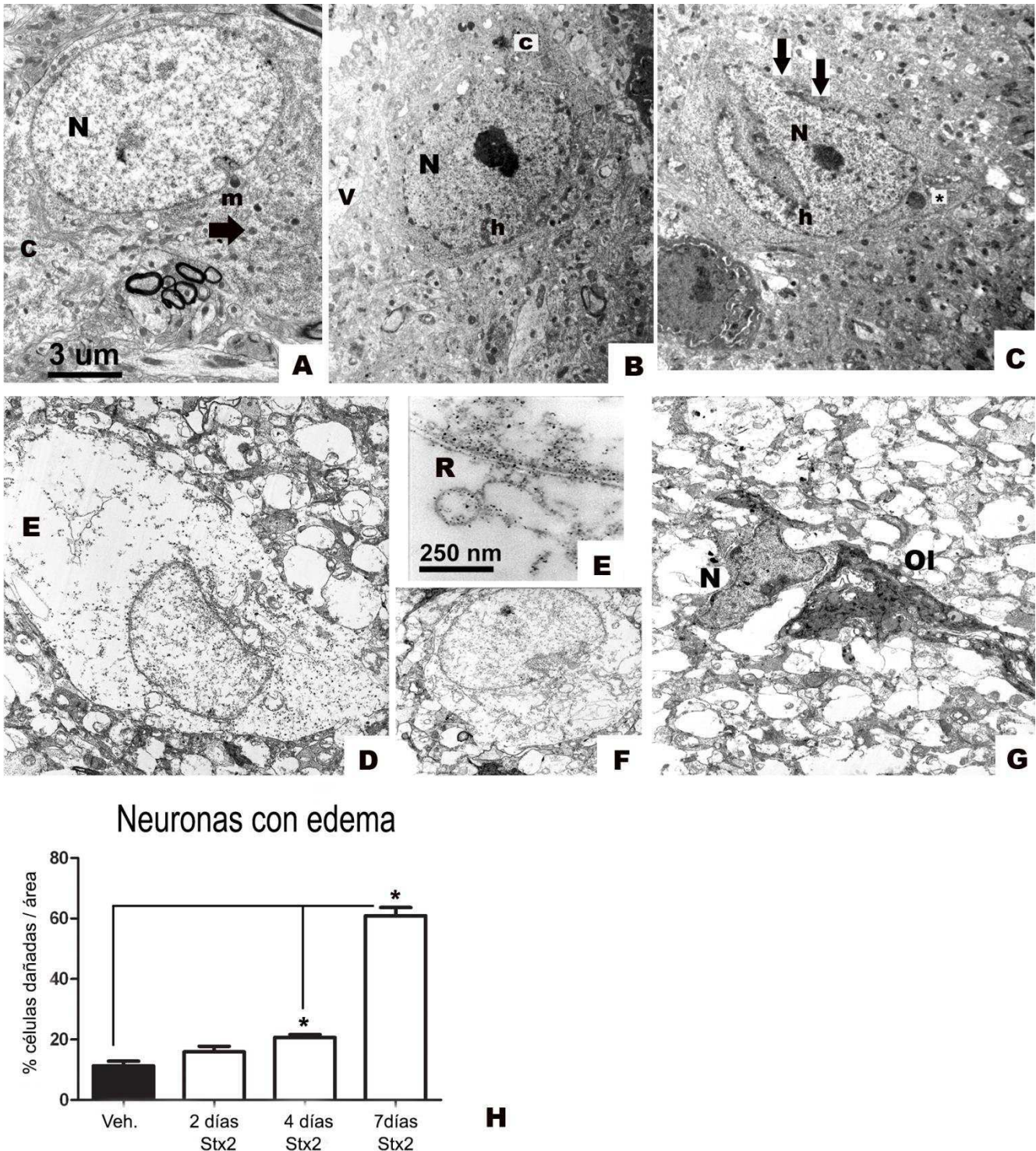
En nuestro análisis nos centramos principalmente en el estriado e hipocampo. En estriado debido a que las alteraciones de los ganglios basales son predominantes en las lesiones del CNS con SUH y en el hipocampo, debido a que hallamos problemas en la memoria de los ratones.<sup>212213214215</sup>.

### **La administración de Stx2 produce degeneración neuronal**

Las neuronas de los ratones vehículo tienen un núcleo pálido y presentan la cromatina dispersa, las membranas citoplasmáticas y nucleares intactas, así como también mitocondrias en buen estado en el citoplasma. En contraste en los animales que recibieron las 2 dosis endovenosas de dsStx2 se observaron neuronas estriatales en condición de neurodegeneración. Luego de 2 días el citoplasma comenzó a vacuolarse y mostrarse más contrastado que el vehículo. Los núcleos del día 2 y 4 en los ratones tratados con dsStx2 aparecen electro condensados con un aumento de la heterocromatina y lo que parece ser una etapa temprana de apoptosis neuronal. En estas neuronas se observa además mitocondrias alteradas dentro de un citoplasma oscuro y condensado. Además desde el día 2 se observan las membranas nucleares y citoplasmáticas alteradas. La pérdida de las membranas puede verse como un signo característico del daño neuronal, característica que sólo puede observarse por microscopía electrónica.

Las indentaciones de la membrana nuclear se encontraron frecuentemente en el día 4 comparadas con las tratadas con vehículo. Los cambios observados en este

periodo reflejan la condición patológica ya que la indentación nuclear correspondería al comienzo del proceso apoptótico (Fig.18 A).



**Fig 18: La administración intravenosa de Stx2 causa daño neuronal.**

Se observa una neurona estriatal normal en el vehículo (salina) en (A), un núcleo pálido (N), el citoplasma intacto (c) y membranas (m). Luego de 2 días de tratamiento con Stx2 la neurona empieza a vacuolizarse con el citoplasma contrastado (c) y núcleo (N) (B), también se observa la condensación de la heterocromatina (h). Luego de 4 días, el núcleo (N) presenta más contraste con un aumento de la condensación heterocromatina (h) y una pérdida de membranas (flechas) (C). Además, se muestra una mitocondria perinuclear (\*) (C). En el día 8 se observa una neurona con edema y pérdida de su forma nuclear regular (D). Una magnificación más alta muestra un retículo endoplasmático desorganizado (R) en un citoplasma con edema (E). Una neurona con edema (E) pierde su forma regular en el núcleo (F). Los núcleos neuronales afectados (N) con forma irregular sin citoplasma aparente; (Ol, oligodendrocito) (G). Estas características no se observaron en las neuronas estriatales del vehículo (A). El porcentaje de neuronas dañadas con edema se cuantificó (H). Se obtuvieron resultados significativos a partir del día 4. El máximo número de neuronas con edema se observe en el día 8 (\*) (H). Los resultados se expresan como un porcentaje del total del número de neuronas en un área de 3721  $\mu\text{m}^2$ . Los datos son el promedio + SEM de 6-8 experimentos (F y G). La significancia estadística se indica con un asterisco,  $p < 0.05$ . La barra de escala mostrada en A se aplica a las micrografías B-D y F, G.

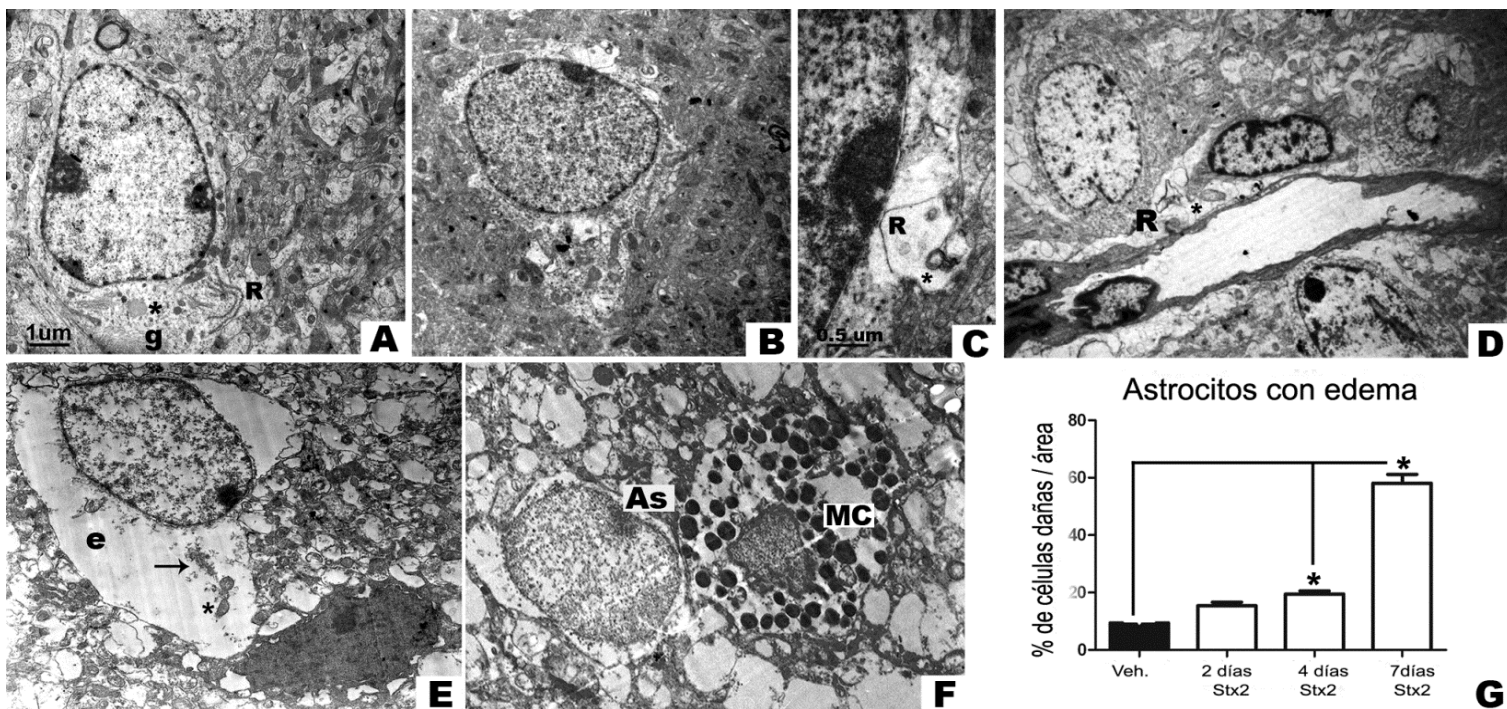
En el día 8, la observación más predominante incluye neuronas con edema citoplasmático y núcleo condensado o en estado de necrosis. Alteración completa del retículo endoplasmático, organelas y mitocondrias en aquellas células donde se detectó edema (Fig. 18 B, C). Una característica común entre los períodos analizados fue que la mayor cantidad de edema celular se encontró en el día 8 ( $p < 0.05$ ).

Estos resultados muestran que 2 dosis subletales endovenosas gatillan el daño neuronal que produce necrosis en neuronas del estriado.

### **La administración de dsStx2 causa edema en astrocitos e infiltración de mastocitos**

Se observaron astrocitos normales en los ratones inyectados con vehículo,

generalmente encontrados con mitocondrias, retículo endoplasmático rugoso, aparato de Golgi, vesículas pequeñas y filamentos gliales (Fig. 19 A). Por el contrario desde el día 2 se observaron astrocitos alterados en los ratones bajo el efecto de Stx2 (Fig. 19 B). Alrededor del 20% de los astrocitos observados mostraron edema de algún tipo. Esto fue acompañado por una evidente desorganización del retículo endoplasmático y mitocondrias hinchadas. Sin embargo la membrana nuclear permanece intacta (Fig. 19 BC).



**Fig. 19: La administración intravenosa de Stx2 causa edema astrocitario y extravasación de mastocitos.**

Una micrografía electrónica muestra los astrocitos conservados luego de la administración del vehículo (A). Mitocondrias en buen estado (\*), retículo endoplasmático (R) y gliofilamentos (g). Luego de 2 días, los astrocitos muestran edema citoplasmático (B). Retículo endoplasmático desorganizado (R) y mitocondrias hinchadas (\*) (C). Luego de 4 días, el edema astrocitario era evidente en la perivascularura (D). El retículo endoplasmático se encuentra desorganizado (R) y las mitocondrias hinchadas (\*) con las membranas internas desorganizadas. Luego de 8 días una astrocito alterado muestra edema citoplasmático (e), el retículo rugoso desorganizado (flecha) y mitocondrias con las membranas rotas (\*) (E). Un oligodendrocito conservado se anota. Además se observa la extravasación de un mastocito en contacto con astrocitos (F). El porcentaje de astrocitos dañados con edema se cuantificó (G).

Resultados significativos se obtuvieron a partir del día 4. El número máximo de astrocitos con edema en ratones tratados con Stx2 se obtuvo al día 8 (\*). Los resultados se expresan como el porcentaje total de astrocitos en un área de 3721  $\mu\text{m}^2$ . Los datos son la media + SEM de 6-8 experimentos (G). La significación estadística se muestra con un asterisco,  $p < 0.05$ . La barra de escala en A aplica para las micrografías en A, B, D-F.

A partir del día 4, se observa edema perivascular astrocitario (Fig. 19 D), desorganización de las endomembranas y mitocondrias en el citoplasma edematizado, sin embargo la membrana nuclear se conserva intacta (Fig. 19 D). En el día 8, se observó la pérdida de elementos nucleares electrodensos que migraron al citosol probablemente debido a la ruptura de la membrana nuclear y organelas hinchadas en un citoplasma con edema (Fig. 19 E).

La principal característica que pudimos observar a lo largo de los días fue el edema citoplasmático (Fig. 19 B-F). El porcentaje de astrocitos que mostró edema fue cuantificado luego de 2, 4 y 8 días de tratamiento con Stx2. El porcentaje de astrocitos que mostraron edema se incrementó un 60% al día 8 y esto fue significativamente más alto que los vehículos o que los ratones inyectados con Stx2 analizados al día 2 y 4 (Fig. 19 G). Por lo que podemos concluir que Stx2 gatilló el daño astrocitario en el estriado.

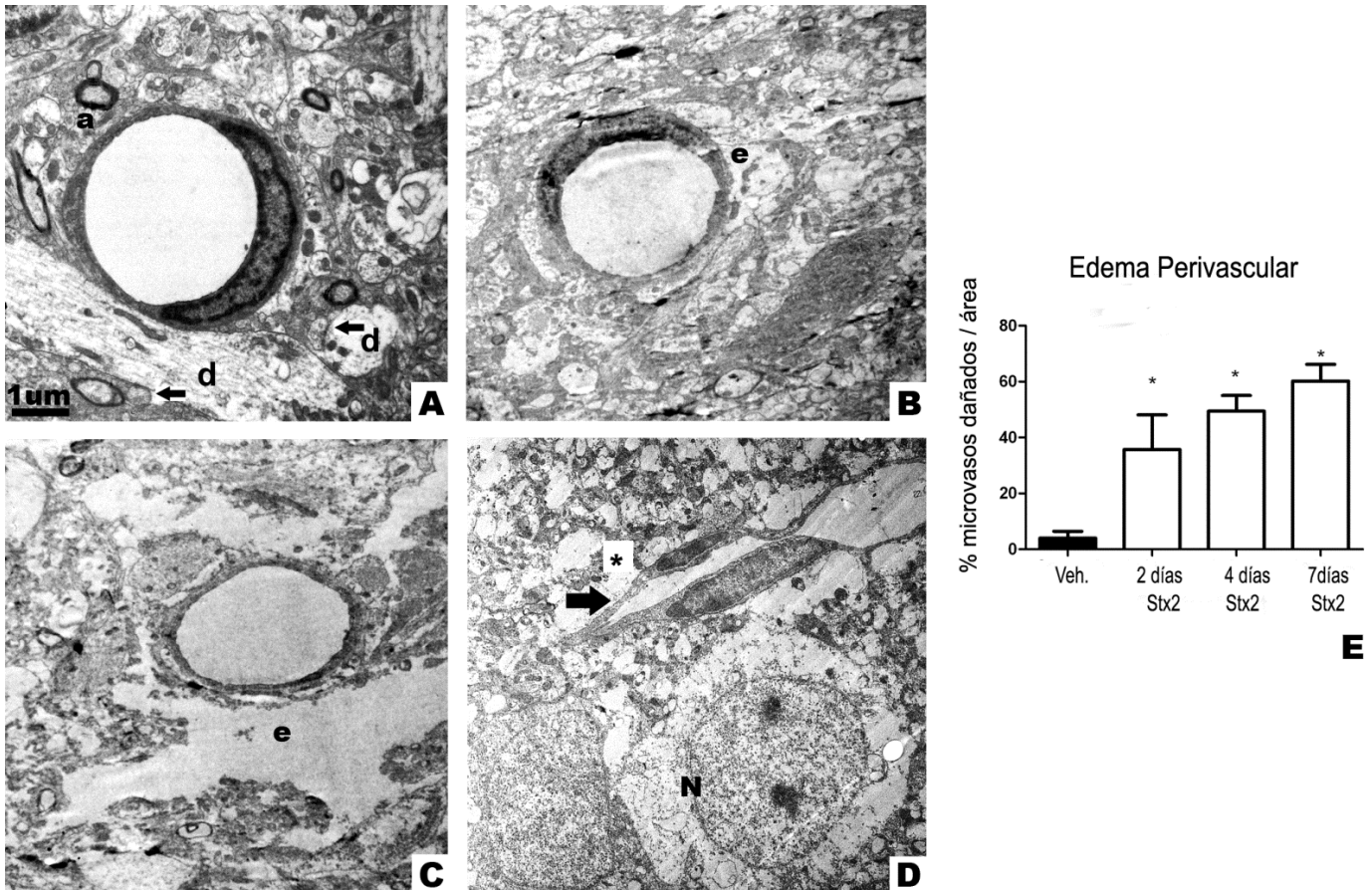
Además se observó la extravasación de mastocitos al parénquima cerebral (Fig. 19F). Los mastocitos se identifican por ultraestructura debido a que tienen numerosos gránulos no laminados en comparación con los basófilos. Los mastocitos pueden atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) para llegar al parénquima cerebral atraídos por mecanismos inflamatorios luego de la injuria por Stx2.



Observamos un mastocito en contacto con un astrocito (Fig. 19C). Los mastocitos son la respuesta temprana en la regulación de los cambios agudos en la barrera hematoencefálica luego de isquemia y hemorragia.

### **Stx2 altera la integridad de la barrera hematoencefálica**

En el estriado de ratones tratados con vehículo observamos un vaso que conserva su núcleo endotelial y citoplasma. Las organelas se encuentran bien preservadas y las mitocondrias muestran su doble membrana. La membrana vascular basal se encuentra cubierta de astrocitos perivasculares, con lo cual podemos decir que la barrera hematoencefálica aparece intacta. Además se observó astrocitos perivasculares intactos en contacto con dendritas y axones recubiertos de mielina (Fig. 20A).



**Fig. 20: La administración endovenosa de Stx2 causa alteraciones en la Barrera Hematoencefálica.**

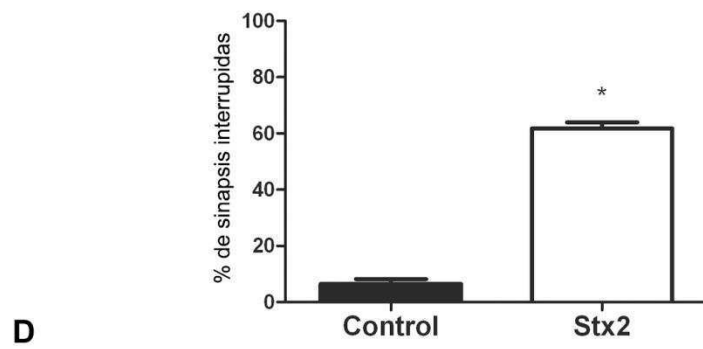
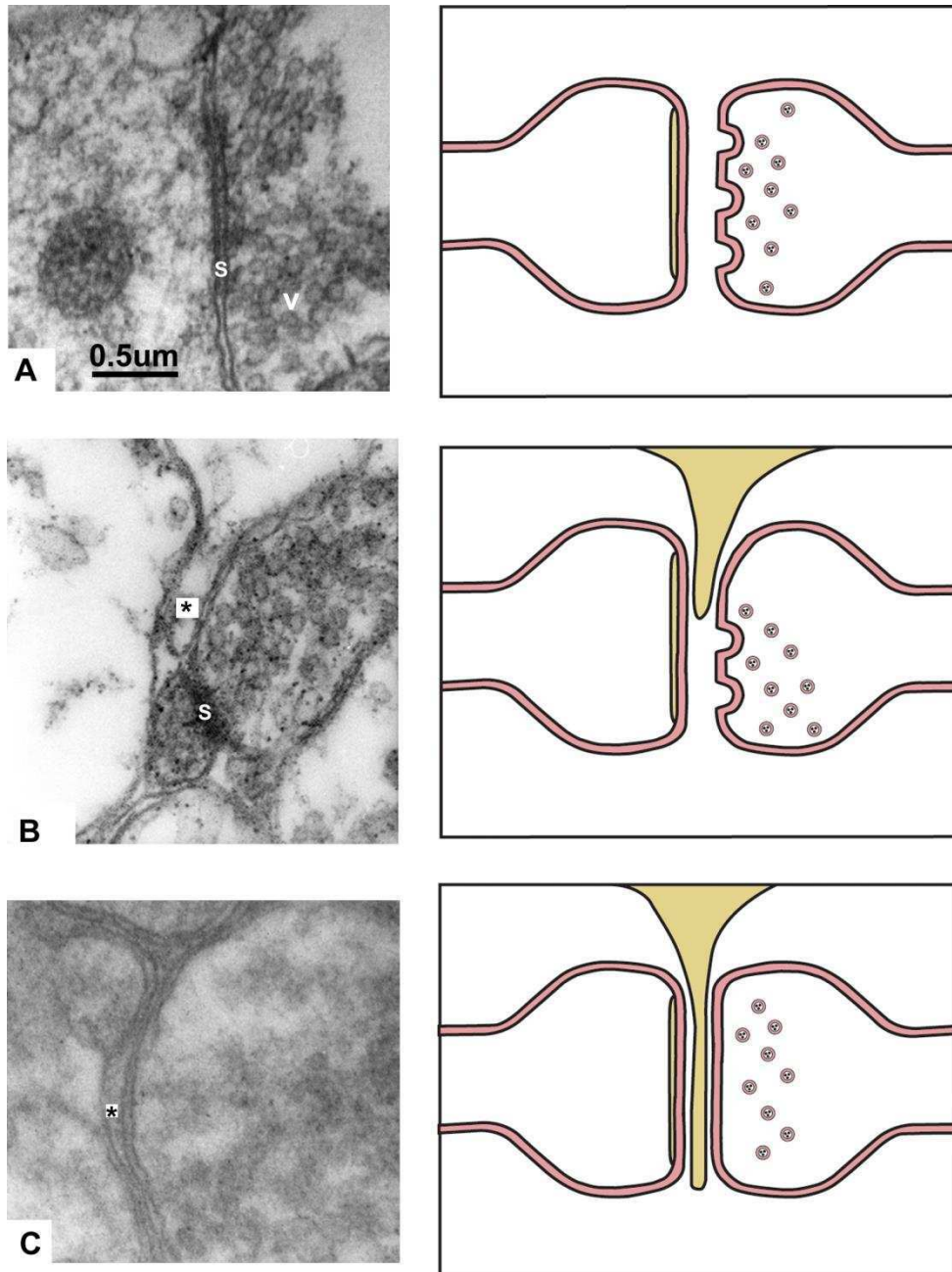
En el vehículo, la micrografía electrónica muestra células endoteliales conservadas que forman un microvaso del estriado, el núcleo endotelial está conservado y el microvaso está rodeado de sinapsis (flechas), dendritas (d) y axones con mielina (a) (A). Luego de 2 días de la administración de Stx2, se observa edema perivascular (e) (B). Luego de 4 días, el edema perivascular es más pronunciado (e) (C). Luego de 8 días de la inyección de la toxina, un microvaso infartado (fleche) con edema perivascular se observa (\*) cerca de una neurona (N) (D). En este punto, no se observa una membrana citoplasmática en la neurona. El porcentaje de microvasos dañados con edema perivascular se cuantificó (E). El daño en los microvasos comienza a ser significativo en el día 2 con un máximo en el día 8 (\*). Los resultados se expresan como un porcentaje del número de microvasos en un área de 3721  $\mu\text{m}^2$ . Los datos son la media + SEM de un set de 6-8 experimentos (G). La significancia estadística se muestra con un asterisco,  $p < 0.05$ . La barra de escala A se aplica a las micrografías B-D.

En el estriado tratado con dStx2 a partir del día 2 se encontró un edema intracitoplasmático en los astrocitos perivasculares (Fig. 20B). A partir del día 2 se observe un edema incipiente en los astrocitos y a partir del día 4 el edema ya era casi completo. En el día 8 se observe edema acuoso con células endoteliales colapsadas (Fig. 20B, C) aunque no se observó daño endotelial celular (Fig. 205B).

Se cuantificó el edema en los astrocitos perivasculares en los ratones con dsStx2 y se encontró un máximo en el día 8. El edema perivascular aumentó a lo largo del tiempo.

#### **3.4.5 La toxina Shiga causa la interrupción de la sinapsis**

En los ratones tratados con Stx2 se observó la interrupción de la sinapsis (Fig. 21). El número de sinapsis interrumpidas fue significativamente más alto en los animales tratados con Stx2. Una proyección de astrocitos reactivos interrumpe la transmisión sináptica entre neuronas interponiéndose entre la pre y post sinapsis (Fig. 21B, C). La sinapsis interrumpida no solo se observe en el estriado de ratones tratados con Stx2, sino que además se observó una disminución en el número de vesículas pre sinápticas (Fig. 21D).



**Fig. 21: La administración intravenosa de Stx2 causa alteraciones sinápticas.**

Una micrografía electrónica muestra una sinapsis normal (s) y las vesículas pre sinápticas (v) en el estriado (A). En la figura B se muestra un número aumentado de vesículas pre-sinápticas juntas con la aparición de procesos astrocitarios (\*) en proximidad con el espacio sináptico (S) en la parte izquierda más baja de la micrografía (B). En la otra micrografía se muestra un astrocito bloqueando completamente el espacio sináptico (\*) mientras que las terminales pre sinápticas están llenas de vesículas (C). Una gráfico en el panel de la derecha ilustra más claramente el proceso que está ocurriendo en el espacio sináptico. El número de sinapsis interrumpidas en el estriado de los ratones tratados con Stx2 es mucho mayor al de los ratones tratados con vehículo (D). La significancia estadística se muestra con un asterisco,  $p < 0.05$ . Los resultados se expresan como un porcentaje del total de las sinapsis en un área de 3721  $\mu\text{m}^2$ . La barra de escala en A aplica para todas las micrografías.

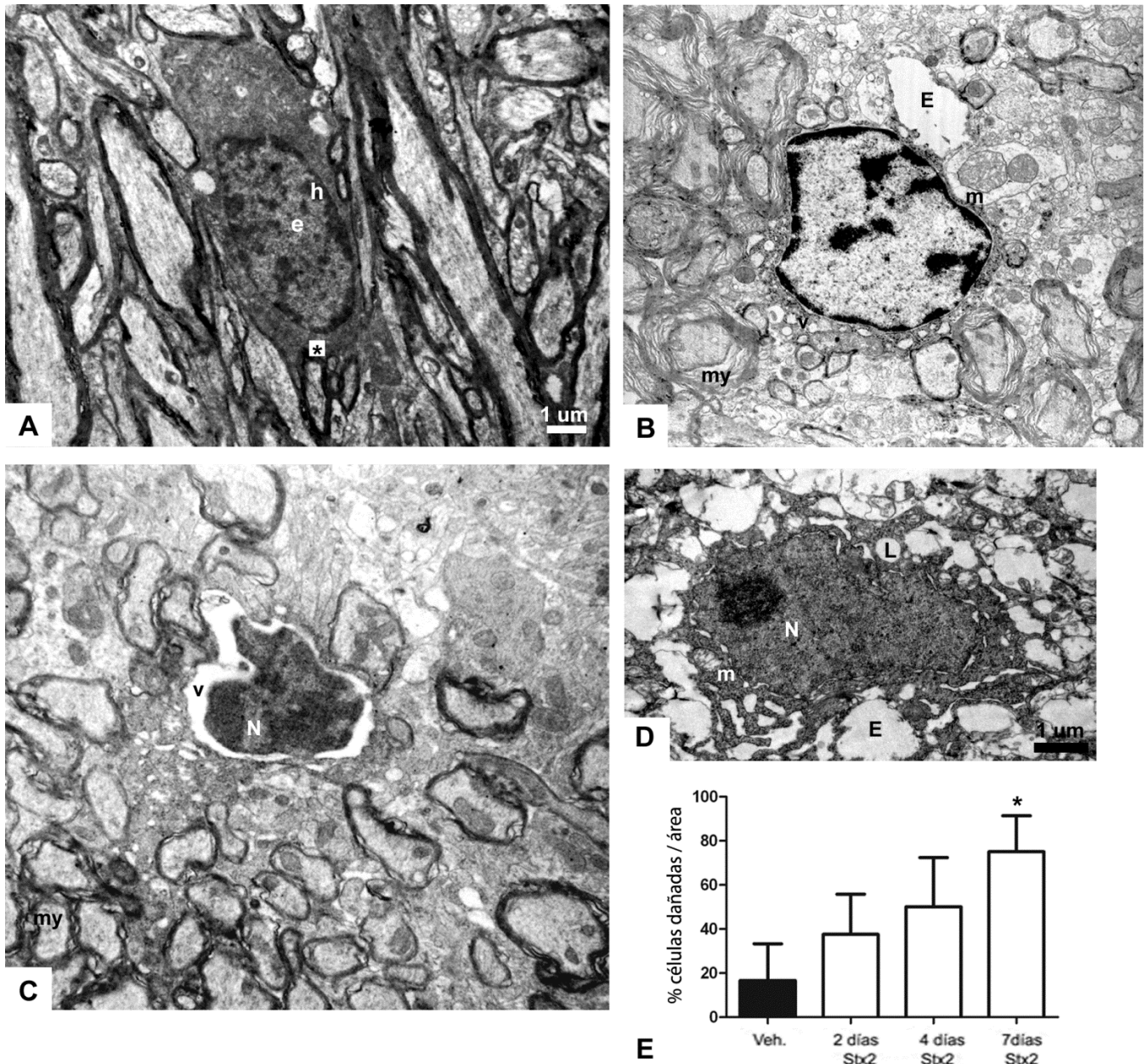
**La administración de Stx2 causa alteraciones ultraestructurales en oligodendrocitos**

En los animales tratados con vehículo se identificaron oligodendrocitos normales, con un núcleo ovalado conteniendo heterocromatina en la periferia del núcleo y el citoplasma electrón denso (Fig. 22A). Luego de 2 días de la administración endovenosa de Stx2, el núcleo de los oligodendrocitos afectados comenzó a presentar una forma irregular, cromatina condensada y una ligera retracción (Fig. 22B) Sin embargo, la envoltura nuclear se conservaba intacta. En la zona perinuclear, se observaba un núcleo electrodenso con vacuolización parcial. Los rasgos ultraestructurales observados sugieren que nos encontramos con los pasos tempranos de la apoptosis. Además, hojas de mielina desorganizada se observaron en probable axones dilatados. En el día 4, se observó una progresiva deteriorización de los oligodendrocitos (Fig. 22C). El núcleo devino más irregular y

se produjo su retracción mientras que se produjo una condensación de la cromatina. Los fragmentos nucleares se observaron también en la zona edematosa. En este punto, la vacuolización perinuclear se extendió a todo el citoplasma electrón denso y la mielina aparecía desorganizada y más delgada que en el día 2. Los axones recubiertos de mielina se observaron irregulares y contrastados.

En el día 9, se observaron oligodendrocitos con el núcleo contrastado y el citoplasma y las barreras cada vez más difíciles de diferenciar (Fig. 22D). La pérdida del volumen celular inmersa en un área edematosa fue la principal característica en esta etapa. Sin embargo, aún se observan las proyecciones citoplasmáticas que asemejaban hojas de mielina cubriendo los axones.

Se cuantificó el daño celular en los días 2, 4, and 8, de acuerdo con el criterio descrito previamente (Fig. 22E). El daño celular se incrementó a lo largo del tiempo. El número de células mostrando daño fue significativamente mayor en el día 8 que en los días 4 y 2.



**Fig. 22. Stx2 causa cambios patológicos en oligodendrocitos.**

En los animales controles se observan oligodendrocitos normales. La mielina se forma en el citosol (\*) (A). La cromatina electrón densa (h) se observa parcialmente en la periferia del núcleo redondeado. La eucromatina (e) se presenta en el interior del núcleo como zonas menos electrón densas. Luego de 2 días se observa un núcleo irregular (B). El citoplasma se encuentra vacuolado (v). La mielina se presenta desorganizada (my). En el espacio extracelular se observa edema (E) y mitocondrias hinchadas. En el día 4 se observa un núcleo hinchado y retraído (N) (C). Además presenta vacuolización perinuclear (v). En el día 8 se observa un oligodendrocito alterado con un citoplasma contratado (D). Se dificulta diferenciar el núcleo (N) del citoplasma. Edema extendido (E) y carencia de mielina (L). Además, se observan mitocondrias con crestas desorganizadas e hinchadas(m). El número de

células con edema se incrementó con el tiempo(E). Los resultados se expresan como un porcentaje del total de oligodendrocitos en un área de 3721  $\mu\text{m}^2$ . Los datos se expresan como el promedio + SEM de 6-8 experimentos. La significancia estadística se muestra con un asterisco,  $p < 0.05$ . La barra de escala en A aplica para B y C.

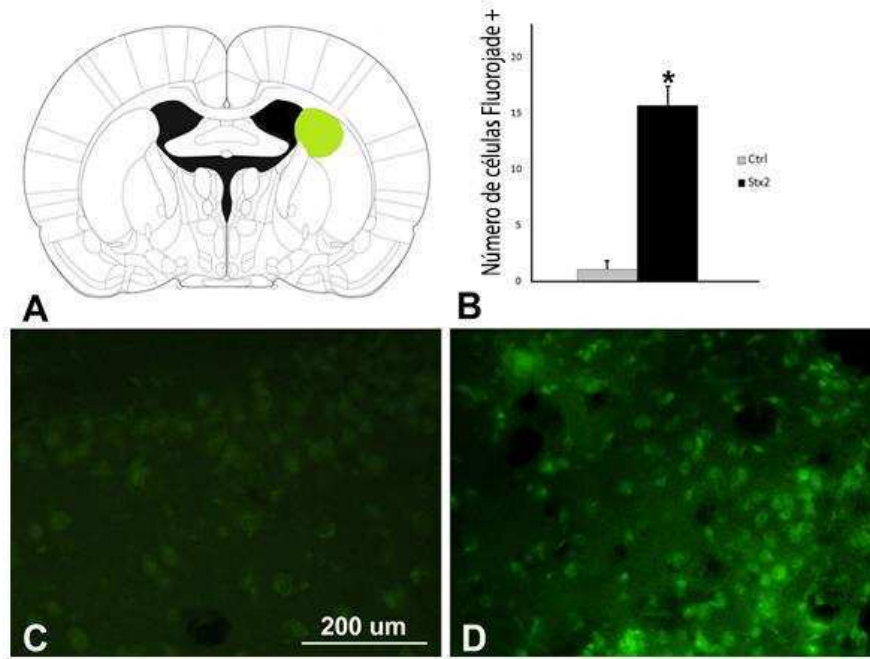
Otras áreas del cerebro como el hipocampo, la corteza y el hipotálamo también mostraron daño y se vieron afectadas por la toxina como el estriado (datos no mostrados)

### **La administración de Stx2 causa neurodegeneración en varias zonas del cerebro**

Para comprobar el efecto neurodegenerativo de Stx2 se utilizó el marcador Fluorojade-B siguiendo el mismo protocolo. De igual modo se observaron neuronas en degeneración en el estriado, hipocampo, hipotálamo y corteza (Datos no mostrados).

Con este marcador pudimos comprobar lo observado por microscopía electrónica y de este modo verificamos que las células se encontraban en un proceso de degeneración.

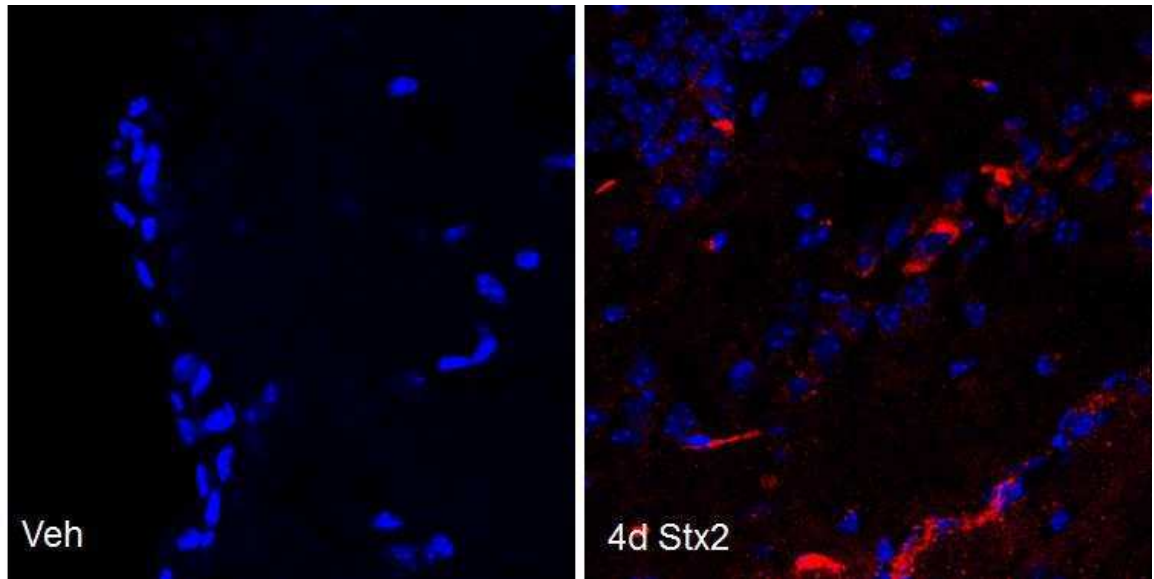




**Fig. 23. Stx2 induce neurodegeneración**

En el panel A se observa el estriado marcado con verde. En panel B se observa la cuantificación de la fluorescencia del Fluorojade de las secciones estriatales analizadas. La significancia estadística se muestra con un asterisco,  $p < 0.05$ . En los paneles C y D se observa una muestra de un animal control y otro tratado con Stx2. Se observa fluorescencia positiva en el tratado lo que indica neurodegeneración. Se utilizaron controles positivos (ratones inyectados con Cloruro de Cobalto) en los cuales se observó fluorescencia positiva como en los tratados con Stx2. Además se observaron neuronas en degeneración en hipocampo, corteza e hipotálamo (datos no mostrados).

**Stx2 se detecta en el hipocampo a 4 días de ser administrada**



**Fig 23: Stx2 se encuentra en las células al 4 día de ser inyectada.**

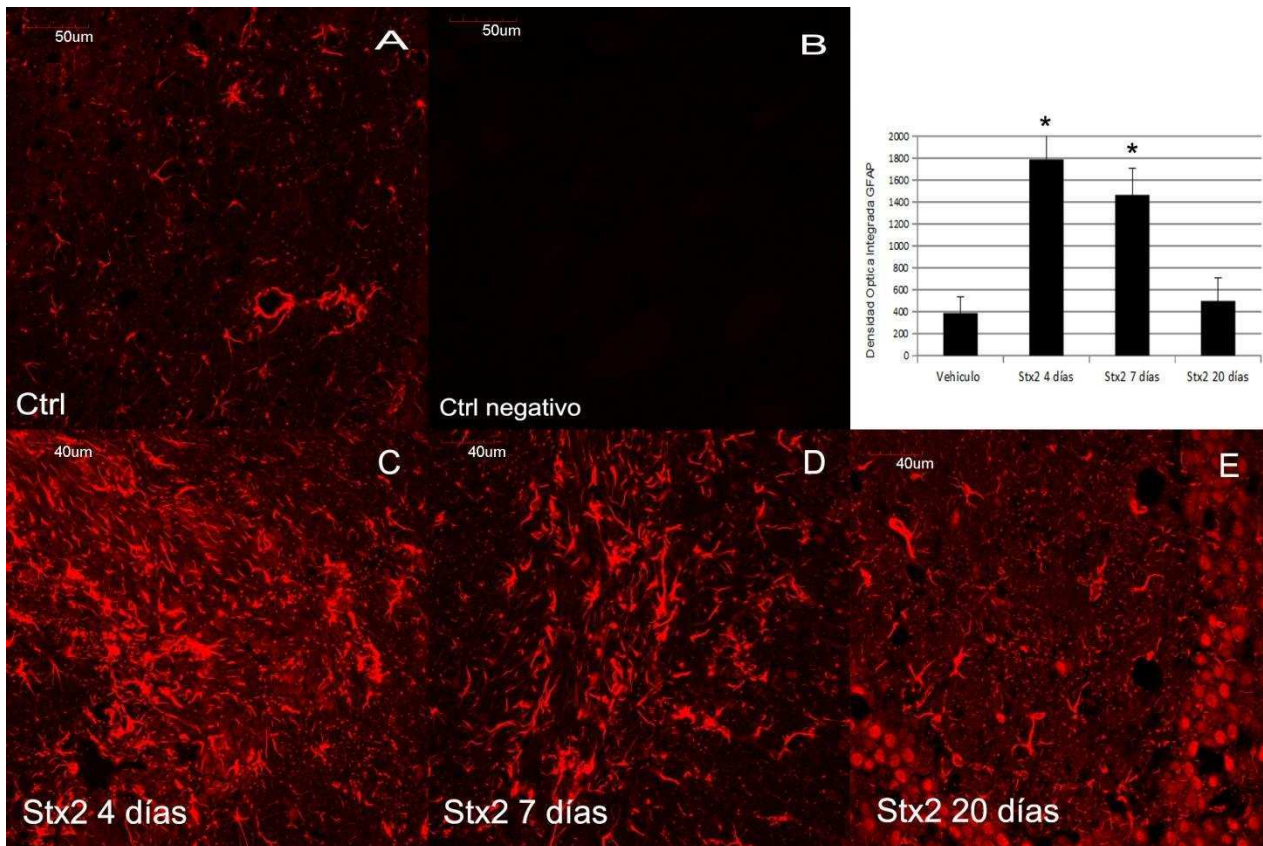
En la figura se muestra una Microscopía Confocal con un aumento de 40x del hipocampo, CA1, donde se inmunolocalizó Stx2B (en rojo), (Azul: Hoechst, marcador del núcleo celular). En el panel de la derecha podemos observar como la toxina se encuentra en el citoplasma celular.

Realizamos una inmunomarcación en hipocampo para estudiar si podíamos detectar la toxina en el mismo. En la Fig. 23 se observa a la toxina Stx2 en ratones con 4 días de tratamiento, en los que se observa inmunomarcación. La inmunomarcación se realizó con el anticuerpo monoclonal Stx2B y se encuentra sólo en el citoplasma. Se usó Hoescht para teñir los núcleos (azul).

### **Stx2 produce reacción astrocitaria**

En el capítulo 2 de esta tesis vimos como la expresión de GFAP, (marcador astrocitario) aumentaba al ser la toxina inyectada intracerebroventricularmente, esto quiere decir que se producía una reacción astrocitaria en las diferentes zonas estudiadas.

Nos preguntamos si el mismo cambio tiene lugar al inyectar Stx2 endovenosamente, por lo cual analizamos la distribución de GFAP luego de administrar Stx2.



**Fig. 25: Stx2 administrada endovenosamente causa un aumento de la expresión de GFAP**

Se muestran las fotos de inmunofluorescencia confocal para GFAP en el hipocampo (rojo). Se muestra vehículo representativo, o sea el estado normal (A), B muestra el control negativo para GFAP y los animales tratados en (B muestra el control negativo para GFAP C-E). Stx2 aumenta la expresión de GFAP (C-D) en el hipocampo. Los controles de isotipo para GFAP no mostraron inmunofluorescencia. Todos los datos fueron confirmados por el análisis de DOI, Densidad óptica integrada, en el cual Stx2 induce la expresión de GFAP (panel de la derecha) a 4 y 7 días, mientras que no se encuentran diferencias significativas a 20 días. Se cuantificó la fluorescencia con el programa ImageJ. Las células además fueron identificadas usando la tinción nuclear Hoechst (no mostrado). El aumento de expresión de GFAP es evidente y se muestra la significancia estadística con un asterisco, ( $p < 0.05$ ). Se realizaron 6 cortes por sección.

En la Fig. 25 observamos la expresión de GFAP en cortes de hipocampo de ratones tratados con dsStx2. Podemos observar que se produce reacción astrocitaria a 4 y 7 días en animales tratados con toxina (Fig. 25 C y D) y que el cambio se revierte a los 20 días (F). Los cambios a 4 y 7 días son estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ).

Por lo que confirmamos que se produce reacción astrocitaria en el hipocampo de ratones inyectados con dosis subletales de Stx2 tan temprano como a los 4 días y el cambio se revierte a los 20 días.

### Stx2 produce un aumento de Gb3

Para analizar si se producía el mismo efecto de regulación positiva que al ser administrada endovenosamente, analizamos la inmunodistribución del receptor Gb3.

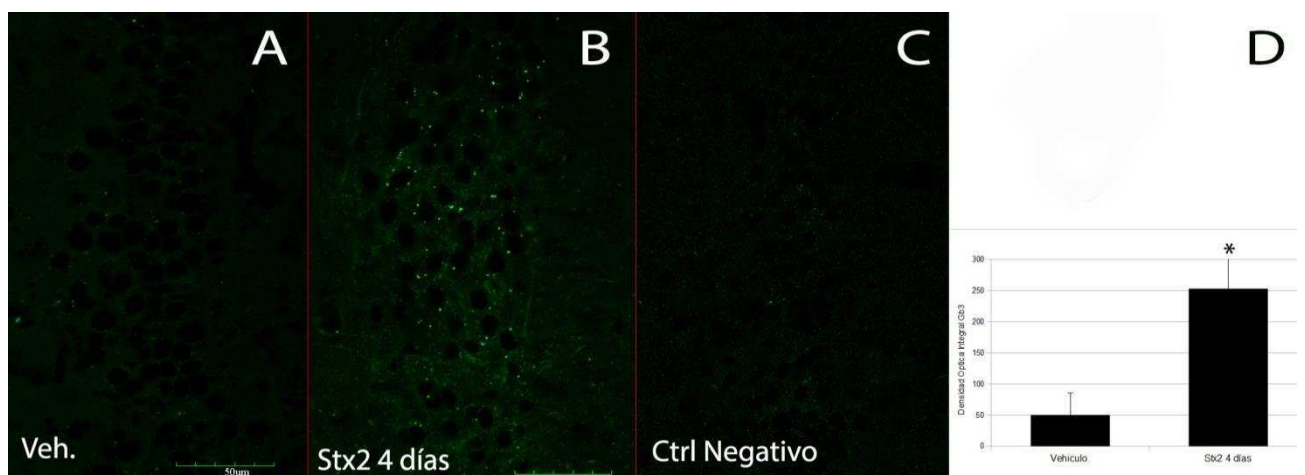


Fig. 26. Stx2 causa el aumento de Gb3 a 4 días de tratamiento

Microfotografías confocales de una inmunofluorescencia anti-Gb3 (Verde) en el hipocampo de ratones (CA3).

En el panel A se observa la expresión basal en animales sin tratar de Gb3 en el hipocampo en la zona CA3. En el panel B se observa la inmunomarcación anti-Gb3 de una animal a 4 días de ser inyectado con la toxina. El panel C muestra el control negativo omitiendo el primer anticuerpo. Los controles de isotipo (no mostrados) no presentaron reactividad. En el panel D se muestra la cuantificación de la intensidad de fluorescencia realizada con el programa ImageJ. La cuantificación es representativa de 6 animales.

La inmunomarcación de la Fig. 26 muestra que Stx2 produce un aumento de la densidad óptica del Gb3 en el hipocampo de ratones (B) lo cual no se aprecia en los inyectados con solución fisiológica (A). Los controles realizados validan el experimento (C y isotipo).

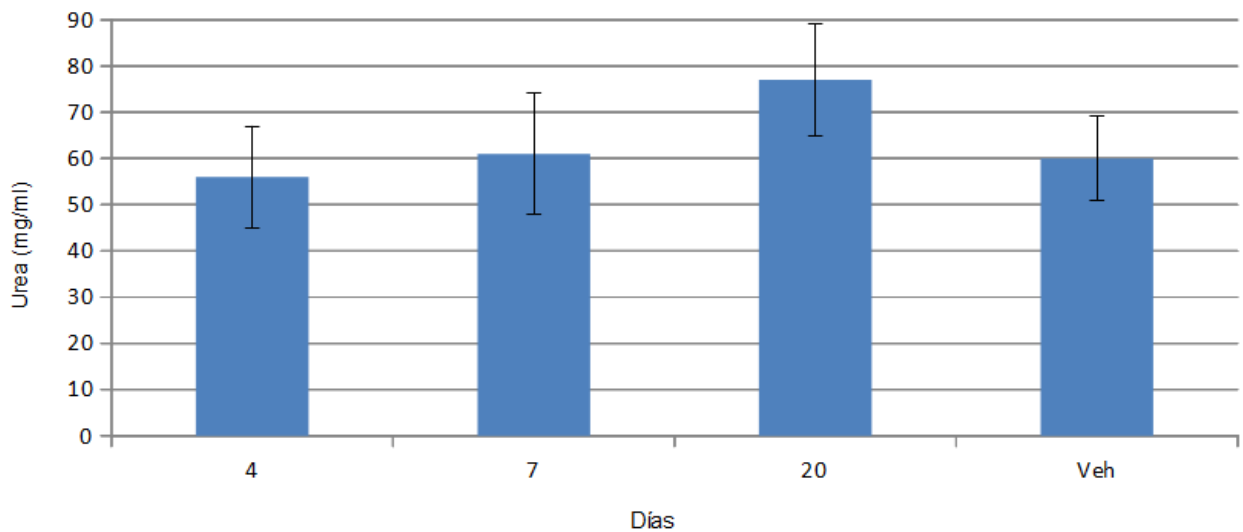
Estos datos prueban que tan tempranamente como a 4 días se produce la activación del receptor de la toxina Gb3 en el hipocampo de ratones al ser esta inyectada endovenosamente.

### **Stx2 en dosis subletales no produce variaciones en el nivel de Urea**

Se analizaron los niveles de urea y creatinina en suero, dos parámetros característicos relacionados con el metabolismo de proteínas que se encuentran alterados durante la infección con Stx2 en seres humanos.

La urea es la forma no tóxica del amoníaco, comúnmente se genera a partir de la degradación de proteínas. Debido a su pequeño tamaño, presenta una reabsorción y secreción variable en el túbulo renal acompañando al agua.

### Contenido de Urea en Ratones con Dosis subletales de Stx2

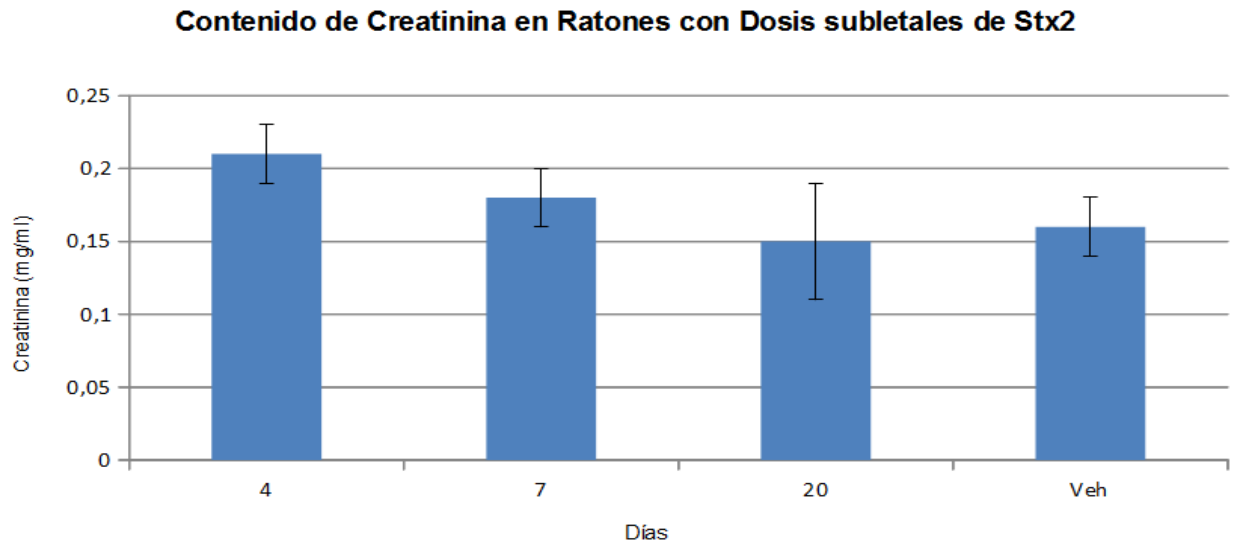


**Fig 27. Stx2 administrada en dosis subletales no produce variación del contenido de Urea.**

Se muestra el contenido de urea (mg/ml) en ratones a diferentes tiempos luego de 2 dosis de Stx2 subletal. No se ven diferencias significativas entre los tratamientos, por lo que el nivel de Urea de los ratones vehículos de 4, 7 y 20 días fue similar.

En nuestro modelo de dosis subletales de Stx2, no se produjo una variación significativa del nivel de urea en suero (Fig. 27), lo cual implica que no hay compromiso renal en ninguno de los tiempos utilizados según este parámetro.

**La toxina Shiga suministrada en dosis subletales no varía el nivel de Creatinina**



**Fig 28. La toxina Shiga suministrada en dosis subletales no varía el nivel de Creatinina**

Se muestra el nivel de creatinina en ratones a 2, 7 y 20 días y en el vehículo. No se hallaron diferencias significativas entre los diferentes días.

El aumento de creatinina plasmática es un indicador de daño renal. La creatinina es una sustancia de origen muscular constituida por tres aminoácidos, la creatinina sufre filtración glomerular pero no se reabsorbe y su secreción tubular es mínima.

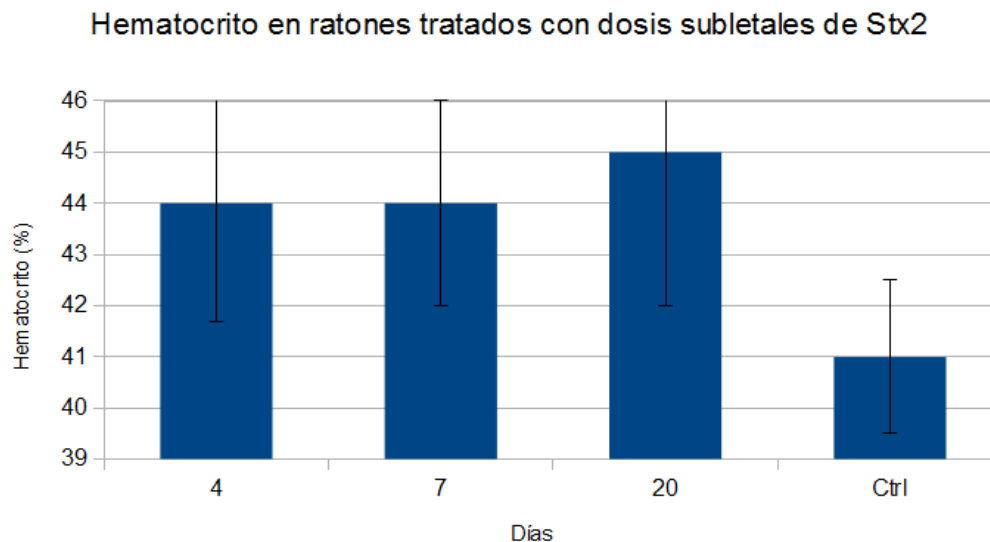
En otros modelos en ratón, con 3 dosis subletales de Stx2 intraperitoneal de 1 ng/kg Stx2 se produce un aumento de la creatinina en suero a partir de las 12-36hs que va del vehículo de 0.4 a 1.4 a las 72hs.<sup>216</sup> En ratones C57BL/6J, una cepa diferente a la usada en estos experimentos.

Si bien en la literatura se reportan medias en el contenido de creatinina como las obtenidas en nuestro estudio<sup>217</sup> no se hallaron diferencias significativas entre los diferentes días y sus respectivos vehículos, indicando que probablemente no

exista el compromiso renal en nuestro modelo.

### La toxina Shiga en dosis subletales no varía el nivel de Hematocrito

El hematocrito es el porcentaje del volumen total de la sangre compuesta por glóbulos rojos. Una caída del hematocrito indica una destrucción de los glóbulos rojos, algo característico del SUH en seres humanos.



**Fig 29. Stx2 en dosis subletales no produce variación del hematocrito en ratones.**

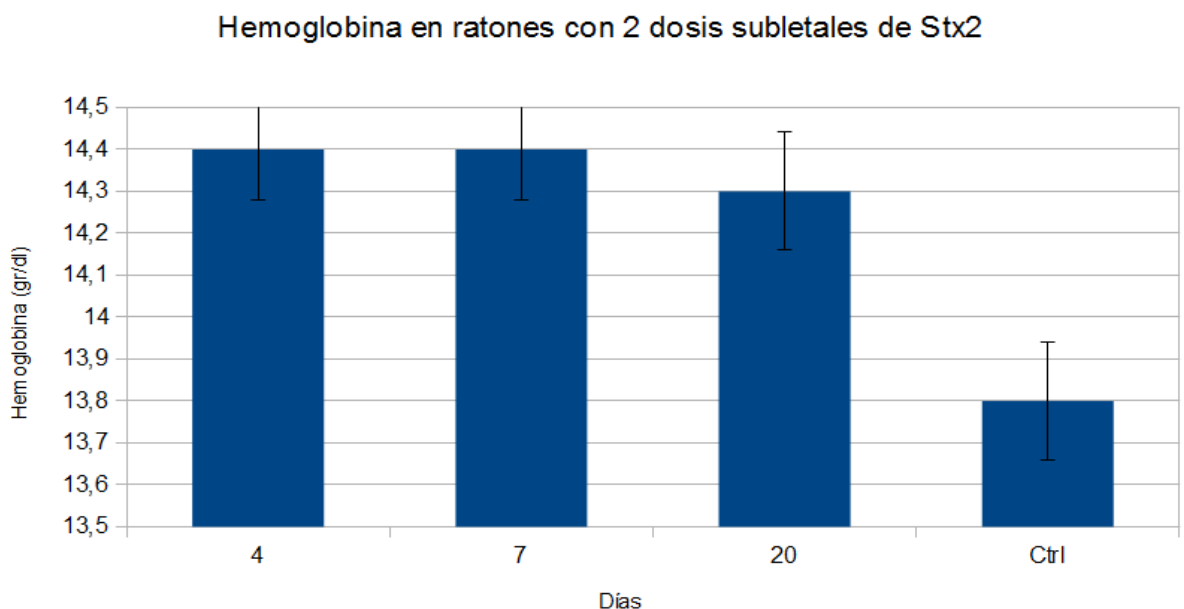
Se muestra el Hematocrito en ratones inyectados con 2DsStx2 a 4, 7, 20 días y el vehículo. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos.

En nuestro modelo de dos dosis subletales no se observó un cambio significativo en los valores del hematocrito (Fig. 29).



### La toxina Shiga suministrada en dosis subletales contribuye en aumentar el nivel de Hemoglobina en sangre

En humanos, la resolución del SUH ocurre 1 o 2 semanas después del inicio de la diarrea. La función renal se resuelve luego de que los niveles de hemoglobina y plaquetas vuelven al nivel basal<sup>218</sup>



**Fig 29B. La toxina Shiga suministrada en dosis subletales contribuye en aumentar el nivel de Hemoglobina en Sangre**

El contenido de Hemoglobina de los ratones tratados con dosis subletales de Stx2 luego de diferentes tiempos. Existe una diferencia significativa entre los controles y los animales tratados con Stx2 ( $p < 0.05$ ). No existen diferencias significativas entre los animales tratados con Stx2 entre sí en los diferentes tiempos.

En los animales tratados con dosis subletales de Stx2 se observó un aumento significativo de la Hemoglobina (Fig. 29B). Las muestras de suero recolectadas de los animales tratados con Stx2 presentaban una leve coloración roja,

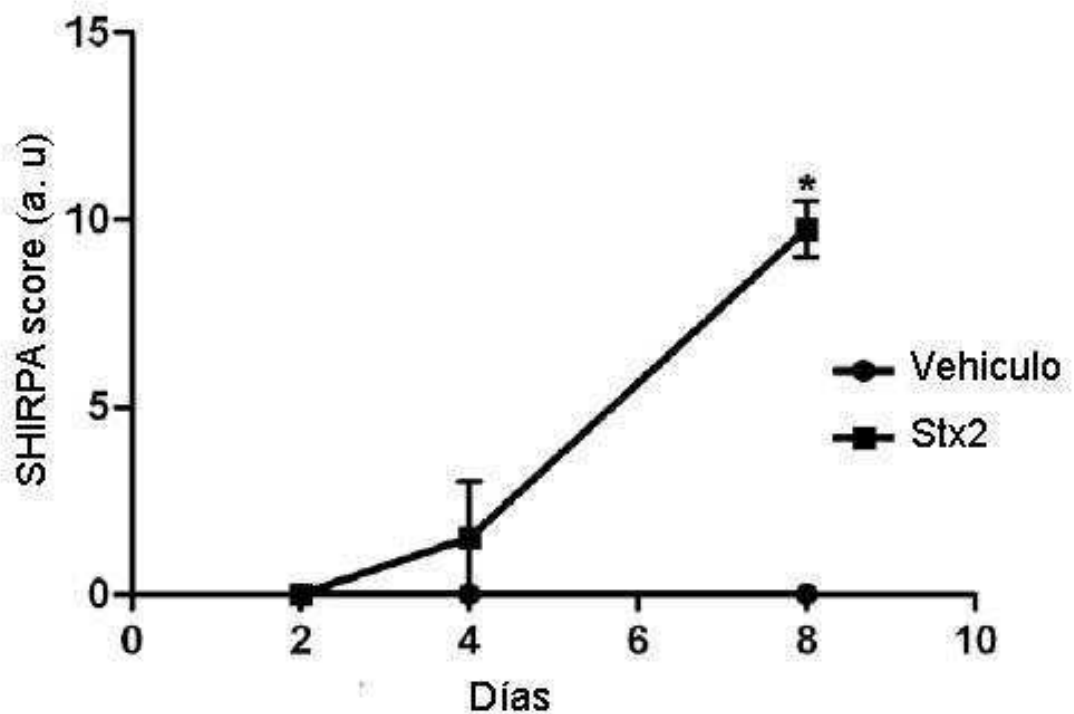
presumiblemente de la hemoglobina liberada por los glóbulos rojos al lisarse.

### **Cambios comportamentales a corto y largo plazo debido al efecto de dosis subletales de Stx2 en ratones**

Previo a nuestro trabajo no existía en la literatura reportes de análisis comportamentales rigurosos en ratones u otros animales bajo el efecto de S Stx2, por lo que decidimos hacer ahondar en los efectos comportamentales de la toxina en nuestro modelo de ratón con 2 dosis subletales de Stx2 y una dosis menos concentrada que la dosis subletal a la que llamamos 1:10dsStx2.

Cabe aclarar que la dosis elegida es de suma importancia, ya que debido a tener la toxina un efecto letal, al aumentar la dosis y acercarnos a la DL50 obviamente aparecerán problemas comportamentales, relacionados con la cercanía a la mortalidad que produce la misma, produciendo efectos obvios, por lo cual nos interesa principalmente evaluar a los animales en una dosis mucho menor que la DL50 para poder tener una idea de cuáles son los efectos de la toxina Shiga en dosis bajas, no cercanas a la muerte del animal. Por esta razón decidimos evaluar a los ratones bajo el efecto de dsStx2 (0.5ng/ratón, la misma que utilizamos durante toda la tesis) y una dosis 10 veces menor (0.05ng/ratón se indica como 1:10 dsStx2).

### **La toxina Shiga en dosis subletales altera los parámetros motores de ratones**



**Fig. 30. La toxina Shiga en dosis subletales induce cambios motrices según SHIRPA**

Análisis de los scores SHIRPA de los 4 tests motores realizados (actividad espontánea, elevación pélvica, actividad en las patas y el andar. Se usaron unidades arbitrarias (a. u) que son el promedio de la suma de los 4 tests independientes para cada día y tratamiento (vehículo o Stx2). Conducta normal = 0, conducta anormal= 1. El grupo tratado con vehículo no mostró alteraciones mientras que el grupo tratado con Stx2 mostró una conducta significativamente diferente (\*) al octavo día del tratamiento con toxina (P, 0,05).

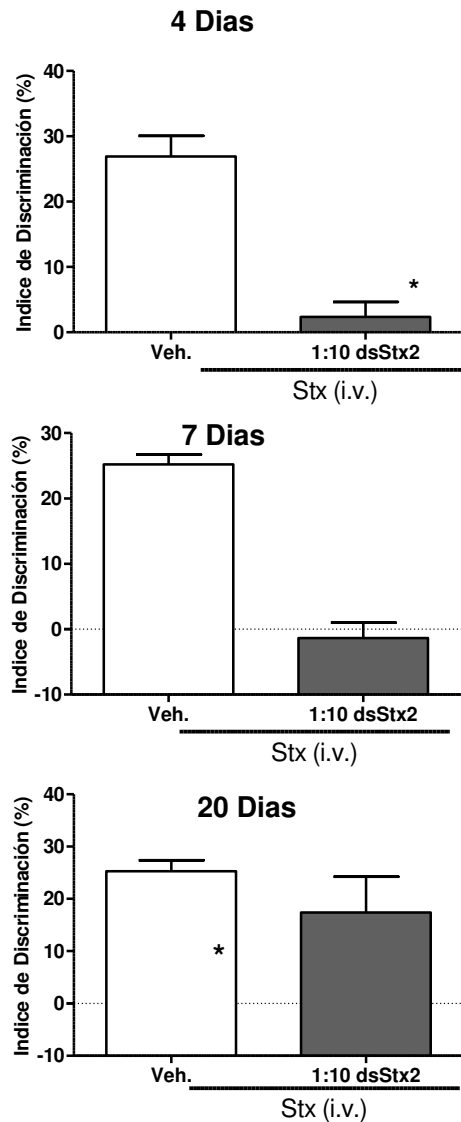
En la figura 30 podemos observar que la dosis subletal es suficiente para producir deficiencias motrices en ratones a 8 días luego de administrada la toxina. 4 días luego de la administración la actividad motriz se redujo un 50%, y a los 8 días se redujo un 100%. No se encontraron diferencias en los grupos vehículo y Stx2 a los 2 días de tratamiento. Los animales tratados con vehículo no presentaron cambios en ninguno de los períodos donde fueron evaluados.

### **La toxina Shiga en dosis subletales altera la memoria de Ratones**

Para analizar el efecto de la toxina Shiga sobre la memoria de ratones usamos el test de Reconocimiento de objetos (Object recognition). El test se encuentra ampliamente validado y estudiado en modelos murinos.<sup>219220</sup>

El modelo se basa en la tendencia natural que tiene el animal de explorar nuevos ambientes u objetos. Cuando se le presenta un estímulo nuevo, se dedica a explorar este en detrimento de uno antiguo.

Utilizamos una menor dosis que la subletal utilizada (1:10 dsStx2) ya que de usarla, los problemas comportamentales de los ratones impedirían validar el test.



**Fig 31. Stx2 produce un déficit en la memoria de ratones.**

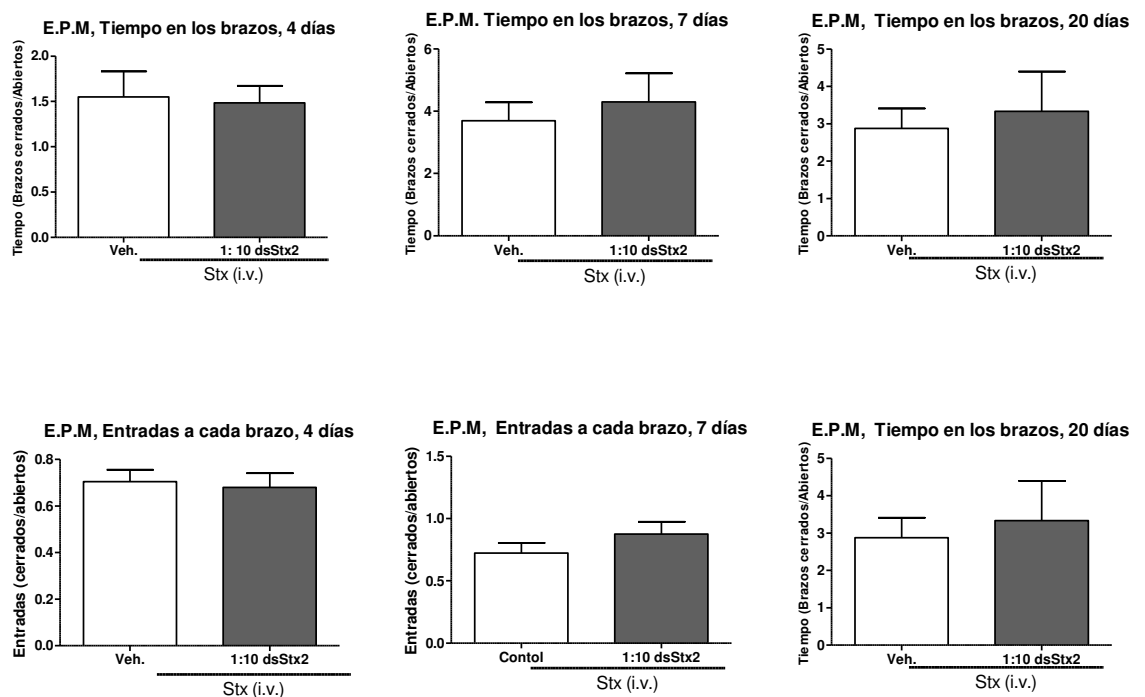
Se muestra el índice de discriminación en el test de Reconocimiento de Objetos (%) a 4, 7 y 20 días de inyectados tanto animales vehículos como tratados. Se observan diferencias significativas a 4 y 7 días en la dosis 1:10 dsStx2. La significancia estadística se muestra con un asterisco,  $p < 0.05$ .

En la Fig 31 se muestra el cambio en el índice de discriminación dado por el Test de Reconocimiento de objetos en ratones expuestos a la dsStx2. A 4 y a 7 días de inyectada la toxina se observa un cambio significativo ( $p < 0.05$ ) en el índice de discriminación, esto es los ratones inyectados con la toxina Shiga no pudieron

discriminar entre un objeto nuevo y uno que ya habían visto. A los 20 días el cambio se revierte con la dosis subletal utilizada (dsStx2). Este experimento fue realizado por duplicado.

### La toxina Shiga en dosis subletales no afecta el nivel de ansiedad en ratones

Para analizar si la toxina Shiga actúa como ansiogénica o ansiolítica en dosis subletales usamos el test de Mazo en T Elevado, el cual se basa en la tendencia aversión de los roedores a los ambientes abiertos, esta aversión a los brazos abiertos restringe los movimientos a los brazos cerrados.<sup>221222</sup>



**Fig 34. La toxina Shiga en dosis subletales no afecta el nivel de ansiedad en ratones**

Test de Elevated Plus Maze. Muestra la relación entre el tiempo que pasaron los ratones en los brazos cerrados/abierto y (debajo) el número de entradas a los brazos cerrados/número de entradas a los brazos abiertos. En ninguno de

los casos evaluados hubo diferencias significativas. El modelo se basa en la tendencia natural que tiene el animal a quedarse en ambientes cerrados (aversión a ambientes abiertos). La disminución de la ansiedad se refleja en un mayor tiempo en los brazos abiertos.

En la Figura 34 mostramos que no existen diferencias en el nivel de ansiedad entre los animales que están bajo el efecto de Stx2 y los que no. Esto quiere decir que los animales bajo el efecto de Stx2 no presentaron niveles de ansiedad diferentes a los controles, o sea que la toxina Shiga no afecta estas vías en las dosis subletales utilizadas.

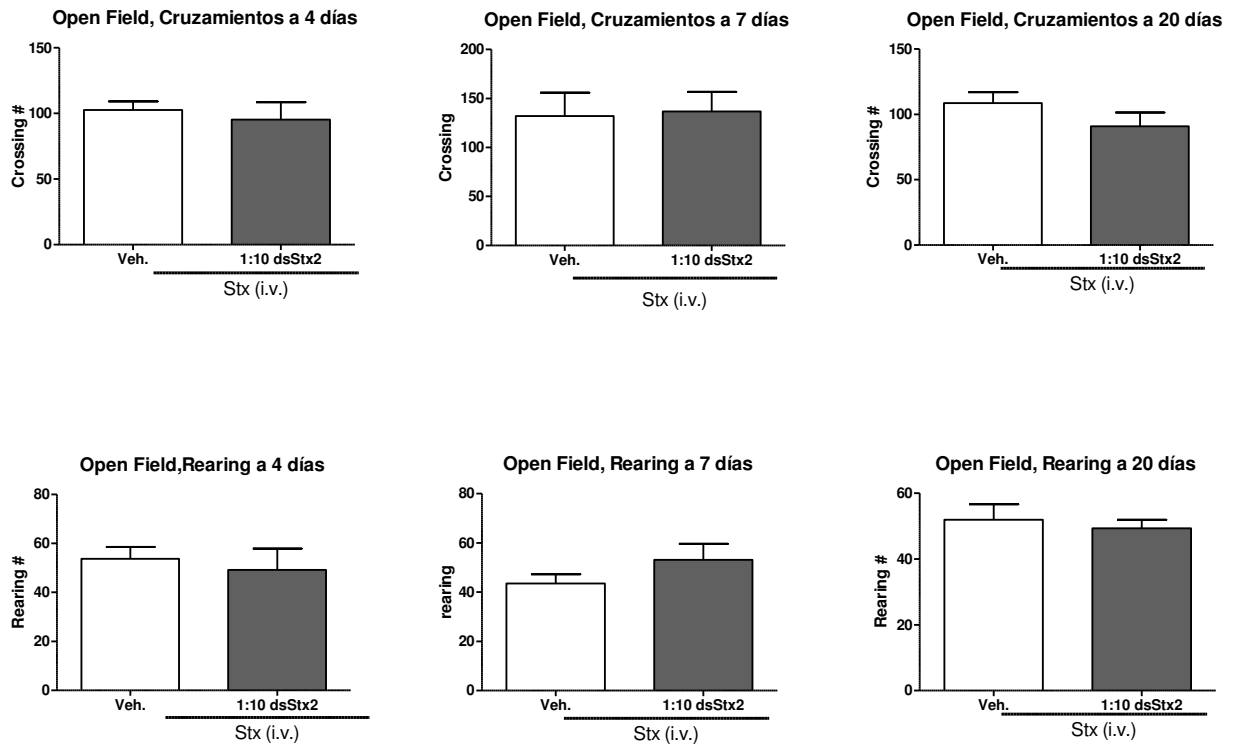
### **La toxina Shiga en 0.1 dosis subletales no altera la actividad locomotriz espontánea de ratones**

Para estudiar si 0,1 DL de Stx2 tiene efecto sobre la actividad locomotriz espontánea se utilizó el test de Campo Abierto.<sup>223</sup>

Este experimento se realiza comúnmente como una medida cuantitativa y cualitativa de medir la actividad locomotriz espontánea de los animales, exploratoria y emocional (el análisis del riesgo y ansiedad) en respuesta a un ambiente nuevo<sup>224</sup>. Se espera que los animales exploren mucho el ambiente nuevo inicialmente y eventualmente se habitúen al campo abierto.<sup>225</sup> El modelo se basa en la tendencia natural que tiene el animal a explorar el ambiente nuevo, de esta exploración se extraen los datos de actividad.

Los experimentos de Open Field han sido extensivamente validados, etológicamente y farmacológicamente en ratas y ratones<sup>226227228</sup>. Generalmente

las hembras tienen mayor actividad que los machos y las medidas primarias son: distancia recorrida y/o cruzamientos (actividad locomotriz), exploración (número de rearing), actividad de tipo ansioso (actividad en el centro).



**Fig 32. La toxina Shiga en dosis subletales no altera la actividad locomotriz espontanea de ratones**

Se muestra el análisis de los cruzamientos y el rearing en el Open Field. No se encuentran diferencias significativas a los 4, 7 o 20 días de la primera inyección con Stx2 y los ratones tratados con vehículos.

En la Fig. 32 se muestran los experimentos de Open Field a 4, 7 y 20 días. En ninguno de los periodos se encontraron diferencias significativas entre los animales tratados con Stx2 y los animales tratados con vehículo, esto quiere decir que se descartan los problemas motrices que se pueden observar con el Open Field en los animales bajo la dosis diez veces menor a la dsStx2.

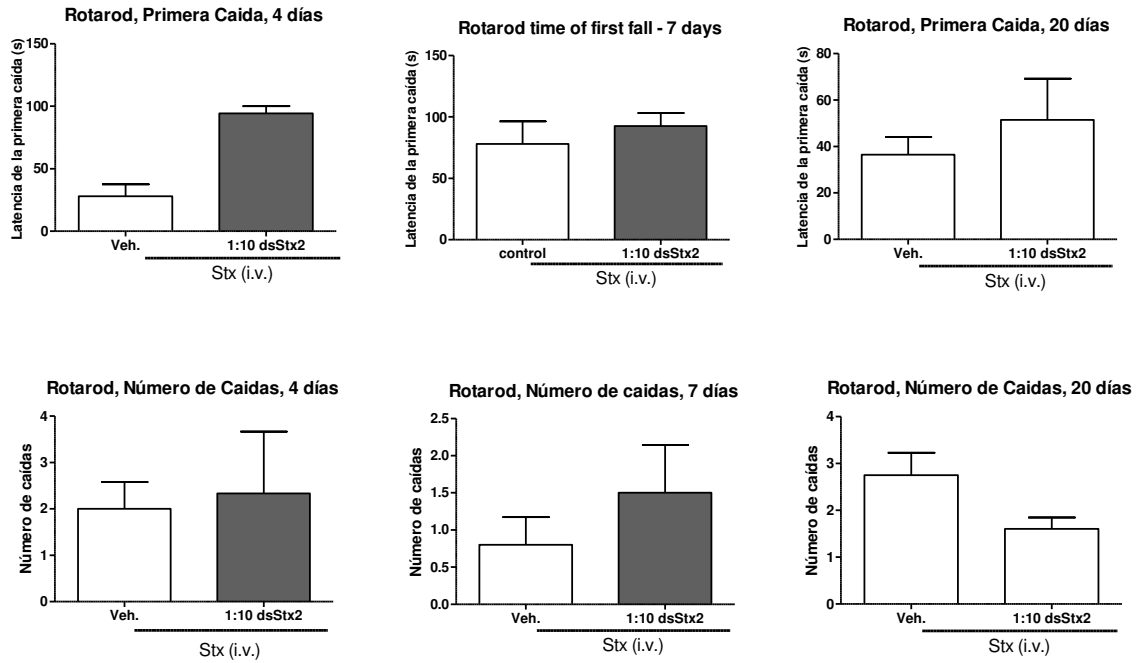


Este resultado además valida lo encontrado en la Fig. 31 en el test de reconocimiento de objetos ya que si se hubieran observado cambios motrices los resultados del experimento de reconocimiento de Objetos quedarían invalidados, ya que sería por problemas motrices y no de memoria que el ratón no puede reconocer el objeto nuevo que le es presentado.

### **La toxina Shiga en 0.1 dosis subletales no altera la coordinación motora ni el balance en ratones**

El test de Rotarod es ampliamente usado para evaluar el balance y la coordinación motora<sup>229</sup>.

En este modelo el animal tiene que obligatoriamente equilibrarse sobre el cilindro que gira para no caer. En este test se miden parámetros como el número de caídas y el tiempo a la primera caída.



**Fig 33. No se producen cambios motrices en ratones inyectados con Stx2**

Se muestra el análisis del número de caídas y la latencia a la primera caída entre ratones tratados con Stx2 y con vehículo en el test de Rotarod. No hay diferencias significativas entre los diferentes tratamientos a 4, 7 y 20 días.

Al analizar el comportamiento de los animales en el Rotarod como lo muestra la figura 33, vimos que se comprueban los resultados del Campo Abierto (Fig. 32), no existen problemas motrices en ninguna de las dos dosis utilizadas. Los animales presentan el mismo número de caídas y un tiempo a la primera caída del aparato similar así hayan sido tratado con Stx2 en dosis subletales o no.

## Conclusiones

La administración sub letal de Stx2 causó deficiencias cognitivas que afectan la memoria de ratones y problemas motrices. Además observamos por ultraestructura alteraciones en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, infiltración de mastocitos, debilitamiento de la barrera hematoencefálica y sinapsis interrumpida. Observamos también reacción astrocitaria, cambios en el patrón de la microvasculatura, aumento del receptor Gb3 y se inmunodetectó la presencia de la toxina en hipocampo.

Este es el primer reporte de los efectos tóxicos de dosis subletales de Stx2 administrada via endovenosa en ratones, así como el primer reporte de cambios comportamentales producidos por la toxina.

En nuestras observaciones reportamos un aumento de la expresión del receptor Gb3 en neuronas de la corteza, estriado e hipocampo y daño astrocitario en el estriado y ensanchamiento dendrítico.

El aumento de la expresión del receptor Gb3 en poblaciones neuronales de diferentes áreas del cerebro y el ensanchamiento dendrítico fueron características que nosotros observamos por primera vez en cerebro de rata<sup>230</sup>.

El receptor Gb3 se encuentra presente en neuronas del sistema nervioso central de ratas y ratones<sup>231</sup>. En este capítulo, observamos el aumento de la expresión del receptor Gb3 en el hipocampo al estar los ratones bajo una dosis de Stx2 subletal (Fig. 26). La localización y aumento de expresión del receptor es de suma importancia ya que Stx2 puede causar apoptosis en las células que lo expresen.

Previamente, en el capítulo anterior mostramos en detalle en diferentes zonas el aumento de la expresión del receptor al inyectar via ICV Stx2. Estos dos resultados en dos modelos diferentes (ICV en rata, inyección endovenosa en ratón) concuerdan con lo encontrado en seres humanos en el brote de Alemania en el 2011<sup>232</sup> y en cultivos celulares humanos<sup>233</sup> por lo que el modelado con ambas especies teniendo en cuenta la similitud de estos resultados parece ser una buena opción.

De los 52 pacientes adultos con SUH observados en el brote, 51 mostraron alteraciones neurológicas como visión doble, dificultad para hallar palabras, hiperreflejos. 23 de los 52 presentaron déficit de memoria, déficit atencional en orientación y problemas en las habilidades constructivas. Este estudio refuerza nuestros hallazgos, ya que se encuentra el aumento del receptor Gb3, daño en el cerebro a través de RMI y halla problemas cognitivos.<sup>234</sup>

Por lo que es factible pensar que nuestros estudios por microscopía también pueden extrapolarse a seres humanos. Estudios más detallados deben realizarse en este aspecto.

A finales del 2012 se reportaron detalladamente por primera vez las alteraciones cognitivas producidas en adultos con encefalopatías producidas por Stx2<sup>235</sup>.

Un dato importante es que el alto porcentaje de encefalopatías causadas por STEC en adultos difiere del observado en niños, varios aspectos pueden ser claves en esta diferencia. Primero la edad, la detección del déficit cognitivo y psicomotor en niños puede ser más difícil que en adultos. Por otro lado la alta tasa de síntomas neurológicos detectados puede ser causa de la intensidad del

análisis realizado, que usualmente no se realiza en niños. Tercero, la epidemia se produjo por una nueva variante que expresa Stx2a así como el factor de adherencia AAF/III característicos de *E. coli* enteroagregativa que aumenta la adherencia de la bacteria a las células epiteliales y que puede facilitar la absorción de la toxina.

Los síntomas neurológicos observados en los ratones, pérdida de memoria (Fig. 31) observado a través del reconocimiento de objetos parecen coincidir con los síntomas en humanos<sup>236</sup>. En este capítulo no detectamos problemas motrices por ninguno de los 3 tests evaluados (Fig. 32, 33, 34) con la dosis 0.1 dsStx2, pero si encontramos problemas motrices con la dosis dsStx2 bajo el test Shirpa (Fig. 31).

Este es el primer estudio en encontrar deficiencias en la memoria de animales bajo el efecto de Stx2 y el primero en reportar alteraciones motrices.

El estriado incluye los ganglios basales, que tienen un rol relevante en el control del movimiento voluntario y el establecimiento de desórdenes<sup>11</sup>. Aunque es muy útil relacionar los datos comportamentales con los datos ultraestructurales en el cerebro, los reportes que lo relacionan son difíciles de encontrar.

Por ejemplo, la parálisis de los miembros se ha descrito en modelos animales como causada por Stx2, pero este u otros déficits motores no ha sido asociado con ninguna región en particular. Este déficit se ha descrito solo en neuronas motoras de la espina dorsal.

Las lesiones en la memoria de ratones causadas por Stx2, deben buscarse principalmente en el hipocampo. Bajo ultraestructura encontramos el mismo daño celular que observamos en el estriado, por lo que el déficit de memoria pueda

deberse al daño directo de la toxina o a la cadena patógena desencadenada por ésta. Pudimos detectar Stx2 en el hipocampo tan pronto como a 4 días de inyectada la toxina (Fig. 23) lo que indica que Stx2 se encuentra en el hipocampo, pero este hallazgo no descarta que se deba a la acción indirecta debido a la cascada desencadenada por la misma.

El déficit en la memoria encontrado se revierte a los 20 días probablemente por los mecanismos de remodelación y plasticidad activados en el cerebro. Mayores estudios deben realizarse para esclarecer esta cuestión.

Analizamos el estriado y el hipocampo porque son las principales regiones relacionadas con el movimiento autónomo y la memoria, sin embargo cabe destacar que también observamos daño en otras regiones como el hipotálamo y la corteza.

Las neuronas del estriado de animales tratados con vehículo muestran una apariencia normal comparadas con las tratadas con Stx2<sup>237238</sup>. En contraste, la observación por ultraestructura mostró que la administración endovenosa de Stx2 produjo una degeneración progresiva a partir del día 2. Los núcleos electron densos que se encontraron en los ratones tratados con Stx2 se asemejan a aquellos en las primeras etapas de la apoptosis<sup>239</sup>.

También se observó convergencia de la membrana nuclear. Este tipo de alteración se ha observado como un signo temprano de daño neuronal en un modelo transgénico de distonía en la cual el estriado fue afectado<sup>240</sup>. A partir del día 4 se observaron indentaciones en las neuronas, esta patología se encontró en

la enfermedad de Huntington y en modelos animales relacionados<sup>241242243</sup> luego de  
injuria axonal<sup>244</sup>.

El número de neuronas con edema aumentó a lo largo del tiempo de estudio. Se  
observó edema intracitoplasmático, destrucción del retículo endoplasmático y  
mitocondrias, y núcleos apoptóticos que resultaron en neuronas con necrosis en  
el estriado. Confirmamos la neurodegeneración con el marcador Fluorojade tanto  
en estriado como en hipocampo.

Por ultraestructura observamos además en ratones tratados con vehículo,  
astrocitos normales con mitocondrias conservadas, retículo endoplasmático  
rugoso, aparato de Golgi y gliofilamentos<sup>245</sup>.

Los astrocitos forman parte de la barrera y cubren la membrana basal de la  
superficie vascular del SNC. En condiciones patológicas los astrocitos pueden  
mostrar un aumento del volumen y grandes cantidades de gliofilamentos o  
edema<sup>246</sup>. Los astrocitos tratados con Stx2 se asemejan a la condición patológica.  
El porcentaje de astrocitos con edema se incrementó a lo largo del tiempo. Se  
observaron partículas electrodensas perinucleares. Esto se asemeja a elementos  
nucleares que migraron al citosol, posiblemente por la pérdida de funcionalidad de  
la envoltura nuclear como consecuencia de los cambios osmóticos causados por  
el edema.

En condiciones patológicas los astrocitos sufren cambios complejos denominados  
reacción astrocitaria o gliosis<sup>247</sup>, en esta reacción los astrocitos secretan citoquinas  
pro-inflamatorias, óxido nítrico y ROS y forman una red glial que imposibilita la  
reconexión neuronal<sup>248</sup>.

El caso de la administración de Stx2 produce gliosis a los 4 y 7 días de administrada la toxina y luego el proceso desaparece a los 20 días. En la parte comportamental el déficit de memoria desaparece a los 20 días por lo que indicaría que la patología ya no se observa en ese tiempo.

Se encontró además la interposición de procesos astrocitarios entre las terminales pre y post sinápticas. Un proceso físico similar de bloqueo de las sinapsis en neuronas motoras fue descrito en ratón luego del tratamiento con Stx2<sup>249</sup>. La interrupción de las sinapsis podría ser un mecanismo neuroprotector por el cual las proyecciones de los astrocitos puedan físicamente separar la sinapsis contra la excesiva liberación de glutamato<sup>250251</sup>. Las terminales sinápticas alteradas pueden ser la consecuencia de la liberación excesiva de glutamato<sup>252253</sup>. La interposición de astrocitaria en el espacio sináptico puede disminuir la cantidad de vesículas pre-sinápticas y por ende desorganizar las estructuras sinápticas.

En animales tratados con vehículo su microvasculatura muestra por ultraestructura una barrera hematoencefálica conservada del estriado<sup>254255</sup>, comparada con los tratados con Stx2. Fujii y colaboradores encontraron células endoteliales edematosas en la corteza de ratones moribundos luego de 2 días de un inyección con una dosis letal de toxina de 4ng por ratón<sup>256</sup>. En cambio, nosotros mostramos que con una dosis subletal de 0.5 ng por ratón fue suficiente para causar daño celular. La ruptura de la barrera hematoencefálica fue otra consecuencia de la acción de la toxina. Como resultado, se observaron células endoteliales colapsadas en el espacio edematoso por los astrocitos perivasculares dañados a lo largo de los 8 días del estudio. El espacio edematoso mostraba un edema típico en la barrera hematoencefálica<sup>257</sup>.



En estudios previos, mostramos que Stx2 produce daño filtraciones vasculares<sup>258</sup>, mientras que en este estudio mostramos que la toxina rompe la barrera hematoencefálica alterando los astrocitos perivasculares.

Observamos además como el patrón de la microvasculatura cambia al inyectarse Stx2, a 7 días y se restaura a condiciones normales similares a las del vehículo a los 20 días de tratamiento.

Los residuos carbohidratos del glicocalix están expuestos en la superficie luminal de los vasos y por eso son reconocidos por el marcador utilizado, siendo posible investigar el patrón de distribución de los residuos azucarados en condiciones fisiológicas o de enfermedad<sup>259</sup>.

El glicocalix endotelial está compuesto por glicoproteínas integrales y periféricas, glucolípidos y proteoglicanos, estas moléculas están integradas en una malla compleja que regula la permeabilidad de la microvasculatura, el flujo sanguíneo, la coagulación la fibrinólisis, angiogénesis e interactúa con las proteínas plasmáticas y con las células sanguíneas.<sup>260261</sup>

Se identificaron mastocitos<sup>262</sup> que se localizaron en el parénquima del estriado, probablemente debido a la condición patológica causada por la toxina. A diferencia de los basófilos, que tienen gránulos grandes y laminados, los mastocitos llevan numerosos gránulos no laminados<sup>263</sup>. Usualmente se encuentran en la perivasculatura<sup>264</sup> y migran al parénquima cerebral cuando ocurre una injuria isquémica seguida de edema o de la permeabilización de la BHE<sup>265</sup>.

Se identificó oligodendrocitos por la presencia de un núcleo redondo u ovalado conteniendo heterocromatina y se los diferenció de los astrocitos por la carencia de glicógeno o gliofilamentos.

El fenotipo de los oligodendrocitos puede ser notado incluso cuando existe una patología <sup>266</sup> además, se puede producir la identificación errónea entre oligodendrocitos y células microgliales, hasta que las diferencias ultraestructurales lo hagan evidente. Cuando las células microgliales se activan por un agente, dilatan los canales de retículo endoplasmático y un gran número de vesículas claras (no presentan densidad electrónica) en el citoplasma. Además, un pequeño número de células activadas tienen lisozimas electro densas, indicando actividad fagocítica <sup>267</sup>. Al no encontrar estas características en las células dañadas, se corresponden con oligodendrocitos.

El proceso de apoptosis se caracteriza por la agregación de cromatina, el estrujamiento de la célula y la presencia de organelas preservadas<sup>268</sup>. El proceso de necrosis se caracteriza por la condensación de la cromatina, el hinchamiento celular, la lisis de la membrana de las organelas y la vacuolización citoplasmática <sup>269,270</sup>. Los datos estructurales encontrados muestran que luego del tratamiento con Stx2, los oligodendrocitos presentan daño apoptótico en los días 2 y 4 y que en el día 8 prevalecen los de tipo necrótico.

En conclusión, en el estriado de ratones, la infiltración mastocitaria y la reacción astrocitaria fueron el resultado de la injuria con Stx2 cuando fue administrada de forma endovenosa. Los factores periféricos producidos por Stx2 pueden contribuir

a desencadenar estos eventos, ya que no se encontraron cuando Stx2 se administró via intracerebroventricular en ratas<sup>271</sup>. Aunque también la diferencia entre especies puede ser la responsable de esta diferencia.

El daño de los oligodendrocitos puede causar los déficits en la transmisión axonal observados en los ratones tratados con Stx2. Los axones desmielinizados se observaron luego de la administración ICV de Stx2<sup>272</sup>. Stx2 se inmunolocalizó en el parénquima cerebral <sup>273</sup>. Aunque el receptor de Stx2, Gb3 no se encuentra en el endotelio del cerebro de ratones, la toxina se pega a las neuronas. Sin embargo el mecanismo por el cual Stx2 entra al parénquima cerebral es desconocido. La BHE debe mantener su estructura y función para proteger el parénquima cerebral <sup>274</sup> de elementos dañinos y permitir el flujo homeostático de las diferentes sustancias requeridas por el cerebro y el eflujo de productos celulares para mantener la homeostasis del CNS<sup>275</sup>. Sin embargo el filtrado vascular producido por Stx2 podría alterar esta homeostasis. Además las neuronas estriatales son uno de los blancos de Stx2. Stx2 puede cruzar el parénquima cerebral a través de los vasos de los órganos circunventriculares que poseen uniones estrechas o destruyéndolas en el endotelio no fenestrado, o atravesando la barrera cerebrospinal para llegar a los ventrículos y luego desde ahí al parénquima cerebral cruzando por las células ependimales.

Otra posibilidad es que la toxina cruce la BHE porque los astrocitos perivasculares que constituyen una parte de la barrera se encuentran dañados como se muestra en este capítulo.

Las lesiones ultraestructurales observadas en las células estriatales incluyendo neuronas pueden causar las lesiones motoras observadas en los animales tratados con Stx2<sup>276</sup>, que está específicamente relacionado con los movimientos voluntarios en el área dorsolateral<sup>277</sup>.

El mecanismo de entrada de Stx2 al parénquima cerebral y los eventos que llevan a la degeneración neuronal y glial están siendo estudiados en este momento. Otros factores además de Stx2, como el LPS pueden contribuir a la patología y deben tenerse en cuenta.

En resumen, la administración subletal de Stx2 causó la disrupción de la BHE, edema astrocitario, reacción astrocitaria, aumento del receptor Gb3, neurodegeneración, muerte de oligodendrocitos, sinapsis interrumpidas y extravasación de mastocitos, lo que puede explicar las complicaciones cognitivas encontradas en ratones.

El daño puede reflejar algunas de las alteraciones clínicas observadas en seres humanos recientemente que se corresponden con las que hemos hallado en este trabajo <sup>278</sup>. Por lo que este modelo animal parece ser útil para comparar y entender las bases de los mecanismos neuropatogénicos que produce la intoxicación con STEC.

## **Capítulo 4**

### **Estudio de diferentes sustancias con posible potencial de bloquear la acción citotóxica de la toxina Shiga 2**

## Capítulo 4

### Estudio de diferentes sustancias con posible potencial de bloquear la acción citotóxica de la toxina Shiga 2

#### Introducción

Argentina es el país que tiene la mayor cantidad de casos de SUH por año y aunque han pasado más de 30 años desde el descubrimiento de *E. coli* O157:H7 como patógeno entérico, actualmente no existe hasta el momento un tratamiento específico que pueda impedir la progresión del daño que causa la toxina en los diferentes órganos una vez ocurrida la infección<sup>279</sup>.

Desde que se estableció el nexo entre la infección con bacterias STEC y el desarrollo del SUH<sup>280</sup> se han realizado enormes esfuerzos en encontrar tratamientos y herramientas de prevención adecuadas.

La administración de antibióticos para prevenir el SUH se encuentra altamente desaconsejada ya que se ha probado que el uso de los mismos aumenta la probabilidad de establecimiento del SUH. Los niños que recibieron antibióticos durante la diarrea, desarrollaron SUH más frecuentemente que los que no recibieron antibióticos (36% vs 12%;  $P = .001$ ). Esto se observa con todas las clases de antibióticos usadas.<sup>281</sup>

Se han probado una gran variedad de tratamientos y estrategias de prevención. Un ejemplo es el desarrollo de híbridos de Stx2 para inmunizar ratones los cuales desarrollan luego anticuerpo con capacidad de neutralizar la acción de Stx2<sup>282</sup>, también se ha intentado administrar análogos de Gb3 con capacidad de unir Stx2 y evitar su translocación intestinal, pero que no lograron impedir que la toxina ingrese en el organismo.

Se han utilizado polímeros sintéticos de Gb3 que al ser administrados oralmente a ratones luego de ser desafiados con una dosis letal de *E. coli* O157:H7, los protege de los efectos tóxicos de Stx2, pero su efectividad no ha podido ser probada en seres humanos.

No se utilizan en la actualidad ningún tratamiento activo de las encefalopatías derivadas del SUH en seres humanos, sólo se trata pasivamente administrando solución fisiológica<sup>283</sup>.

## **Sustancias que se analizaron en este trabajo para bloquear la acción de Stx2**

### **Péptidos como inhibidores de la acción de Stx2**

La idea principal es evitar que Stx2 entre a las células y ejerza su acción citotóxica bloqueando el sitio de entrada que es el receptor Gb3, mediante el ofrecimiento de altas cantidades de sustancias capaces de pegarse al receptor.

En rata, se demostró que la administración de C-9, un inhibidor de la síntesis de la síntesis del Gb3, disminuye la expresión de Gb3 y protege a las ratas del efecto deletéreo de Stx2.<sup>284</sup>

En este capítulo se analizó el efecto de mutantes de Stx2B, (detallada su estructura en los Materiales y Métodos), que llamamos Stx2B-Cons y Stx2B-Mut. Además también se estudió el efecto de la subunidad de Stx2, la proteína Stx2B completa.

### **Sustancias Farmacológicas como inhibidores putativos de la acción de Stx2**

Varios reportes indican que Stx2 causa un daño crítico en el sistema nervioso mediante la inflamación que se desencadena como respuesta primaria a Stx2<sup>285286287</sup>, aumentando los niveles de TNF- $\alpha$  e IL1-B en el parénquima. Por lo tanto un objetivo es analizar el efecto de diferentes sustancias que poseen actividad

antiinflamatoria.

El único caso reportado con éxito en ratones, es la administración combinada de 2 inhibidores de fosfodiesterasas 3 y 4, Rolipram y Pentoxifilina, por vía intraperitoneal, en una dosis de 7.5 mg/kg. Se suministró el tratamiento cada 12 horas durante 3 días, comenzando al día 2 de la infección con O157:H7. En el día 3 comienza la producción de Stx2, por lo tanto el tratamiento se produce 24hs antes de la producción de Stx2. El tratamiento con ambos inhibidores redujo los niveles plasmáticos de Stx2 y consecuentemente no se encontró Stx2 en el cerebro y los sobrevivientes no mostraron síntomas neurológicos. La protección se asoció con menores niveles de TNG- $\alpha$  y una producción aumentada de IL-10 en el suero y en el cerebro.<sup>288</sup>

En conejos, el único caso reportado de neutralización de la actividad de Stx2 es el uso de la betametasona sodio fosfato. La betametasona se usa como tratamiento para edema cerebral en seres humanos. Altas dosis de betametasona (36mg/kg) se aplicadas 2 veces al día y logran reducir la mortalidad en conejos luego de una administración intravenosa de Stx2<sup>289</sup>.

Por lo que decidimos usar 2 sustancias con propiedades anti-inflamatorias para probar su acción como inhibidoras de Stx2 en ratones:

### **Dexametasona**

Es un glucocorticoide sintético que actúa como un anti-inflamatorio e inmunosupresor. Es 20-30 veces más potente que la hidrocortisona y 4-5 veces más potente que la prednisona.<sup>290</sup> A nivel celular reduce la respuesta patológica incluyendo niveles elevados de Interleukina-2, contribuyendo a bajar la inflamación y el daño de las paredes vasculares en el cerebro<sup>291</sup>. También se ha reportado que promueve la reparación del nervio periférico en ratas a través de la



regulación positiva del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)<sup>292</sup>.

### **L-name**

L-name, es un análogo de la arginina que inhibe la producción de Oxido nítrico (ON) ya que inhibe las isoformas inducibles y constitutivas de la ON-sintetasa<sup>293</sup>.

### **Etanercept**

Etanercept es el receptor soluble de TNF- $\alpha$ ., por lo que actúa como un inhibidor de TNF- $\alpha$ . TNF es en muchos sistemas el regulador primario de la inflamación. Las enfermedades autoinmunes son causadas por una respuesta aumentada del sistema inmune. Etanercept tiene el potencial de tratar estas enfermedades.<sup>294</sup>

TNF $\alpha$  es una citoquina que se produce en los linfocitos y los macrófagos. Media la respuesta inmune aumentando el transporte de leucocitos a los sitios donde ocurre la inflamación y a través de mecanismos adicionales que multiplican y amplifican la inflamación. Existen 2 tipos de receptores para TNF, los que se encuentran en la pared de los leucocitos y que responden liberando citoquinas y los receptores solubles de TNF, que se usan para desactivar TNF y cortar la reacción inmune. Además se encuentran el receptor de TNF en casi todas las células con núcleo. Etanercept simula los efectos de los receptores solubles de TNF, pero tiene mayor vida media que los receptores celulares que se encuentran en la célula.<sup>295</sup>

### **Pentoxifilina**

La Pentoxifilina es un inhibidor enzimático de la fosfodiesterasa y aumenta el AMP cíclico intracelular, estimulando la actividad de la quinasa de proteínas dependiente de AMPc<sup>296</sup>. Pentoxifilina actúa como inhibidor competitivo no selectivo de las fosfodiesterasas lo que produce el aumento de AMPc intracelular, activa la FosfoKinasa A, inhibe TNF<sup>297</sup>, reduce la inmunidad innata y inflamación<sup>298</sup>.

## Probióticos como inhibidores de la acción de Stx2

El uso de probióticos para prevenir y tratar una variedad de infecciones que derivan del aparato digestivo tiene cada vez más aceptación, en parte debido a la necesidad de encontrar alternativas a terapias tradicionales como los antibióticos<sup>299</sup>.

Kefir es una leche fermentada con propiedades beneficiosas para la salud que se origina en el Caúcaso, como ser antioxidante<sup>300</sup> y modulador de la respuesta inmune<sup>301</sup>. Kefir es una masa biótica simbiótica que combina bacterias probióticas, levaduras y una matriz de polisacáridos. Kefir puede inhibir el crecimiento de microorganismos patogénicos tanto *in vitro* como *in vivo*; por ejemplo en pollos puede inhibir a *Salmonella kedougou*<sup>302</sup>, también puede inhibir la actividad de *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*<sup>303</sup> e inhibir la germinación de esporas de *Bacillus cereus*<sup>304</sup>.

Debido a la complejidad de la microbiota presente en los granos de Kefir, este puede ser considerado como una fuente de microorganismos probióticos. Para este trabajo, los Lactobacilli que usamos fueron seleccionados por sus características potenciales como probióticos.

En ensayos clínicos, se han usado microorganismos probióticos como prevención y tratamiento de la diarrea infecciosa producida por bacterias o rotavirus.

Las bacterias ácido lácticas disminuyen la incidencia<sup>305</sup> o la duración de la diarrea<sup>306</sup>. Cepas potencialmente probióticas interfirieron con la colonización de *E. coli* en los modelos *in vitro*, reduciendo la adhesión<sup>307308</sup> y protegiendo contra el daño del citoesqueleto<sup>309</sup>. Algunas cepas de *Lactobacillus acidophilus* son capaces e producir una reducción significativa de la expresión de los genes relacionados con la virulencia en EHEC<sup>310311</sup>.

*Lb. plantarum* CIDCA 83114 puede disminuir la adhesión de EHEC en células Hep-2 y protegerla contra el daño celular. *Lb. kefir* CIDCA 8348 posee acción inhibitoria contra *Salmonella enterica* serovar y protege contra la invasión en células Caco-

2/TC-7<sup>312</sup>.

En este capítulo analizaremos si Kefir es capaz de inhibir la acción de Stx2 in vitro en células Vero.

## **Anticuerpos como neutralizantes de la acción de Stx2**

### **El reservorio de Stx2**

El ganado vacuno es el principal reservorio de EHEC O157:H7, que se aloja en su intestino grueso<sup>313</sup>. La bacteria se aísla usualmente de animales sanos, y sólo en animales jóvenes puede ocurrir un episodio de diarrea. La contaminación con heces de la carne durante la faena, el uso de las heces como fertilizante y la contaminación del agua son las principales formas en las cuales O157:H7 puede entrar en la cadena de consumo humano<sup>314315316</sup>.

La vacunación del ganado con diferentes combinaciones de factores de virulencia mostró eficacia reduciendo la dispersión de EHEC O157:H7. Además de producir Stx, E. coli O157:H7 expresa otros factores de virulencia incluyendo intimina, el receptor de la intimina o Tir, el sistema de secreción tipo 3 TTSS y la enterohemolisina. Todos estos genes están localizados en una isla de patogenicidad de 44 kb conocida como el locus LEE.

En este capítulo el objetivo fue determinar si la vacunación sistémica de vacas preñadas con Stx2 puede inducir anticuerpos específicos en el calostro y si estos pueden ser eficientemente transferidos a los terneros. La inmunización pasiva con anticuerpos específicos puede tener el potencial de reducir la colonización de E. coli O157:H7 en el ganado y en seres humanos.

## **Objetivo**

Nuestro objetivo fue probar diversas formas de neutralizar la acción citotóxica y deletérea de Stx2 medido como protección de muerte celular in vitro y por el aumento de la expectativa de vida de ratones.

Se analizó el efecto de las siguientes sustancias:

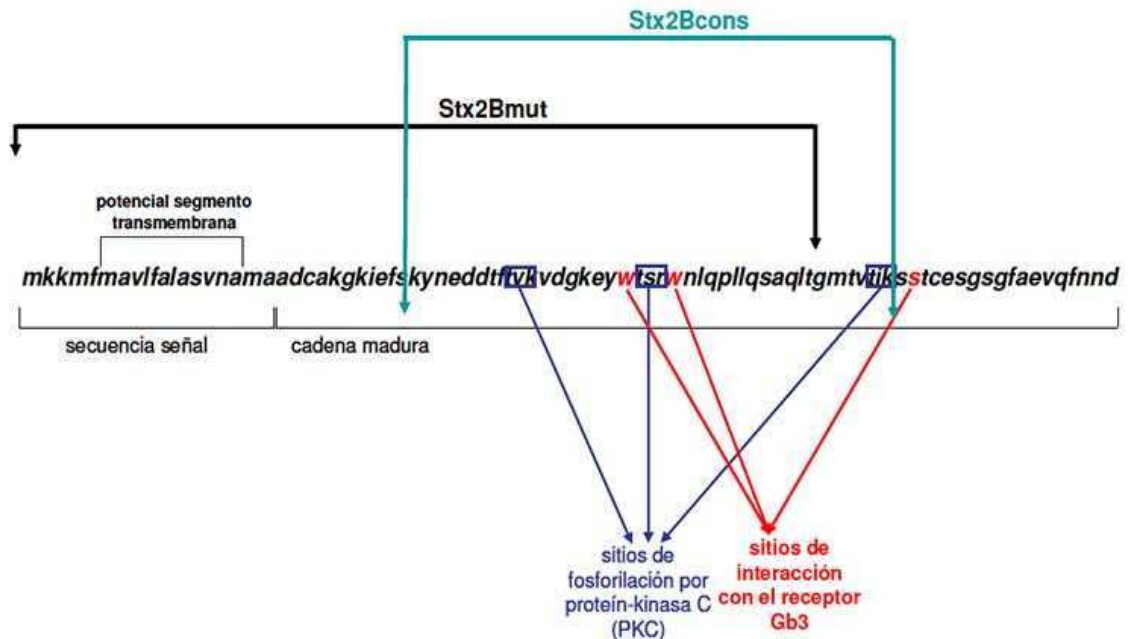
- a) mutantes de Stx2B obtenidas a partir de ADN recombinante
- b) sustancias biológicamente activas provenientes de *Lb. Plantarum*
- c) calostros y sueros de animales vacunados con Stx2
- d) sustancias farmacológicas capaces de impedir la acción tóxica de Stx2: Dexametasona, Etanercept, L-name y Pentoxifilina

## **Protocolos y Métodos**

### **Clonado y Producción de Proteínas Recombinantes**

#### **Stx2BMut, Stx2B Cons y Stx2B**

La clonación para construir Stx2BMut, Stx2BCons y Stx2B fue realizada y publicada por la Dra. Virginia Pistone Creydt, y tratadas por primera vez en su tesis de doctorado “Efecto de la toxina Shiga tipo 2 y su subunidad B”.



**Fig. 35. Secuencia de aminoácidos de la proteína Stx2B. Se indican las mutantes utilizadas Stx2BMut, Stx2BCons y la proteína Stx2B**

### Producción de Stx2B y Proteínas Mutantes

Los vectores se amplificaron en bacterias competentes DH5a y se purificó por cromatografía de afinidad usando columnas de Ni-agarosa como ya se describió para la purificación de Stx2B en el ítem "2. 2. 2. Purificación de la subunidad B de la toxina Shiga tipo 2" del Capítulo 2 de la Tesis de Pistone-Creydt.

La correcta expresión del gen truncado, una vez secuenciado, se detectó mediante Western-blot (anticuerpo monoclonal anti-Stx2B, Sifin, Berlin), Silver Coomassie Blue.

Stx2B Cons representaba la región conservada entre las diferentes versión de Stx2B que se producen y Stx2BMut representaba la región N-terminal de la proteína. Se pretendía que las proteínas al pegarse al receptor Gb3 inhibieran la acción citotóxica de Stx2.

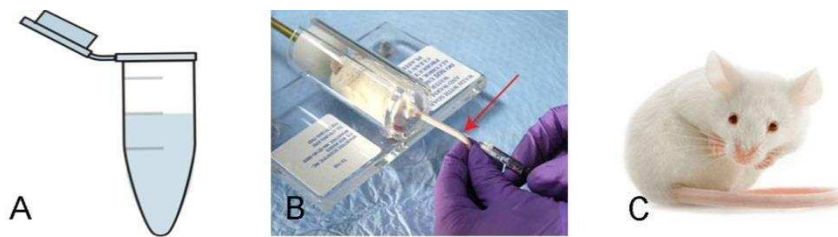
### Síntesis Química del péptido Stx2Bcons

Se envió a sintetizar el péptido Stx2Bcons químicamente. La estructura de aminoácidos fue confirmada por la reacción de Sanger.

### Estudio de la sobrevida de ratones frente a diferentes sustancias

Se inyectaron 2DL50 de Stx2 a los ratones y a diferentes tiempos (antes y después) se le inyectó la sustancia putativa a inhibir la acción de la toxina (Stx2B, farmacológica etc).

Luego se mide el tiempo de sobrevida de los tratamientos: Stx2 + solución fisiológica vs. Stx2 + sustancias inhibitoras.



**Fig. 36. Protocolo de los experimentos de sobrevida en ratones**

En un primer paso (a) se incubaba 2DL50 Stx2 (la dosis letal que mata a la totalidad de los ratones + Sustancia Inhibidora) durante 1hr a 37 °C. Luego se inyecta en el ratón por vía endovenosa la solución incubada previamente conteniendo la sustancia + Stx2 (b). Posteriormente se registra día a día la muerte de los ratones.

La toxina se inyecta por vía endovenosa, mediante la vena de la cola en un volumen de 0.1ml. El tratamiento con las sustancias se inyecta diluido en 0.1ml por vía intraperitoneal. A los controles se les inyecta el mismo volumen de solución fisiológica.

Los protocolos fueron aprobados por el comité de Cuidado y Uso Animal de la Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Además realicé el curso Animales de Laboratorio y Diseño Experimental en Trabajo con Animales de Laboratorio, FCEN, FFyB y FVET cuyo contenido es semejante al ofrecido en los

Centros Europeos acreditados para otorgar **certificación** de cumplimiento de la Directiva del Consejo de Europa 86/609.

### **Determinación de TNF- $\alpha$ en el cerebro y suero mediante ELISA**

Se administraron 2DL50 de Stx2 y solución fisiológica y se extrajeron los cerebros de los ratones a 3, 6, 18H, 24 y 48 horas y también el suero.

Los cerebros fueron removidos inmediatamente después de la decapitación. El tejido fue homogeneizado en 50 mmol/L Tris buffer (pH 7.2), NaCl 1-50 mmol/L, Triton-X-100 1%, a 4C y un cocktail inhibidor de proteasas (Roche, Mannheim, Germany) en una dilución 1:4 con 3 pulsos de 1minuto en el disruptor mecánico. Luego se dejó reposar por 10minutos en hielo y se centrifugó la muestra 4 °C y 3,000  $\times$  g (Sorvall Biofuge Fresco) por 20 min. Se centrifugó nuevamente. La concentración de proteínas totales de cada muestra se midió por Bradford (Bio Rad Laboratories, Munich, Germany). El sobrenadante fue removido y alicuotado a -80 °C hasta el Elisa.

### **Producción de Anticuerpos contra Stx2 en Vacunos**

#### **Formulación vacunadora**

Stx2 se mezcló con el adyuvante ISA206 (Montanide ISA206; Seppic, Francia) de manera que la concentración de proteínas fuera 100  $\mu$ g/ml. Se inoculó 100  $\mu$ g por animal.

#### **Animales**

25 vacas Fresian preñadas se obtuvieron de la estación experimental del INTA-Rafaela. Todos los animales fueron negativos para el cultivo de EHEC O157:H7. Todos los animales tienen más de 2 lactancias con un promedio de 4 años de edad.

La dieta antes del parto fue maíz, soja, sorgo, semillas de algodón, alfalfa y sales minerales, luego postparto se siguió la misma dieta con un cambio gradual a los 10 días. Los nacimientos fueron todos naturales y sólo uno fue asistido. El consumo natural de calostro fue controlado por un periodo de no más de 6 horas después del delivery.

El calostrado de los terneros fue chequeado con el test del glutaraldehído.<sup>317</sup> Todos los experimentos se realizaron en la Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (Santa Fe, Argentina), con el permiso ético del Comité de Sanidad Animal del INTA.

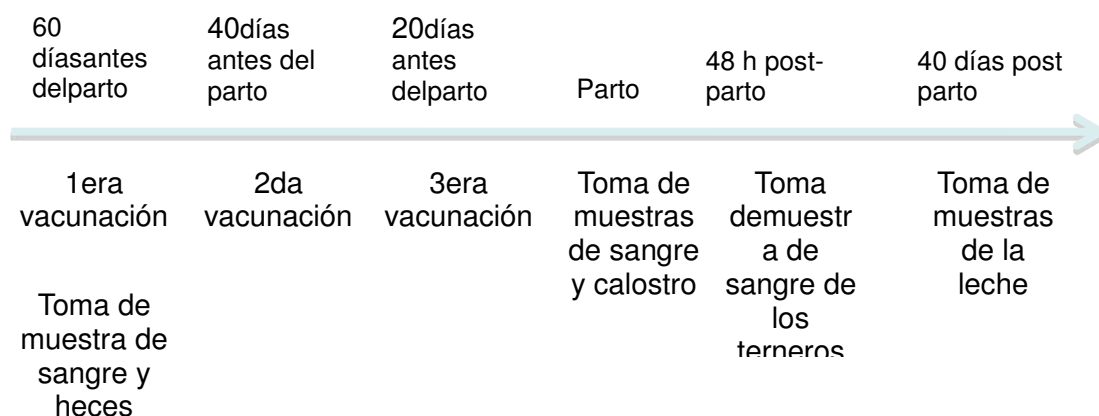
### **Preparación de Stx2 inactivada**

Stx2 se preparó como describimos en el capítulo 2. Para inactivar la proteína alícuotas de 500µl fueron calentadas por 10 min a 75°C. Stx2 inactivada fue usada como inmunógeno.

### **Esquema de inmunización**

Los animales se inmunizaron con 2ml de la formulación conteniendo 100ug de Stx2 inactivada previamente, intramuscularmente en el cuello a 60, 40 y 20 días pre parto. Grupos separados de 5 vacas recibieron 100 µg en 1ml de adyuvante. Un grupo control recibió solamente el adyuvante en PBS.





**Fig. 37. Esquema del protocolo de inoculación y toma de muestras**

### Toma de muestras

Se tomó muestras de sangre de vacas preñadas al tiempo 0 (60 días antes del parto) y al tiempo del parto. Las heces se recogieron de las vacas al tiempo 0, el calostro se recolectó 24hrs después y la leche se tomó a los 40 días. Las muestras de sangre de los terneros se recolectaron 48hrs después del parto. El calostro y la leche fueron depletados de los lípidos para los ensayos inmunes, para hacerlo se centrifugó el calostro y la leche a 2000g, 4°C por 45 min. El sobrenadante acuoso se guardó a – 20°C.

### Neutralización de la acción de Stx2 en células Vero

Para el ensayo de neutralización, Stx2 se mezcló con diferentes diluciones de calostro o suero de terneros y se incubó por 1hr a 37°C con agitación. El cóctel se incubó durante, 72hs en células Vero como fue descrito en el capítulo 2 de esta tesis (Fig. 2).

### Neutralización de la acción de Stx2 in vivo, sobrevida en ratones

Se incubó durante 1hr a 37 °C con agitación:

- 1) Diferentes diluciones de los IgG producidos en el calostro y suero + 2DL50 Stx2
  - 2) Diferentes diluciones del suero vacuno previo + 2DL50 Stx2
  - 3) Solución Fisiológica + 2DL50 Stx2
- Luego de la hora de incubación se inyectó en grupos de 6-8 ratones NIH y se analizó la sobrevida.

### **Inhibición por sustancias Probióticas**

#### **Producción de Stx2 por cepas O157:H7 y cepas recombinantes**

Se usó la cepa salvaje EHEC O157:H7 y la recombinante *E. coli* DH5 $\alpha$  expresando Stx2<sup>318</sup> crecidas por 18hs at 37° C en un caldo de tripticasa-soja (Laboratorio WB, Argentina). Todas las cepas fueron guardadas a -80 C con 15 % (w/vol) glicerol como crioprotector y reactivadas dos veces en el medio correspondiente.

#### **Obtención del sobrenadante de cultivo de *E. coli* EHEC**

La cepa EHEC se creció en medio tripticasa-soja (TSB: polipeptona 18g/L, NaCl 5 g/L, fosfato dibásico 2,5 g/L, glucosa 2,5 g/L pH = 7 de Lab. LW, Córdoba, Argentina), en condiciones aeróbicas a 37 °C durante 18 hs. Los cultivos fueron centrifugados a 10000g y filtrados por 0.45  $\mu$ m (Millipore, USA) para obtener el sobrenadante de EHEC.

#### **Obtención de la suspensión de lactobacilos**

Diez ml de cultivos ON de *Lactobacillus* en MRS fueron centrifugados a 10.000G

por 10min y luego el pellet fue resuspendido en el mismo volumen de PBS ( $10^9$  cfu/ml) y diluido en DMEM.

### **Tratamiento de los lactobacilos con calor y enzimas proteolíticas**

Para lograr la inactivación termal, la suspensión de lactobacilos en PBS ( $10^7$  cfu/ml) fue incubada en un baño de agua a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 10 min.

Para tratamiento con enzimas 1ml de la suspensión ( $10^9$  cfu/ml) fue centrifugado a 10000 g por 10min y el pellet fue lavado y suspendido con la solución enzimática (2.5 mg/ml) e incubado durante 1h a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Luego de la incubación las enzimas se inactivaron y el pellet de lactobacilos fue lavado y suspendido en PBS hasta alcanzar una OD de 0.08 equivalente a  $10^7$  cfu/ml.

Las enzimas fueron preparadas en un buffer apropiado de 2-5 mg/ml. Tripsina y  $\alpha$ -quimotripsina: en Tris-HCl 50 mM, NaCl 100mM, pH 8. Las enzimas fueron inactivadas agregando suero fetal bovino 1:10. Pepsina: en glicina-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, pH 2.2. La enzima fue inactivada a pH 7 con PBS. Proteinasa K: en buffer Tris/HCl 0.6 mM; EDTA 0.6 mM; SDS 0.6 %, pH 8. Esta enzima se inactiva agregando PMSF.

### **Preparación de las paredes celulares de los lactobacilos**

El cultivo bacteriano se obtuvo de 1L de cultivo de MRS fue centrifugado y lavado con PBS. El pellet fue lisado mecánicamente a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por una prensa Francesa XS-17523 (AB Biox, Järfälla, Suecia) por 3 veces consecutivas a 100 kN. La suspensión se centrifugó a  $4^{\circ}\text{C}$ , 10000g por 10 min y el sobrenadante fue ultra centrifugado a 35000g (TL Optima, Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA) y lavado con PBS hasta una OD constante de 280nm. El pellet fue resuspendido en 1ml de PBS (equivalente a  $10^{12}$  cfu/ml) y guardados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **Determinación- cuantitativa de la actividad hemolítica de los sobrenadantes con EHEC 157:H7**

Se obtuvieron eritrocitos a partir de sangre de conejo que fue tratada por 24 h a 4 °C con 1:10 de sodio citrato (3.8%). Después de 5 min de centrifugaron a 250 g, los eritrocitos en el pellet fueron lavados 2 veces y suspendidos en PBS para obtener una suspensión de eritrocitos al 3%.

Los ensayos de hemolisis conteniendo diluciones del 1:2 al 1:256 de sobrenadante de EHEC en suspensión de eritrocitos, en un volumen de 200 µl con 100mM de CaCl<sub>2</sub>. Luego de una incubación a 37 °C por 1 h y centrifugados a 250g 5 min, la liberación de hemoglobina fue medida a 600nm. En un espectrofotómetro (Beckman DU 650, Palo Alto, USA) la hemolisis total fue determinada mezclando eritrocitos con un 30% (v/v) de Tritón X-100 (Sigma Chemical, Co., St. Louis). La actividad hemolítica fue expresada como %H =  $[\text{ODs} - \text{ODnc} / \text{ODpc} - \text{ODnc}] \times 100$  donde s era la muestra, nc el control negativo en ausencia de hemolisis y pc el control positivo de hemolisis total.

### **Determinación cuantitativa de la toxicidad del sobrenadante de EHEC en células Vero**

Para los ensayos de citotoxicidad, los sobrenadantes de EHEC O157.H7 y E. coli recombinante, expresando Stx2 fueron preparados de cultivos esterilizados y usados en diferentes diluciones en DMEM para investigar la dosis-respuesta de Stx2 sobre las células Vero. Además se usó como control un anticuerpo anti-Stx2B (Sifin, Alemania).

a) Determinación de la actividad mitocondrial de la succinato dehidrogenasa como medida de la viabilidad celular (MTT).

El test de clivado de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-difenyyl tetrazolium bromide) fue descrito originalmente<sup>319</sup> para medir la proliferación celular.

La viabilidad celular se midió usando MTT (5 mg/mL) y DMEM sin rojo fenol. La sal tetrazolium es reducida por el metabolismo de las células viables produciendo azul formazano que se mide con una OD a 550nm. Como controles, en todos los experimentos se usaron células sin tratar. Se hicieron los tests por duplicado de cada muestra. Al menos tres experimentos independientes fueron realizados para cada condición. La media de la reducción del nivel de MTT fue comparada al control para determinar el porcentaje de viabilidad celular. El porcentaje de células viables fue calculado de la siguiente manera:  $ODs/ODc \times 100$ , donde ODs es la absorbancia de la muestra y ODc es la absorbancia del control, de las células sin tratar.

### **Medidas de la protección de los Lactobacillus de la actividad citotóxica del sobrenadante de EHEC**

Para evaluar la actividad inhibitoria de diferentes lactobacilos y sus paredes celulares sobre la acción de Stx2, diferentes tipos de experimentos se llevaron a cabo:

- i) **Test de Co-incubación:** diferentes diluciones del cultivo con EHEC y una suspensión de lactobacilos en PBS de  $10^7$  cfu por calle o 50  $\mu$ l de pared bacteriana por el (equivalente a  $10^7$  cfu/ml), se cargaron sobre células Vero entre 100% y 90% de confluencia en una microplaca de 24-48-wells. Las placas fueron incubadas por 48h. Como fue descrito previamente, gentamicina (100  $\mu$ g/ml) fue agregada en orden de inhibir el crecimiento de los lactobacilos durante el experimento.
- ii) **Test de pre-incubación:** Pellets de *Lb. plantarum* CIDCA 83114 equivalente a  $10^7$  cfu fueron pre incubados con 20  $\mu$ l de sobrenadante de EHEC durante 1 h a 37 °C y luego centrifugados a 10000g por 10 min. La citotoxicidad de los sobrenadantes fue testeada como se indica más arriba.

### **Análisis Estadístico**

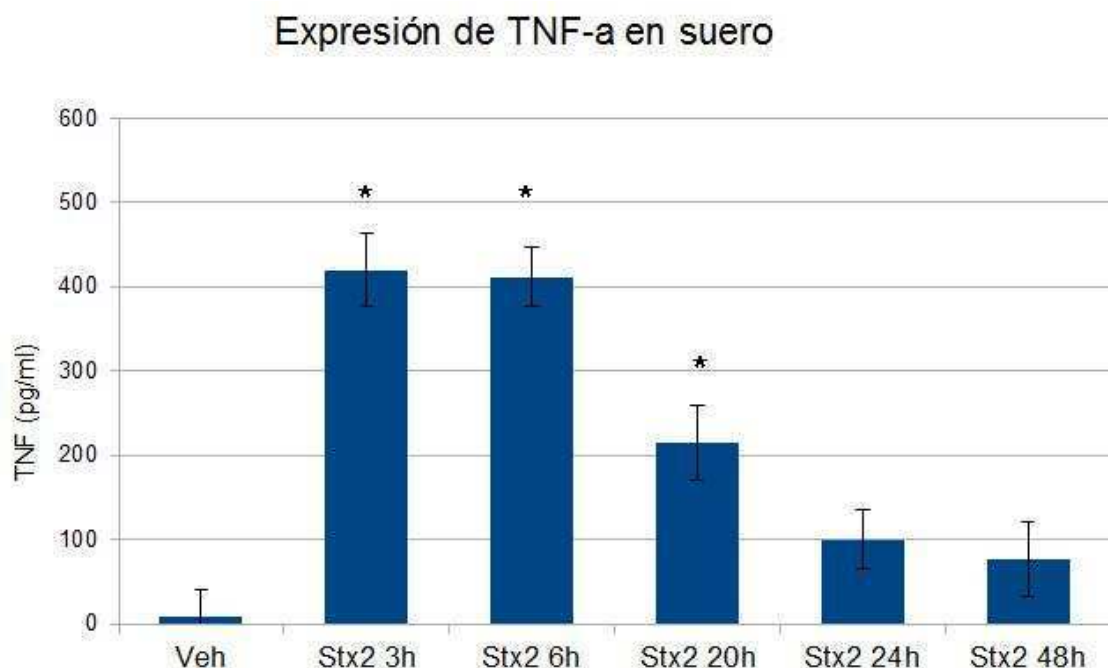
Los datos fueron analizados con el test de Student usando un 95% de confianza. El nivel de significación se determinó usando un valor de  $P < 0.05$ .

## Resultados

### La administración de Stx2 aumenta la expresión de TNF-a en suero

Se evaluó el efecto de 2 DL50 Stx2 sobre el nivel de expresión de TNF-a mediante Elisa.

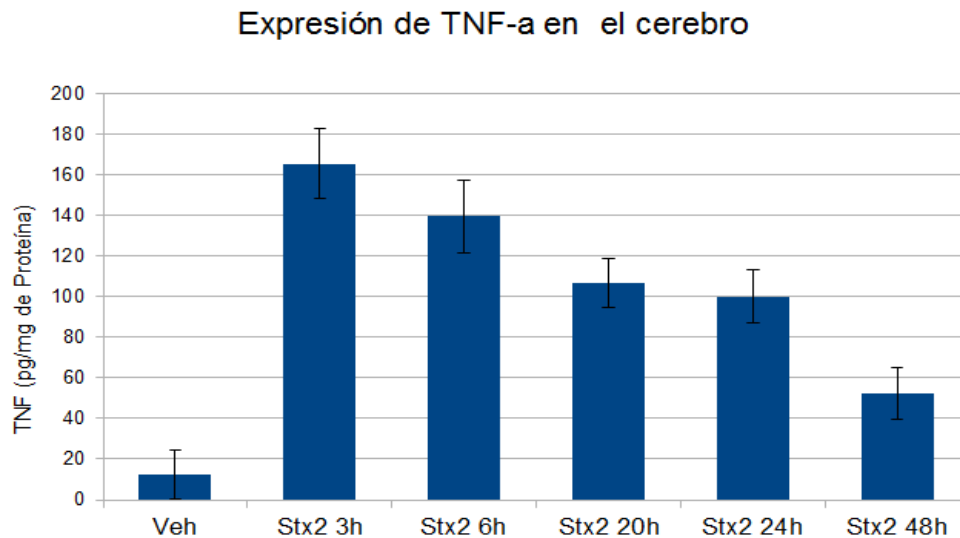
La expresión de TNF-a en el suero de ratones desafiados con 2DL50 de Stx2 (Fig. 38) fue máxima a las 3hrs de la administración de Stx2 (420pg/ml +/- 44).



**Fig. 38. Expresión de TNF-a en suero de ratones desafiados con 2DL50 Stx2.**

Se midió por Elisa kit la expresión de TNF-a en suero luego de 3h, 6h, 20h, y 24h, vehículo y Stx2. El nivel de expresión de TNF obtenido en 3h, 6h y 20h es significativamente mayor al de los vehículos ( $p < 0.05$ ). A 24hrs ya no es significativa la diferencia. Cada punto representa la media de 3 ratones y la determinación se realizó por triplicado. Se realizaron 3 triplicados del experimento.

### La administración de 2DL50 de Stx2 aumenta el nivel de TNF en el cerebro



**Fig. 39. Expresión de TNF-a en cerebro de ratones desafiados con 2DL50 Stx2.**

Se midió la expresión de TNF-a en homogenatos de cerebro luego de 3h, 6h, 20h, y 24h, vehículo y Stx2. El nivel de expresión de TNF obtenido en 3h, 6h y 20h, 24 y 48h es significativamente mayor al de los vehículos ( $p < 0.05$ ). Esta diferencia es significativa aún a 48hs de ser inyectado Stx2. Cada punto representa la media de 3 ratones y la determinación se realizó por triplicado. Se realizaron 3 triplicados del experimento.

La expresión de TNF-a en el cerebro de ratones desafiados con 2DL50 de Stx2 (Fig. 39) fue máxima a las 3hrs de la administración de Stx2 (165g/ml +/- 12). Este es el primer reporte del nivel de TNF en cerebros de ratones. Luego se observa una caída del nivel sin embargo la diferencia es significativa aún a 48hs de inyectada la toxina indicando que al inflamación en el cerebro se mantiene 2 días después de ser inyectada Stx2.

### **Estudio de diferentes agentes antiinflamatorios en la supervivencia de ratones**

Se usaron diferentes protocolos para estudiar el efecto de la Dexametasona, Pentoxifilina, L-name y Etanercept como posibles inhibidores del efecto de Stx2.



En general los ratones fueron desafiados con 2DL50 de Stx2 o 2DL50 Stx2+LPS por vía endovenosa, lo que dá como resultado la muerte del 100% de los animales a los 5 días. El inhibidor se administra como se muestra a continuación en la Fig. 41.

Toxina	Tratamiento	Inhibidor	Dosis (mg/kg)	% Supervivencia
Stx2	Stx2, luego Inh + Trat 48hs	Dexametasona	5	0
Stx2	Stx2, luego Inh + Trat 48hs	Dexametasona	0,5	0
Stx2	Stx2, luego Inh + Trat 48hs	Dexametasona	0,05	0
Stx2	Stx2, luego Inh + Trat 48hs	Pentoxifilina	10	0
Stx2	Stx2, luego Inh + Trat 48hs	Pentoxifilina	1	0
Stx2	Stx2, luego Inh + Trat 48hs	Pentoxifilina	0,1	0
Stx2	Inhibidor, 1hr después Stx2	L-name	10	0
Stx2	Inhibidor, 1hr después Stx2	L-name	1	0
Stx2	Inhibidor, 1hr después Stx2	Pentoxifilina	10	0
Stx2	Inhibidor, 1hr después Stx2	Pentoxifilina	1	0
Stx2	Inhibidor, 1hr después Stx2	Pent+ Dexa	1	0
Stx2	Inhibidor, 1hr después Stx2	Etanercept	5	0
Stx2	Inhibidor, 1hr después Stx2	Etanercept	0,5	0
Stx2	Inhibidor, 1hr después Stx2	Etanercept + Dexa	5	0
Stx2	Inhibidor, 1hr después Stx2	Dexametasona	0,5	0
Stx2	Inhibidor, 1hr después Stx2	Dexametasona	5	0
Stx2	Inh, 1hrs después Stx2 y luego Trat. 48hs	Dexametasona	0,5	0
Stx2	Inh, 1hrs después Stx2 y luego Trat. 48hs	Dexametasona	5	0
Stx2	Inh, 2hrs después Stx2 y luego Trat. 48hs	L-name	1	0
Stx2	Inh, 2hrs después Stx2 y luego Trat. 48hs	L-name	10	0
Stx2	Inh, 2hrs después Stx2 y luego Trat. 24hs	L-name	1	0
Stx2	Inh, 2hrs después Stx2 y luego Trat. 24hs	L-name	10	0
<b>Stx2</b>	<b>Inh, 2hr después Stx2, Trat 72hs</b>	<b>Dexametasona</b>	<b>15</b>	<b>20</b>
Stx2	Inh, 2hr después Stx2, Trat 72hs	Dexametasona	3,7	0
Stx2+LPS	Inh, 2hr después Stx2, Trat 72hs	Dexametasona	15	0
Stx2+LPS	Inh, 2hr después Stx2, Trat 72hs	Dexametasona	3,7	0
Stx2	Inh, 2hr después Stx2, Trat 72hs	Dexametasona	25	0
Stx2	Inh, 2hr después Stx2, Trat 72hs	Dexametasona	15	0
Stx2	Inh, 2hr después Stx2, Trat 72hs	Dexametasona	3,7	0
Stx2 + LPS	Inh, 2hr después Stx2, Trat 72hs	Dexametasona	25	0
<b>Stx2 + LPS</b>	<b>Inh, 2hr después Stx2, Trat 72hs</b>	<b>Dexametasona</b>	<b>15</b>	<b>33</b>
Stx2 + LPS	Inh, 2hr después Stx2, Trat 72hs	Dexametasona	3,7	0
Stx2 + LPS	Inh, 1hr después Stx2, Trat 96hs	Dexametasona	20	0
Stx2 + LPS	Inh, 1hr después Stx2, Trat 96hs	Dexametasona	15	0
<b>Stx2 + LPS</b>	<b>Inh, 1hr después Stx2, Trat 72hs</b>	<b>Dexametasona</b>	<b>15</b>	<b>0</b>
<b>Stx2 + LPS</b>	<b>Inh, 1hr después Stx2, Trat 72hs</b>	<b>Dexametasona</b>	<b>10</b>	<b>0</b>
Stx2 + LPS	Inh, 2hrs después Stx2, Luego tratamiento 96hs	Dexametasona	10	0
<b>Stx2 + LPS</b>	<b>Inh, 2hrs después Stx2, Luego tratamiento 96hs</b>	<b>Dexametasona</b>	<b>7,5</b>	<b>25</b>
<b>Stx2 + LPS</b>	<b>Inh, 2hrs después Stx2, Luego tratamiento 72hs</b>	<b>Dexametasona</b>	<b>20</b>	<b>25</b>

**Fig. 41 Dexametasona logra prevenir la citotoxicidad de Stx2**

Se detallan todos los protocolos ensayados con las diferentes sustancias. Cuando se indica tratamiento, el inhibidor fue suministrado a las 9hs y a las 16hs. El n por grupos fue de 6 animales. Se indica el porcentaje de supervivencia al 7mo día de iniciado el tratamiento.

De todas las sustancias y todas las concentraciones ensayadas la que dio mejor resultado fue la Dexametasona en frente a la acción de Stx2+LPS y de Stx2.

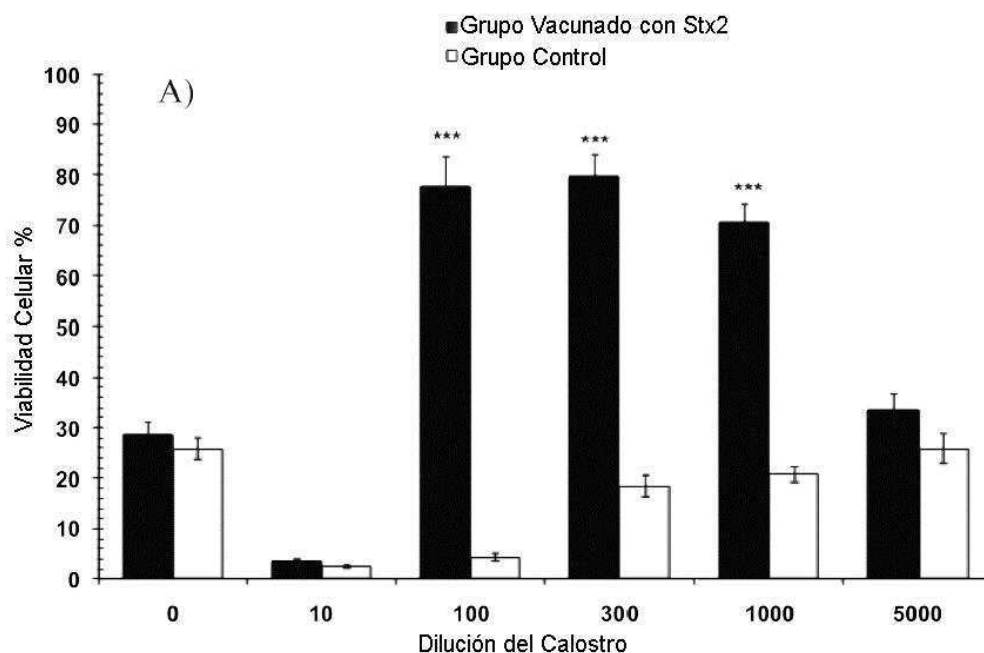
El L-name (inhibidor de la producción de ON) a las concentraciones utilizadas no logró producir una reducción de la mortalidad (Fig. 41). La Pentoxifilina (inhibidor de la fosfodiesterasa 4) tampoco logró producir cambios en la sobrevivencia de los ratones inyectados con Stx2.

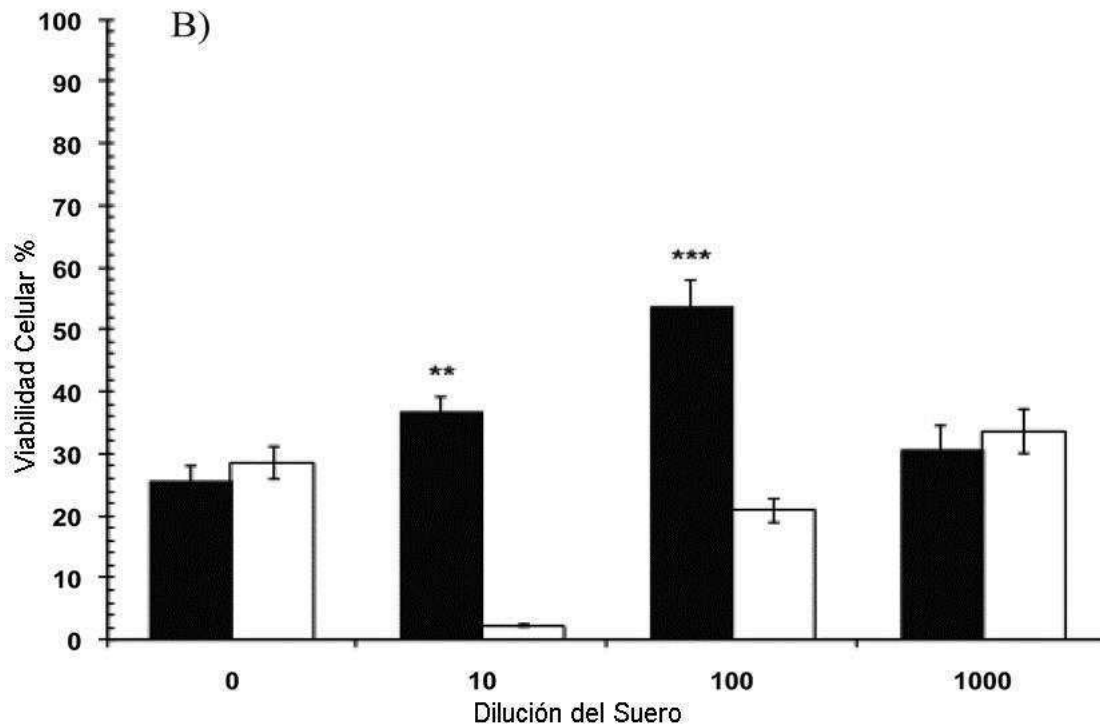
Se encontró que la Dexametasona aumenta la sobrevivencia de ratones de un 22 a 33% cuando es inyectada antes de la toxina Shiga y luego si el tratamiento continúa. La Dexametasona no produce efecto si es inyectada una sola vez (Fig. 41) o si es inyectada después de la toxina.

### ***Determinación de la capacidad Protectora de los anticuerpos anti Stx2 en vacunos***

Inoculamos vacas preñadas con Stx2 o con PBS y luego medimos la capacidad de neutralizar la Stx2 en células Vero por parte de los sueros y calostros tanto de la madre como de los terneros.

### **El calostro de vacas y el suero de terneros inhiben la citotoxicidad de Stx2 en células Vero**





**Fig. 43. El suero y calostro bovinos logran neutralizar la acción de Stx2 in vitro**

Neutralización de la toxicidad de Stx2 en células Vero por el calostro bovino (A) y el suero de ternero (B). Se incubó Stx2 con diferentes diluciones del calostro bovino o del suero de terneros por 1hr a 37°C. Se expresan los resultados como el porcentaje de viabilidad con respecto al control, se muestra la media y el error standard de la media de 3 experimentos realizados por sextuplicado (\*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ). Como control fue usado como control un pool del suero de Vacas Iniciales que no neutralizó el efecto de Stx2 (datos no mostrados)

El calostro de las vacas vacunadas con Stx2 y el suero de los terneros cuyas madres fueron vacunadas con Stx2 mostró una actividad neutralizante contra Stx2

( $P < 0.001$ ) comparado con los respectivos controles (tanto vacas vacunadas con Solución Fisiológica como las vacunadas con otra proteína no relacionada). (Fig. 43).

El calostro inhibió la citotoxicidad de Stx2 sobre células vero en una forma dosis dependiente. El efecto protector de calostro se observó cuando fue pre incubado con una dilución 1:100, 1:300 y 1:1000 de calostro (Fig. 43 A). En contraste el calostro del grupo control no tuvo ningún efecto neutralizante.

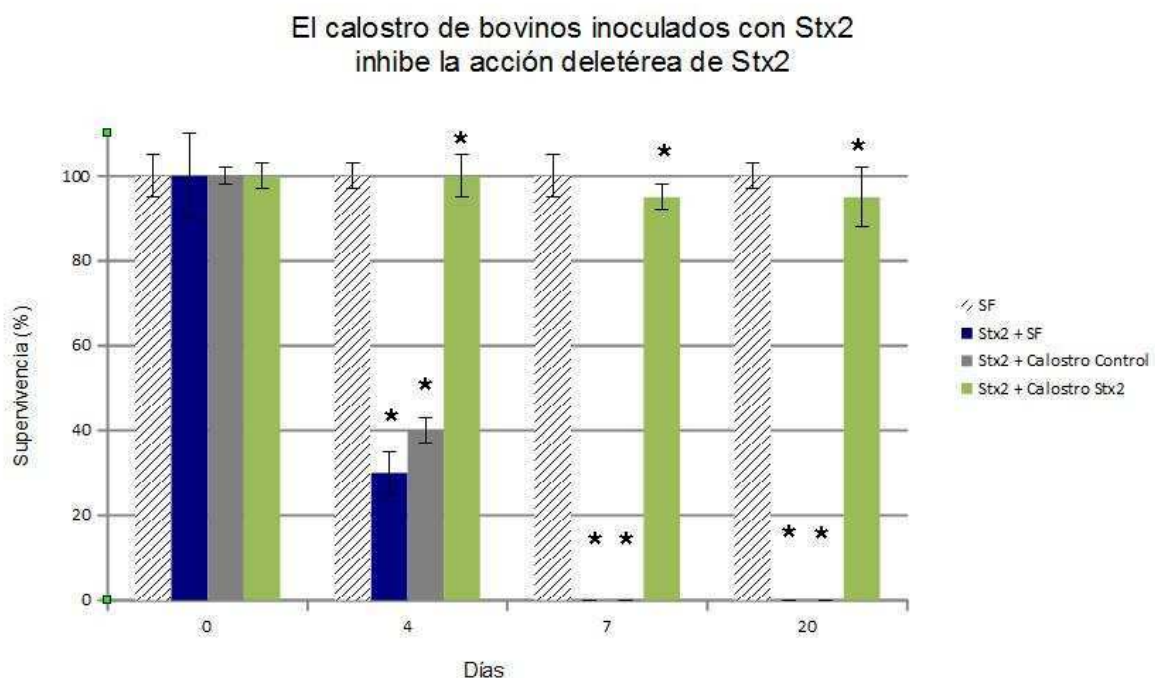
El calostro de ambos grupos a una concentración 1:10 aumentó la toxicidad dada por Stx2, esto sugiere que hay sustancias citotóxicas presentes en el mismo.

Cabe destacar que las vacas preñadas no mostraron niveles de anticuerpos anti Stx2 significativos (datos no mostrados).

El suero de terneros que fueron calostrados por sus madres inoculadas con Stx2 neutralizó la toxicidad de Stx2 en células Vero a las diluciones 1:10 y 1:100(Fig. 43 B). El mismo efecto no se observó en sueros de terneros calostrados con madres controles.

### El calostro de bovinos inoculados con Stx2 logra impedir la acción deletérea de Stx2 en ratones

Se estudió si el efecto inhibitorio demostrado in vitro en células Vero del calostro de bovinos inoculados con Stx2 podía repetirse in vivo, para ello se realizó un experimento de supervivencia.



**Fig. 44.** Los anticuerpos del suero y calostro de bovinos protegen a los ratones de la acción deletérea de Stx2.

Se incubó sol fisiológica (rayas), 2DL50 Stx2 + Sol. Fisiológica (azul), 2DL50 + Calostro de bovinos inoculados con Sol. Fisiológica (gris), 2DL50 + Calostro de bovinos inoculados con Stx2 (verde) durante 1 hora a 37°C. Luego se inyectó a 6 ratones por grupo y se midió la sobrevida de los mismos. Existen diferencias significativas entre la sobrevida de ratones inoculados con 2DL50Stx2 + Calostro SF y los inoculados con 2DL50 Stx2+ Calostro Stx2. La significancia se indica con (\*)  $P < 0.05$ . El experimento se realizó por duplicado.

El calostro de vacas inoculadas con Stx2 protegió a los ratones del efecto letal de Stx2 (Fig. 44, verde). Los animales inyectados con Stx2 + solución fisiológica murieron a los 7 días (gris), esto indica que la neutralización es específica para Stx2 y que esta no ocurre en los animales donde no se inoculó Stx2.

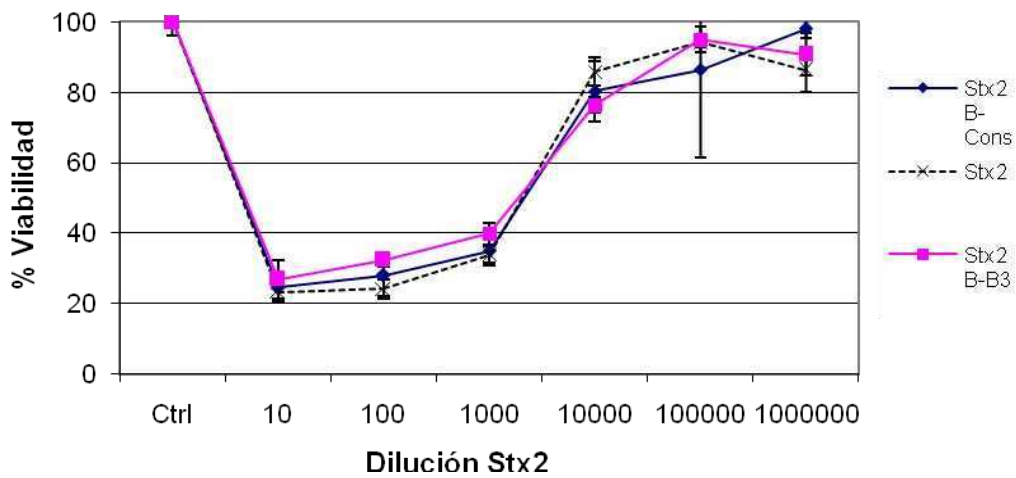
### **Los péptidos Stx2BCons y StxB-Mut no inhiben la acción citotóxica de Stx2 in vitro**

Se analizó el efecto de 100ng de péptidos sintéticos Stx2B-Cons y Stx2B-BMut sobre la citotoxicidad producida por Stx2 en células Vero (Fig. 45). Para ello se incubó durante 10min (Fig. 45 A), 30min (Fig. 45 B), o 3hrs (Fig. 45 C) el péptido Stx2B-Cons o Stx2B-B3 y luego de la incubación se agregó Stx2 en diferentes diluciones.

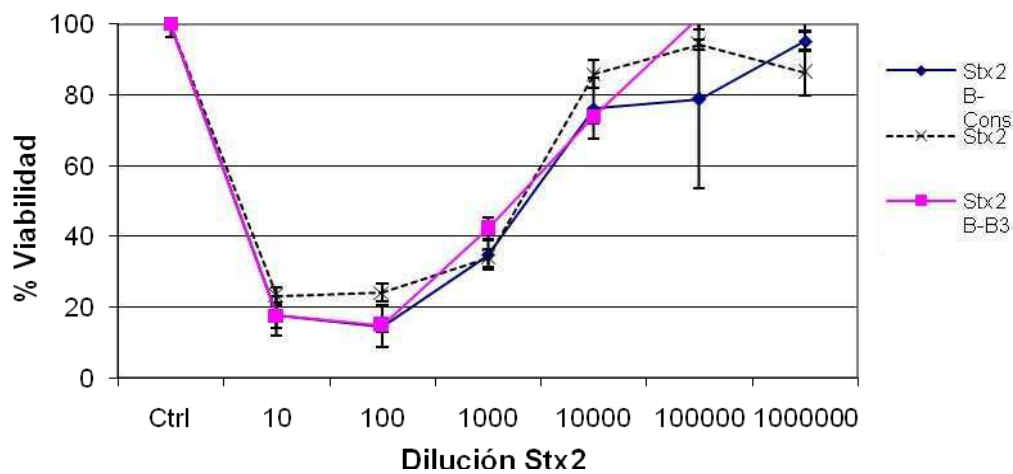
En ninguna de las diluciones ensayadas Stx2B-Cons o Stx2B-Bmut lograron disminuir la citotoxicidad causada por Stx2, lo que indica que no pudieron pegarse al receptor e impedir la entrada de Stx2 a las células.

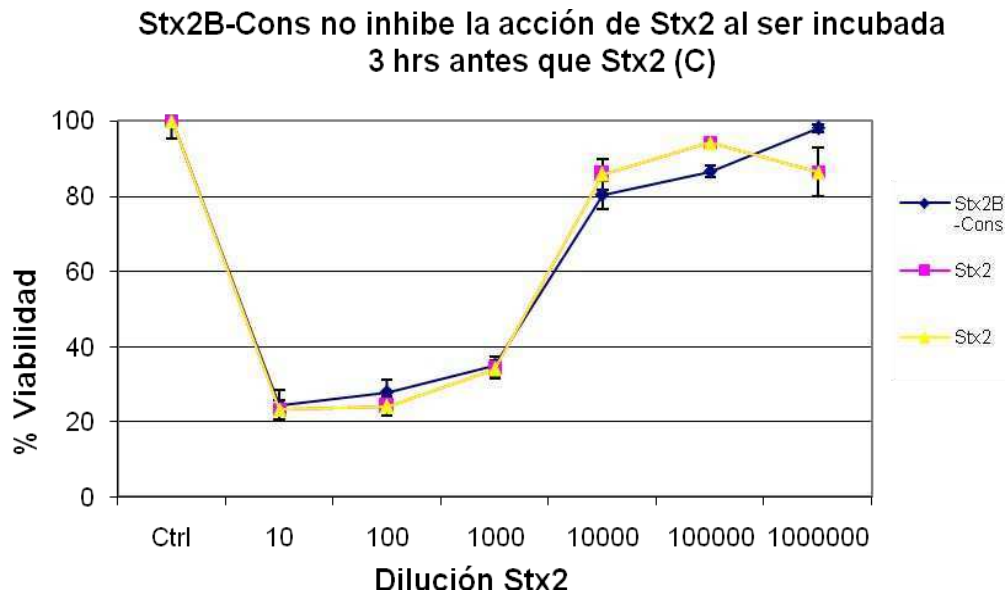
El mismo experimento se repitió lavando luego de la incubación con el péptido, con dosis diferentes a las probadas de los péptidos (10ng, 1ug) y con péptidos purificados por mí en el laboratorio dando idénticos resultados. Además se repitió el experimento incubando los péptidos con Stx2 dando resultados similares, nunca los péptidos lograron disminuir la acción de Stx2.

**Stx2B-Cons y Stx2B-B3 no inhiben la acción de Stx2 al ser agregados 10 minutos antes que Stx2 (A)**



**Stx2B-Cons y Stx2B-B3 no inhiben la acción de Stx2 al incubarse 30min antes que Stx2 (B)**





**Fig. 45. Stx2B-Cons y Stx2B-Bmut no inhiben la acción de Stx2 in vitro**

Se analizó la acción de la incubación previa de Stx2B-Cons y Stx2B-Bmut 10 minutos (A), 30 minutos (B), o 3 horas antes (C) de la incubación con Stx2 a diferentes diluciones ( $1 \cdot 10^{-1}$ ,  $1 \cdot 10^{-2}$ ,  $1 \cdot 10^{-3}$ ,  $1 \cdot 10^{-4}$ ,  $1 \cdot 10^{-5}$ ,  $1 \cdot 10^{-6}$ ) durante 1 hora. Luego se midió la viabilidad celular a las 72hs posteriores con el método de rojo neutro. Ni Stx2B-Cons ni Stx2B-Bmut inhibieron la acción de Stx2 (apreciable a todas las concentraciones que generaron citotoxicidad).

### **Los péptidos Stx2B, Stx2BMut y Stx2BCons no inhiben la acción citotóxica de Stx2 in vivo en ratones**

La idea central era analizar si estas mutantes podían unirse a GB3 y de esta manera bloquear la entrada de Stx2 a la célula.

Para ello inyectamos concentraciones diferentes de las mutantes (en un rango de 1ng/ratón a 500ng/ratón Stx2BCons, Stx2BMut y Stx2B) a diversos tiempos y luego desafiamos a los ratones con una dosis letal de Stx2.

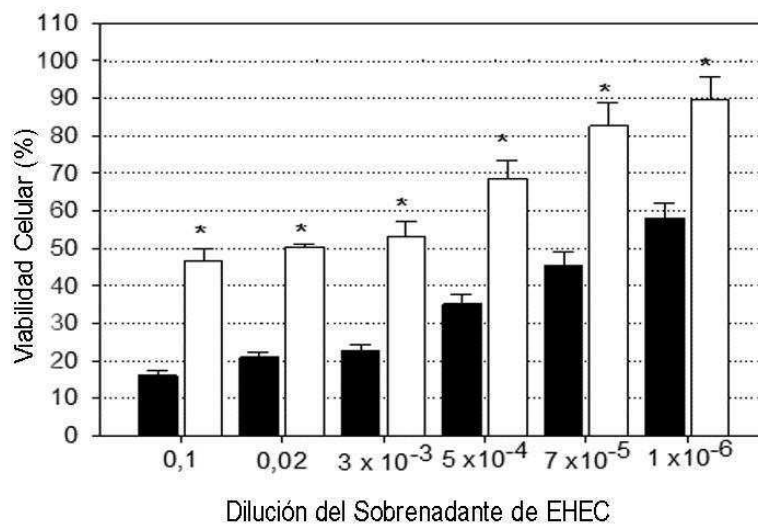
Ninguno de los experimentos realizados dio diferencias en la sobrevivencia, indicando que las mutantes no pudieron bloquear el efecto de la toxina in vivo.

### **Lb. plantarum logra inhibir la acción de Stx2**

Los cultivos de EHEC O147:H7 son citotóxicos para las células Vero tanto por los

métodos de MTT como por LDH.

Como mostramos en la siguiente figura, luego de un tratar a las células Vero por 48h con diferentes dosis de sobrenadante de EHEC indujo una respuesta de reducción de la proliferación de las células según MTT (columnas negras).



**Fig. 46. *Lb. plantarum* CIDCA 83114 inhibe la acción citotóxica del sobrenadante de EHEC O157:H7**

La proliferación celular en células Vero fue determinada por el método MTT descrito en los materiales y métodos. Se usó sobrenadante de EHEC 69160 (Columnas negras); *Lb. plantarum* CIDCA 83114 ( $10^7$  cfu por calle) incubado con sobrenadante de EHEC (columnas blancas). Existen diferencias significativas (\*) ( $P < 0,05$ ) entre la acción del sobrenadante de EHEC incubado con o sin *Lb. plantarum*.

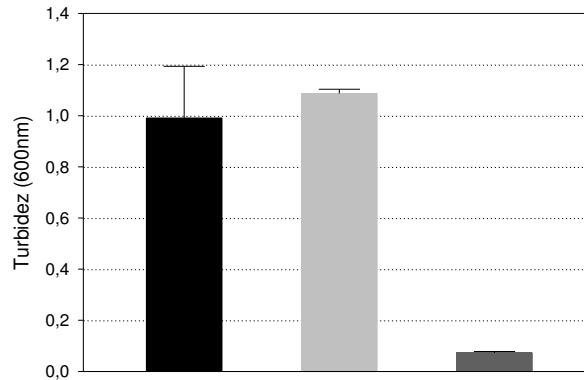
La presencia de  $10^7$  cfu/calle de *Lb. plantarum* CIDCA 83114 disminuyó el daño celular demostrado por un aumento significativo de la viabilidad celular (Fig. 46) (columnas blancas).

La citotoxicidad de los sobrenadantes de EHEC sobre las células Vero se puede atribuir a la acción combinada de Stx2 y hemolisina, ambas producidas por las cepas de este trabajo (*stx-hly*).

Para dilucidar si ambos factores extracelulares son los responsables de la citotoxicidad sobre las células Vero, se detectó la expresión de hemolisina de EHEC O157:H7 mediante el ensayo de hemólisis como se muestra en la figura 2



el porcentaje de hemólisis (Fig. 47) producido por los sobrenadantes de EHEC no fue significativo ( $7.12 \pm 1.26 \%$ ,  $n=6$ )



**Fig. 47. El sobrenadante de EHEC O157:H7 no posee actividad hemolítica**

Actividad hemolítica de EHEC O157:H7. El sobrenadante bacteriano de EHEC (diluido al medio) fue incubado durante 1hr a 37 °C con un 3% de glóbulos rojos (columna negra). Se muestran los controles de glóbulos rojos solos (columna gris claro) y hemólisis total (gris oscuro).

### **Diferentes cepas de Lactobacilli pueden antagonizar los efectos asociados con Stx2**

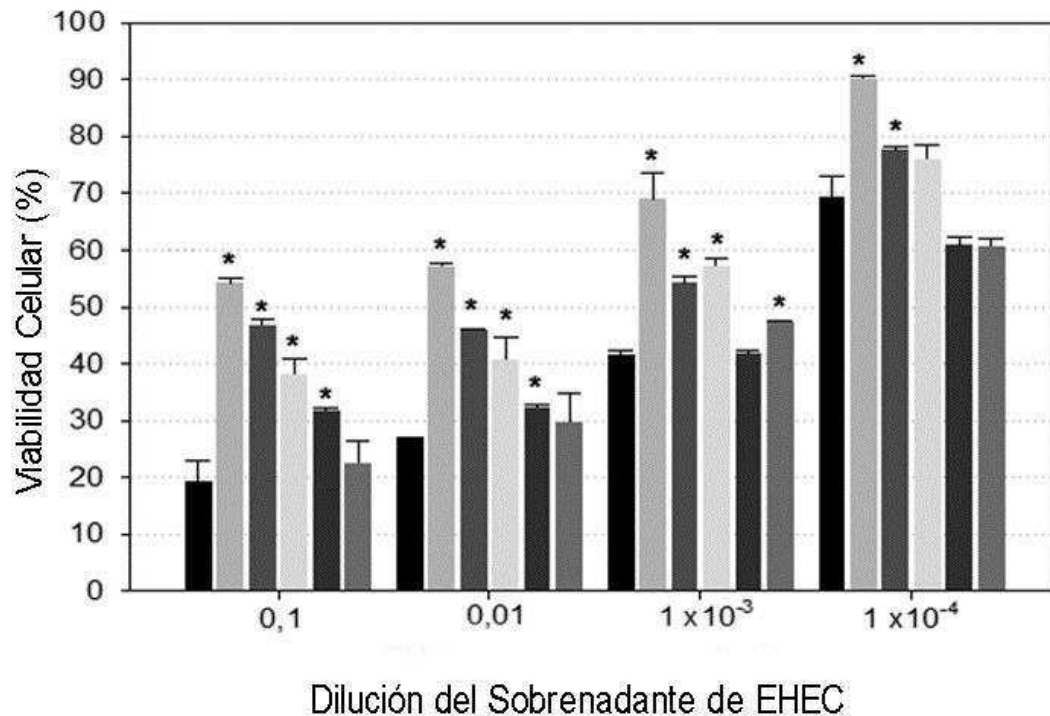
Se estudió que cepas de Lactobacilli tenían la capacidad de inhibir los efectos citotóxicos asociados con Stx2. En la Fig. 3 se muestra que la inhibición de Stx2 es dependiente de la cepa de Lactobacilli utilizada.

Ambas cepas, *Lb. plantarum* CIDCA 83114 y CIDCA 8336 fueron efectivas para proteger a las células Vero de los efectos citotóxicos causados por el sobrenadante de EHEC en todas las concentraciones usadas.

Mientras que las otras tres cepas, pertenecientes a *Lb. kefir* (CIDCA 8348, CIDCA 8321 y CIDCA 83113) y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (LBR), no produjeron una reducción del efecto citotóxico causado por el sobrenadante de EHEC en células Vero.

Se observó el mismo efecto protector de la cepa CIDCA 83114 contra el efecto citotóxico asociado con los sobrenadantes de EHEC mediante la liberación de la

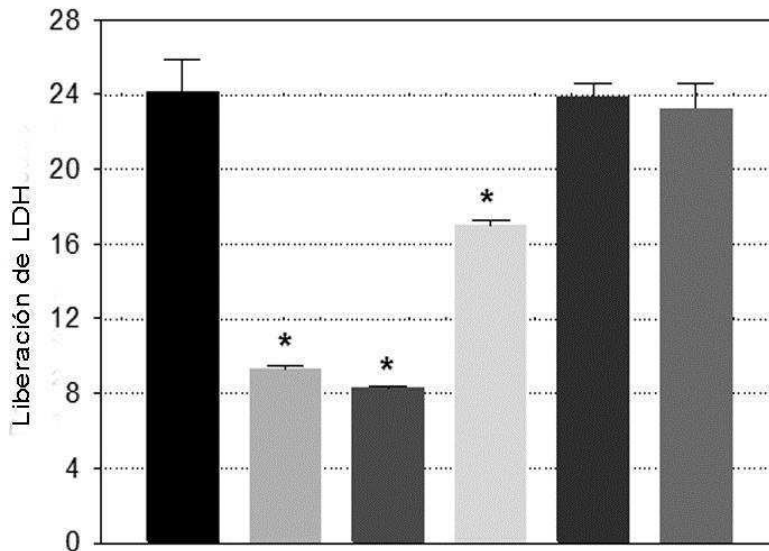
dehidrogenasa láctica (DHL). La DHL es una enzima intracelular que cataliza la oxidación del NADH<sub>2</sub>, su presencia en el medio extracelular es un indicador de daño celular<sup>320</sup>.



**Fig. 48. Diferentes cepas de lactobacilli logran neutralizar el efecto del sobrenadante de EHEC O157:H7**

Efecto de las diferentes cepas de lactobacilli ( $10^7$  cfu por calle) en la acción citotóxica sobre células Vero de diferentes dosis del sobrenadante de EHEC O157:H7. La proliferación celular se determinó por MTT. Se muestra sobrenadante de EHEC (■) o co-incubado con *Lb. plantarum* CIDCA 83114 (□); *Lb. plantarum* CIDCA8336 (▒); *Lb. kefir* CIDCA 8348 (○); *Lb. kefir* CIDCA 83113 (■); *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA LBR (▒). \*P<0.05 es significativo comparado con el resultado de las células Vero expuestas al sobrenadante de EHEC solo.

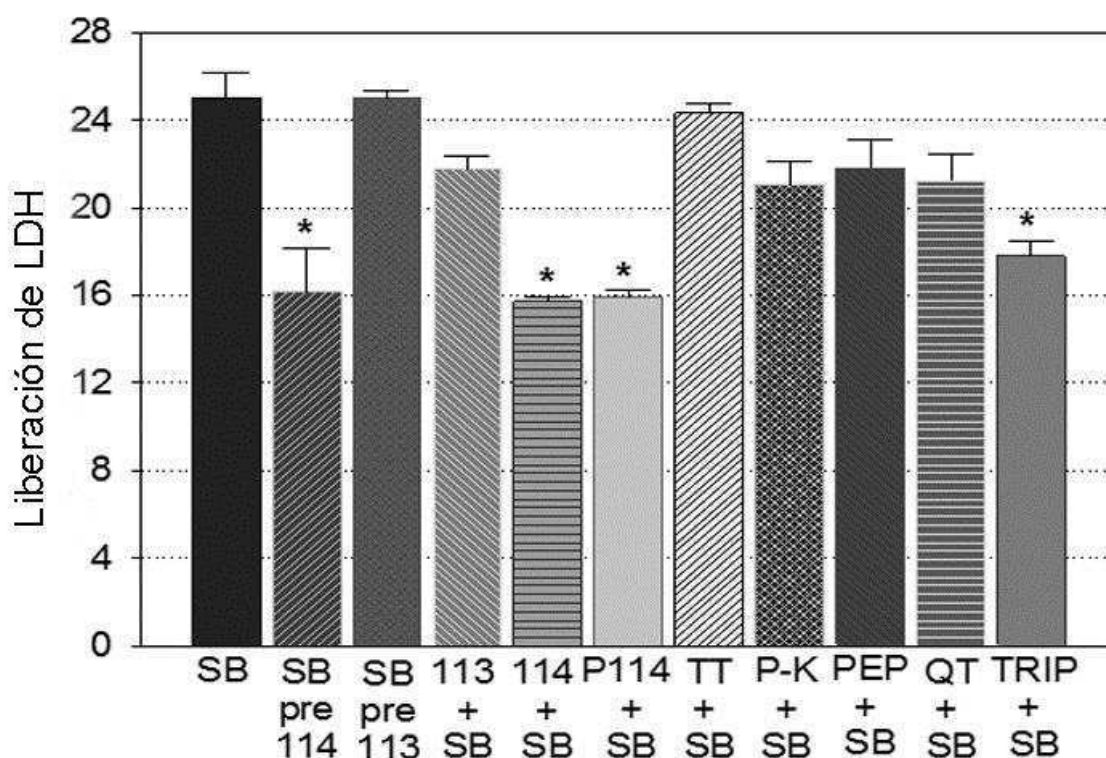
*Lb. plantarum* CIDCA 83114 y 8336 y *Lb. kefir* CIDCA 8348 protegen a las células Vero del daño causado por el sobrenadante de EHEC mientras que *Lb. kefir* CIDCA 83113 y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIDCA LBR no tienen el mismo efecto (Fig. 49).



**Fig. 49. Diferentes cepas de lactobacilli logran neutralizar el efecto del sobrenadante de EHEC O157:H7**

Efecto de diferentes cepas de lactobacilli sobre la acción citotóxica del sobrenadante de EHEC O157:H7 en células Vero. El daño celular fue determinado por LDH. El sobrenadante de EHEC fue usado en una dilución 0,02 y los lactobacilli a  $10^7$  cfu/ml. El sobrenadante de EHEC solo (■) o con combinado con *Lb. plantarum* CIDCA83114 (□); *Lb. plantarum* CIDCA8336 (■); *Lb. kefir* CIDCA 8348 (□); *Lb. kefir* CIDCA 83113 (■); *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LBR (■). \*P < 0.05 fue significativo comparado con las células Vero expuestas al sobrenadante de EHEC.

La figura 50 muestra los resultados obtenidos cuando *Lb. plantarum* CIDCA 83114 fue preincubado o co-incubada con el sobrenadante de EHEC antes de testear la liberación de LDH en células Vero. La inactivación térmica o la pre-incubación de la cepa 83114 con enzimas proteolíticas, proteinasa K, pepsina y quimiotripsina producen una disminución significativa del efecto protector. Este resultado indica que algunos péptidos termosensibles presentes en la superficie de *Lb. plantarum* CIDCA 83114 están relacionados con el efecto antagonista contra Stx2. Estos péptidos pueden ser resistentes a las enzimas proteolíticas como la tripsina, ya que esta enzima no produjo una disminución de la capacidad protectora.



**Fig. 50. Las paredes células de *Lb. Plantarum* CIDCA 83114 y *Lb. Kefir* CIDCA 83113 logran inhibir el daño citotóxico producido por el sobrenadante de EHEC O157:H7**

Se muestra el efecto de *Lb. plantarum* CIDCA 83114, *Lb. kefir* CIDCA 83113 y sus paredes bacterianas en la acción citotóxica del sobrenadante de EHEC O157:H7 sobre células Vero. El daño celular fue determinado por LDH. El efecto producido por EHEC (■) o con la incubación previa con *Lb. plantarum* CIDCA 83114 (▧); *Lb. kefir* CIDCA 83113 (▣) o con-incubado con *Lb. kefir* CIDCA 83113 (▨); *Lb. plantarum* CIDCA 83114 (▩); paredes bacterianas de *Lb. plantarum* CIDCA 83114 no-tratados (□); tratados a 100 °C por 10 min y co incubado con sobrenadante de EHEC (▤); *Lb. plantarum* CIDCA 83114 tratado con proteinasa k y co-incubado con sobrenadante de EHEC (▥); *Lb. plantarum* CIDCA 83114 tratado con pepsina y co-incubado con sobredanante de EHEC (▦); *Lb. plantarum* CIDCA tratado con α-quimotripsina y co-incubado con sobrenadante de EHEC (▧); *Lb. plantarum* tratado con tripsina y co-incubado con sobrenadante de EHEC (▨). Se encontraron diferencias significativas (\*) ( $P < 0,05$ ) entre la cantidad de DHL liberada por las células Vero incubadas con sobrenadante de EHEC con y sin tratamiento.

La protección contra el efecto citotóxico causado por el sobrenadante de EHEC también se observó cuando cantidades equivalentes de pared celular de la cepa

83114 fueron co-incubadas con el sobrenadante de EHEC (Fig. 50).

## Conclusiones

En este capítulo nos abocamos a la investigación de diversas sustancias capaces de inhibir la acción de Stx2.

## Antinflamatorios

En primer lugar observamos que el nivel de TNF $\alpha$  aumenta tanto en el cerebro como en el suero de ratones inyectados con Stx2. No existe otro reporte del nivel de esta citoquina en cerebro de ratones al administrar la toxina, si bien existen reportes del nivel de TNF al inocular con O157:H7.<sup>321</sup>

Si una de las causas mayores de muerte en los ratones por la administración de Stx2 es inflamación en neuronas entre otras consecuencias, entonces la administración de anti-inflamatorios e inhibidores de factores que inducen inflamación podría ser una buena estrategia para inhibir la muerte causada por Stx2.

Para analizar esta hipótesis se evaluó la sobrevivencia de los ratones bajo dosis letales de Stx2 y siendo inoculados con: L-Name, Dexametasona, Etanercept y Pentoxifilina. Se probaron más de 10 protocolos diferentes. Encontramos que la Dexametasona aumenta la sobrevivencia de ratones entre un 25 y 33% cuando es inyectada antes de Stx2 y el tratamiento se mantiene al menos 48hs.

Se ha reportado que la Dexametasona reduce la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en ratones. En la bibliografía solo 2 autores reportaron resultados positivos con antiinflamatorios, uno en conejos<sup>322</sup> y otros en un modelo en ratón<sup>323</sup>. En conejos con una dosis de 36mg/kg en pulsos se logró reducir la tasa de mortalidad al 80% de los conejos luego de 18 días.

En ratones la combinación de Pentoxifilina y Rolipram en una dosis de 7.5mg/kg,

aplicada 2 veces diarias durante 3 días logró obtener un 63% de tasa de supervivencia a la infección, cuando los antiinflamatorios son administrados 1 día antes del comienzo de la producción de Stx2 por parte de EHEC.

Algunos investigadores han mostrado que las citoquinas inflamatorias como TNF- $\alpha$  y IL-1b son capaces de aumentar la toxicidad en las células endoteliales<sup>324325</sup>, además se ha reportado que TNF- $\alpha$  en tejidos pero no en el suero es lo que contribuye a la patogenicidad del daño cerebral causado por Stx2<sup>326</sup>.

En el parénquima de conejos tratados con Stx2 se observó una regulación positiva de Tnf- $\alpha$ <sup>327</sup> además se ha reportado que la inoculación intratecal de Il-1b en ratas lleva a un aumento de la permeabilidad en la barrera hematoencefálica<sup>328</sup>.

En este trabajo analizamos mediante los niveles de Tnf- $\alpha$  en suero y en homogenatos de cerebros y encontramos una regulación positiva en los animales tratados con dosis letales de Stx2. Tanto en suero como en cerebro de ratones desafiados con una dosis letal de Stx2 se produce una rápida producción de Tnf- $\alpha$ .

### **Producción de Anticuerpos contra Stx2 e inmunización pasiva**

Observamos un título neutralizante para Stx2 en el calostro de vacas vacunadas con Stx2 y en el calostro de los terneros que se alimentaron con él. Mostramos que el calostro con un alto título de anticuerpos puede obtenerse al inmunizar vacas con Stx2 y que los anticuerpos se transfieren a los terneros mediante el calostro.

Además mostramos como el calostro es capaz de proteger in vivo a ratones desafiados con la toxina Shiga.

El calostro immune puede ser una alternativa para proteger a los terneros de la colonización temprana por *E. coli* O157: H7 y una posible fuente de anticuerpos para bloquear la colonización y la actividad tóxica de la bacteria en el intestino humano.

## Probióticos

*Lactobacillus plantarum* aislado de Kefir protegió a las células Vero de la citotoxicidad de Stx2 proveniente de O157:H7. Mostramos que en la superficie de *Lb. plantarum* CIDCA 83114 hay péptidos termo sensibles involucrados en el efecto antagonista contra el sobrenadante de EHEC, conteniendo Stx2.

Anteriormente se había reportado que la administración de lactobacilli podría disminuir la colonización de EHEC en el rumen y las heces<sup>329</sup>.

Aunque algunos estudios mostraron la inhibición de la toxicidad, muy poco se ha demostrado sobre los mecanismos por los cuales las cepas probióticas ejercen su acción sobre EHEC.

Existen reportes sobre la habilidad de que ciertas cepas probióticas (*B. pseudolongum* ATCC 25526; *L. acidophilus* La-5; *L. gasseri* K7; *L. plantarum* CIDCA 83114) pueden disminuir la asociación de EHEC a células epiteliales como las Caco-2 y Hep-2<sup>330</sup>.

Se ha demostrado que cepas específicas de *Lactobacillus* pueden antagonizar los mecanismos de virulencia de EHEC<sup>331</sup>, tanto modificando el microambiente o interfiriendo en la cascada de señales gatilladas por el patógeno. Lisados *Lb. acidophilus* han sido capaces de atenuar la virulencia de Stx2 in vitro en células Vero<sup>332</sup>. La incubación de EHEC O157:H7 con ciertas cepas de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Pediococcus* produjo una regulación negativa de *stx2A* luego de 2hrs de coincubación<sup>333</sup>. Un resultado similar se encontró in vivo<sup>334</sup>, cepas de *Bifidobacterium breve* y *B. pseudocatenulatum* produjeron una inhibición en ratones BALB/C de la expresión de Stx2. En ambos trabajos se atribuyó la regulación negativa de Stx2 a la disminución del pH debido a la liberación de ácido láctico y acético de las bacterias probióticas.

*Lb. plantarum* CIDCA 83114 puede ser utilizada como una posible herramienta de protección preventiva debido a la capacidad mostrada en este capítulo de inhibir la acción de los sobrenadantes de EHEC O157:H7.

## **Mutantes**

En este trabajo expresamos y purificamos Stx2B y diversas mutantes de la subunidad Stx2B como Stx2BCons y StxBMut, éstas comprendían diversas secciones de la subunidad B de Stx2B. El objetivo era probar si estas mutantes podían unirse a Gb3 y de esta manera bloquear el efecto citotóxico de Stx2. Para ello se inyectaron ratones con Stx2 y luego se inyectaron diferentes concentraciones de las mutantes a diversos tiempos. No se obtuvieron diferencias en la sobrevida, indicando que las mutantes no pudieron bloquear el efecto de la toxina in vivo.

Además probamos el efecto de las mutantes y de Stx2B en células sensibles a la toxina y en este caso tampoco se encontraron hubo diferencias significativas. La razón debemos buscarla quizás en la velocidad de pegado de Stx2 a su receptor Gb3. Evidentemente ni Stx2B ni las mutantes fueron capaces de impedir el pegado de Stx2 a Gb3 y bloquear de esta manera la entrada a las células.



## **Conclusiones Finales y Perspectivas Futuras**

En este trabajo reportamos por primera vez la localización del receptor Gb3 en condiciones normales y su regulación positiva por parte de la toxina Shiga tipo 2 en cerebro de rata. Esta regulación positiva se ha observado por otros autores en el mismo modelo de rata lo que le otorga mayor respaldo a nuestro estudio<sup>335</sup>.

En el estudio de un modelo subletal de acción de Stx2 en ratones, observamos disrupción de la barrera hematoencefálica, edema astrocitaria, neurodegeneración, apoptosis de oligodendrocitos, sinapsis tripartita y extravasación de mastocitos lo que puede explicar las alteraciones comportamentales observadas. Además nuestro trabajo describió por primera vez los cambios comportamentales que se producen debido a la toxina Shiga.

En la búsqueda de posibles agentes terapéuticos encontramos que anticuerpos producidos en bovinos, sobrenadantes de *Lb. Plantarum* y Dexametasona tienen la capacidad de neutralizar el efecto de Stx2. A continuación sería positivo estudiar el efecto de estos inhibidores en el nivel de expresión de las principales citoquinas como TNF y Il-1 para dilucidar el mecanismo de acción de los mismos y evaluar el efecto de los inhibidores en los principales marcadores celulares como Gb3, GFAP, NeuN y otros.

Esperamos que los experimentos realizados en esta tesis sean un aporte para comprender el efecto de la toxina Shiga tipo 2 en el sistema nervioso.

## Bibliografía

---

- <sup>1</sup>Valles, P.G., Pesle, S., Piovano, L., Davila, E., Peralta, M., Principi, I., Lo, Giudice P., (2005) Post diarrheal Shiga toxin-mediated hemolytic uremic syndrome similar to septic shock. *Medicina* 65, 395–401.
- <sup>2</sup>Eriksson, K.J., Boyd, S.G., Tasker, R.C., 2001. Acute neurology and neurophysiology of haemolytic–uraemic syndrome. *Arch. Dis. Child.* 84, 434–435.
- <sup>3</sup>K J Eriksson, S G Boyd, R C Tasker (2001) Acute neurology and neurophysiology of haemolytic-uraemic syndrome. *Archives of Disease in Childhood* 84:434-435;
- <sup>4</sup>Shiga, K. (1898) *Zentralbl. Bakteriol. Orig.* 24, 913-918
- <sup>5</sup>Konowalchuk, J., J. I. Speir, y S. Stavric. (1977). Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 18:775-779.
- <sup>6</sup>Lord, J.M., Roberts, L.M., Lencer, W.I., 2005. Entry of protein toxins into mammalian cells by crossing the endoplasmic reticulum membrane: co-opting basic mechanisms of endoplasmic reticulum-associated degradation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 300, 149–168.
- <sup>7</sup> Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL (2005) Shiga-toxinproducing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* 365:1073–1086
- <sup>8</sup> A. D. O'Brien and R. K. Holmes, "Shiga and Shiga-like toxins," *Microbiological Reviews*, vol. 51, no. 2, pp. 206–220, 1987.
- <sup>9</sup> S. X.Wen, L.D. Teel, N. A. Judge, and A. D. O'Brien, (2006) "Genetic toxoids of Shiga toxin types 1 and 2 protect mice against homologous but not heterologous toxin challenge," *Vaccine*, vol. 24, no. 8, pp. 1142–1148.
- <sup>10</sup>O'brien A, Marques L, Kerry C, Newland J, Holmes R (1988) Shiga-like toxin converting phage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strain 933, *Microbial Pathogenesis*, 6, 381-390
- <sup>11</sup>Neely, M. N., and D. I. Friedman. 1998. Arrangement and functional identification of genes in the regulatory region of lambdoid phage H-19B, a carrier of a Shiga-like toxin. *Gene* 223:105-113.
- <sup>12</sup>Plunkett, G., III, D. J. Rose, T. J. Durfee, and F. R. Blattner. (1999). Sequence of Shiga toxin 2 phage 933W from *Escherichia coli* O157:H7: Shiga toxin as a phage late-gene product. *J. Bacteriol.* 181:1767-177
- <sup>13</sup>Johnson, A. D., A. R. Poteete, G. Lauer, R. T. Sauer, G. K. Ackers, and M. Ptashne. (1981).  $\lambda$  repressor and cro-components of an efficient molecular switch. *Nature* 294:217-223.
- <sup>14</sup>Kimmit PT, Harwood CR, Barer MR. (2000) Toxin gene expression by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the role of antibiotics and the bacterial SOS response. *Emerg Infect Dis* 2000; 6:458–65
- <sup>15</sup>Grif K, Dierich MP, Karch H, Allerberger F. Strain-specific differences in the amount of Shiga toxin released from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 following exposure to subinhibitory concentrations of antimicrobial agents. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; 17: 761–66.
- <sup>16</sup>Caletti MG, Petetta D, Jaitt M, et al. Hemolytic uremic syndrome (HUS): medical and social costs of treatment. *Medicina (B Aires)* 2006; 66(Suppl 3):22-26.
- <sup>17</sup>Lord, J.M., Roberts, L.M., Lencer, W.I., 2005. Entry of protein toxins into mammalian cells by crossing the endoplasmic reticulum membrane: co-opting basic mechanisms of endoplasmic reticulum-associated degradation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 300, 149–168.

- 
- <sup>18</sup>Jackson M, Neill R, O'Brien AD, Holmes R, Newland J (1987) Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from E coli 933. *FEMS Microbiol Lett* 44:109-4.
- <sup>19</sup>Crystal structure of the holotoxin from *Shigella dysenteriae* at 2.5 Å resolution
- <sup>20</sup>Gallegos KM, Conrady DG, Karve SS, Gunasekera TS, Herr AB, Weiss AA. (2012) Shiga Toxin binding to glycolipids and glycans. *PLoS One*. 7(2):e30368.
- <sup>21</sup>Bitzan M, Karch H, Altrogge H, Strehlau J, Blaker F. Hemolytic-uremic syndrome associated with a variant Shiga-like cytotoxin of *Escherichia coli* O111. *Pediatr Infect Dis J*. 1988;7(2):128–132.
- <sup>22</sup>Scotland SM, Willshaw GA, Smith HR, Rowe B. Properties of strains of *Escherichia coli* belonging to serogroup O157 with special reference to production of Vero cytotoxins VT1 and VT2. *Epidemiol Infect*. 1987;99(3):613–624.
- <sup>23</sup>Melton-Celsa AR, Kokai-Kun JF, O'Brien AD (2002) Activation of Shiga toxin type 2d (Stx2d) by elastase involves cleavage of the C-terminal two amino acids of the A2 peptide in the context of the appropriate B pentamer. *Mol Microbiol*; 43: 207-15.
- <sup>24</sup>Cimolai, N., and Carter, J. E. (1998). Bacterial genotype and neurological complications of *Escherichia coli* O157:H7-associated haemolytic uraemic syndrome. *Acta Paediatr*. 87, 593–594.
- <sup>25</sup>Ostroff, S. M., Tarr, P. I., Neill, M. A., Lewis, J. H., Hargrett-Bean, N., and Kobayashi, J. M. (1989). Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic sequelae in *Escherichia coli* O157:H7 infections. *J. Infect. Dis*. 160, 994–998.
- <sup>26</sup>Martin & Beutin (2011) Characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from meat and milk products of different origins and association with food producing animals as main contamination sources, *International Journal of Food Microbiology* Volume 146, Issue 1, 15
- <sup>27</sup> <http://www.rki.de> (boletín epidemiológico del Robert-Koch-Institute)
- <sup>28</sup>Scheutz F, Møller Nielsen E, Frimodt-Møller J, Boisen N, Morabito S, Tozzoli R, Nataro JP, Caprioli A. (2011) Characteristics of the enteroaggregative Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strain causing the outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, *Euro Surveill*. ;16(24)
- <sup>29</sup>Gianantonio C, Vitacco M, Mendilaharsu F, Ruttly A, Mendilaharsu J. (1964) The Hemolytic-Uremic Syndrome. *J Pediatr* 64: 478-91.
- <sup>30</sup> Repetto HA, (2005): Long-term course and mechanisms of progression of renal disease in hemolytic uremic syndrome. *Kidney Internat*; 97: S102-S106.
- <sup>31</sup>Spears KJ, Roe AJ, Gally DL. A comparison of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 255: 187-202.
- <sup>32</sup>Spears KJ, Roe AJ, Gally DL. A comparison of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 255: 187-202.
- <sup>33</sup> Jacewicz MS, Acheson DW, Binion DG, West GA, Lincicome LL, Fiocchi C, Keusch GT. (1999) Responses of Human Intestinal Microvascular Endothelial Cells to Shiga Toxins 1 and 2 and Pathogenesis of Hemorrhagic Colitis *Infect Immun*. 67(3):1439-44.
- <sup>34</sup> Repetto HA. Long-term course and mechanisms of progression of renal disease in hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int Suppl* 2005; 97:S102-106.

- 
- <sup>35</sup> Nataro JP, Kaper JB. (1998) Diarrheogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 11(1):142-201.
- <sup>36</sup> Lopez, E. L., Diaz, M., Grinstein, S., Devoto, S., Mendilaharsu, F., Murray, B. E., Ashkenazi, S., Rubaglio, E., Woloj, M., Vasquez, M., et al. (1989). Hemolytic uremic syndrome and diarrhea in Argentine children: The role of Shiga-like toxins. *J. Infect. Dis.* 160, 469–475.
- <sup>37</sup> 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.
- <sup>38</sup> Valles, P.G., Pesle, S., Piovano, L., Davila, E., Peralta, M., Principi, I., Lo, Giudice P., 2005. Postdiarrheal Shiga toxin-mediated hemolytic uremic syndrome similar to septic shock. *Medicina* 65, 395–401.
- <sup>39</sup> Gianantonio, C. A., Vitacco, M., Mendilaharsu, F., Gallo, G. E., and Sojo, E. T. (1973). The hemolytic-uremic syndrome. *Nephron* 11, 174–192.
- <sup>40</sup> Cimolai, N., Morrison, B. J., and Carter, J. E. (1992). Risk factors for the central nervous system manifestations of gastroenteritis-associated hemolytic-uremic syndrome. *Pediatrics* 90, 616–621.
- <sup>41</sup> Garg, A. X., Suri, R. S., Barrowman, N., Rehman, F., Matsell, D., Rosas-Arellano, M. P., Salvadori, M., Haynes, R. B., and Clark, W. F. (2003). Long-term renal prognosis of diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression. *JAMA* 290, 1360–1370.
- <sup>42</sup> Cimolai, N., and Carter, J. E. (1998). Bacterial genotype and neurological complications of *Escherichia coli* 157:H7-associated haemolytic uraemic syndrome. *Acta Paediatr.* 87, 593–594.
- <sup>43</sup> Ostroff, S. M., Tarr, P. I., Neill, M. A., Lewis, J. H., Hargrett-Bean, N., and Kobayashi, J. M. (1989). Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic sequelae in *Escherichia coli* O157:H7 infections. *J. Infect. Dis.* 160, 994–998.
- <sup>44</sup> Gerber, A., Karch, H., Allerberger, F., Verweyen, H. M., and Zimmerhackl, L. B. (2002). Clinical course and the role of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in the hemolytic-uremic syndrome in pediatric patients, 1997-2000, in Germany and Austria: a prospective study. *J. Infect. Dis.* 186, 493–500.
- <sup>45</sup> 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.
- <sup>46</sup> Gianantonio, C. A., Vitacco, M., Mendilaharsu, F., Gallo, G. E., and Sojo, E. T. (1973). The hemolytic-uremic syndrome. *Nephron* 11, 174–192.
- <sup>47</sup> 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.
- <sup>48</sup> Gianantonio, C. A., Vitacco, M., Mendilaharsu, F., Gallo, G. E., and Sojo, E. T. (1973). The hemolytic-uremic syndrome. *Nephron* 11, 174–192.
- <sup>49</sup> Upadhyaya, K., Barwick, K., Fishaut, M., Kashgarian, M., and Siegel, N. J. (1980). The importance of nonrenal involvement in hemolytic-uremic syndrome. *Pediatrics* 65, 115–120.
- <sup>50</sup> 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.

- 
- <sup>51</sup> Taylor, C. M., White, R. H., Winterborn, M. H., and Rowe, B. (1986). Haemolytic-uraemic syndrome: clinical experience of an outbreak in the West Midlands. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)* 292, 1513–1516.
- <sup>52</sup> Bale, J. F., Jr., Brasher, C., and Siegler, R. L. (1980). CNS manifestations of the hemolyticuremic syndrome. Relationship to metabolic alterations and prognosis. *Am. J. Dis. Child.* 134, 869–872.
- <sup>53</sup> Sheth, K. J., Swick, H. M., and Haworth, N. (1986). Neurological involvement in hemolyticuremic syndrome. *Ann. Neurol.* 19, 90–93.
- <sup>54</sup> Taylor, C. M., White, R. H., Winterborn, M. H., and Rowe, B. (1986). Haemolytic-uraemic syndrome: clinical experience of an outbreak in the West Midlands. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)* 292, 1513–1516.
- <sup>55</sup> Upadhyaya, K., Barwick, K., Fishaut, M., Kashgarian, M., and Siegel, N. J. (1980). The importance of nonrenal involvement in hemolytic-uremic syndrome. *Pediatrics* 65, 115–120.
- <sup>56</sup> Sheth, K. J., Swick, H. M., and Haworth, N. (1986). Neurological involvement in hemolyticuremic syndrome. *Ann. Neurol.* 19, 90–93.
- <sup>57</sup> Upadhyaya, K., Barwick, K., Fishaut, M., Kashgarian, M., and Siegel, N. J. (1980). The importance of nonrenal involvement in hemolytic-uremic syndrome. *Pediatrics* 65, 115–120.
- <sup>58</sup> Gianantonio, C. A., Vitacco, M., Mendilaharsu, F., Gallo, G. E., and Sojo, E. T. (1973). The hemolytic-uremic syndrome. *Nephron* 11, 174–192.
- <sup>59</sup> Sheth, K. J., Swick, H. M., and Haworth, N. (1986). Neurological involvement in hemolyticuremic syndrome. *Ann. Neurol.* 19, 90–93.
- <sup>60</sup> DiMario, F. J., Jr., Bronte-Stewart, H., Sherbotie, J., and Turner, M. E. (1987). Lacunar infarction of the basal ganglia as a complication of hemolytic-uremic syndrome. MRI and clinical correlations. *Clin. Pediatr. (Phila.)* 26, 586–590.
- <sup>61</sup> Jeong, Y. K., Kim, I. O., Kim, W. S., Hwang, Y. S., Choi, Y., and Yeon, K. M. (1994). Hemolytic uremic syndrome: MR findings of CNS complications. *Pediatr. Radiol.* 24, 585–586.
- <sup>62</sup> Signorini, E., Lucchi, S., Mastrangelo, M., Rapuzzi, S., Edefonti, A., and Fossali, E. (2000). Central nervous system involvement in a child with hemolytic uremic syndrome. *Pediatr. Nephrol.* 14, 990–992.
- <sup>63</sup> 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.
- <sup>64</sup> Sheth, K. J., Swick, H. M., and Haworth, N. (1986). Neurological involvement in hemolyticuremic syndrome. *Ann. Neurol.* 19, 90–93.
- <sup>65</sup> Hamano, S., Nakanishi, Y., Nara, T., Seki, T., Ohtani, T., Oishi, T., Joh, K., Oikawa, T., Muramatsu, Y., Ogawa, Y., et al. (1993). Neurological manifestations of hemorrhagic colitis in the outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Japan. *Acta Paediatr.* 82, 454–458.
- <sup>66</sup> Bale, J. F., Jr., Brasher, C., and Siegler, R. L. (1980). CNS manifestations of the hemolyticuremic syndrome. Relationship to metabolic alterations and prognosis. *Am. J. Dis. Child.* 134, 869–872.
- <sup>67</sup> Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL (2005) Shiga-toxinproducing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* 365:1073–1086

- 
- <sup>68</sup> Cornick NA, Jelacic S, Ciol MA, Tarr PI. (2002) Escherichia coli O157:H7 infections: discordance between filterable fecal shiga toxin and disease outcome. *J Infect Dis.* 1;186(1):57-63.
- <sup>69</sup> Grif K, Dierich MP, Karch H, Allerberger F. (1998) Strain-specific differences in the amount of Shiga toxin released from enterohemorrhagic Escherichia coli O157 following exposure to subinhibitory concentrations of antimicrobial agents. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 17(11):761-6.
- <sup>70</sup> Ashkenazi S, Larocco M, Murray BE, Cleary TG. (1992) The adherence of verocytotoxin-producing Escherichia coli to rabbit intestinal cells. *J Med Microbiol.* 37(5):304-9.
- <sup>71</sup> Uhlich GA, Keen JE, Elder RO. (2002) Variations in the csgD promoter of Escherichia coli O157:H7 associated with increased virulence in mice and increased invasion of HEp-2 cells. *Infect Immun.* 70(1):395-9.
- <sup>72</sup> McNally A, Roe AJ, Simpson S, Thomson-Carter FM, Hoey DE, Currie C, Chakraborty T, Smith DG, Gally DL. (2001) Differences in levels of secreted locus of enterocyte effacement proteins between human disease-associated and bovine Escherichia coli O157. *Infect Immun.* 69(8):5107-14.
- <sup>73</sup> Fujii, J., Kita, T., Yoshida, S., Takeda, T., Kobayashi, H., Tanaka, N., Ohsato, K., and Mizuguchi, Y. (1994). Direct evidence of neuron impairment by oral infection with verotoxin-producing Escherichia coli O157:H- in mitomycin-treated mice. *Infect. Immun.* 62, 3447–3453.
- <sup>74</sup> 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
- <sup>75</sup> Isogai, E., Isogai, H., Kimura, K., Hayashi, S., Kubota, T., Fujii, N., and Takeshi, K. (1998). Role of tumor necrosis factor alpha in gnotobiotic mice infected with an Escherichia coli O157:H7 strain. *Infect. Immun.* 66, 197–202.
- <sup>76</sup> Kita, E., Yunou, Y., Kurioka, T., Harada, H., Yoshikawa, S., Mikasa, K., and Higashi, N. (2000). Pathogenic mechanism of mouse brain damage caused by oral infection with Shiga toxin-producing Escherichia coli O157:H7. *Infect. Immun.* 68, 1207–1214.
- <sup>77</sup> Kurioka, T., Yunou, Y., and Kita, E. (1998). Enhancement of susceptibility to Shiga toxin-producing Escherichia coli O157:H7 by protein calorie malnutrition in mice. *Infect. Immun.* 66, 1726–1734.
- <sup>78</sup> Taguchi, H., Takahashi, M., Yamaguchi, H., Osaki, T., Komatsu, A., Fujioka, Y., and Kamiya, S. (2002). Experimental infection of germ-free mice with hyper-toxigenic enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7, strain 6. *J. Med. Microbiol.* 51, 336–343.
- <sup>79</sup> Watanabe, M., Matsuoka, K., Kita, E., Igai, K., Higashi, N., Miyagawa, A., Watanabe, T., Yanoshita, R., Samejima, Y., Terunuma, D., Natori, Y., and Nishikawa, K. (2004). Oral therapeutic agents with highly clustered globotriose for treatment of Shiga toxigenic Escherichia coli infections. *J. Infect. Dis.* 189, 360–368.
- <sup>80</sup> Kurioka, T., Yunou, Y., and Kita, E. (1998). Enhancement of susceptibility to Shiga toxin-producing Escherichia coli O157:H7 by protein calorie malnutrition in mice. *Infect. Immun.* 66, 1726–1734.
- <sup>81</sup> Sugatani, J., Igarashi, T., Munakata, M., Komiyama, Y., Takahashi, H., Komiyama, N., Maeda, T., Takeda, T., and Miwa, M. (2000). Activation of coagulation in C57BL/6 mice given verotoxin 2 (VT2) and the effect of co-administration of LPS with VT2. *Thromb. Res.* 100, 61–72.

- 
- <sup>82</sup> 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.
- <sup>83</sup> Nishikawa, K., Matsuoka, K., Kita, E., Okabe, N., Mizuguchi, M., Hino, K., Miyazawa, S., Yamasaki, C., Aoki, J., Takashima, S., Yamakawa, Y., Nishijima, M., et al. (2002). A therapeutic agent with oriented carbohydrates for treatment of infections by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 7669–7674.
- <sup>84</sup> Okuda, T., Tokuda, N., Numata, S., Ito, M., Ohta, M., Kawamura, K., Wiels, J., Urano, T., Tajima, O., and Furukawa, K. (2006). Targeted disruption of Gb3/CD77 synthase gene resulted in the complete deletion of globo-series glycosphingolipids and loss of sensitivity to verotoxins. *J. Biol. Chem.* 281, 10230–10235.
- <sup>85</sup> Sugatani, J., Igarashi, T., Munakata, M., Komiyama, Y., Takahashi, H., Komiyama, N., Maeda, T., Takeda, T., and Miwa, M. (2000). Activation of coagulation in C57BL/6 mice given verotoxin 2 (VT2) and the effect of co-administration of LPS with VT2. *Thromb. Res.* 100, 61–72.
- <sup>86</sup> 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.
- <sup>87</sup> Keepers, T., Psocka, M., Gross, L. & Obrig, T. (2006) A Murine Model of HUS: Shiga Toxin with Lipopolysaccharide Mimics the Renal Damage and Physiologic Response of Human Disease *JASN* December 2006 vol. 17 no. 12 3404-3414
- <sup>88</sup> Keepers, T. R., Psocka, M. A., Gross, L. K., and Obrig, T. G. (2006). A murine model of HUS: Shiga toxin with lipopolysaccharide mimics the renal damage and physiologic response of human disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17, 3404–3414.
- <sup>89</sup> Sugatani, J., Igarashi, T., Munakata, M., Komiyama, Y., Takahashi, H., Komiyama, N., Maeda, T., Takeda, T., and Miwa, M. (2000). Activation of coagulation in C57BL/6 mice given verotoxin 2 (VT2) and the effect of co-administration of LPS with VT2. *Thromb. Res.* 100, 61–72.
- <sup>90</sup> Karpman, D., Connell, H., Svensson, M., Scheutz, F., Alm, P., and Svanborg, C. (1997). The role of lipopolysaccharide and Shiga-like toxin in a mouse model of *Escherichia coli* O157: H7 infection. *J. Infect. Dis.* 175, 611–620.
- <sup>91</sup> 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.
- <sup>92</sup> 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.
- <sup>93</sup> Lucero MS, Mirarchi F, Goldstein J, Silberstein C. (2012) Intraperitoneal administration of Shiga toxin 2 induced neuronal alterations and reduced the expression levels of aquaporin 1 and aquaporin 4 in rat brain. *Microb Pathog.* 2012 Aug;53(2):87-94
- <sup>94</sup> Wiels, J., Fellous, M., and Tursz, T. (1981) Monoclonal antibody against a Burkitt lymphoma-associated antigen *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 6485-6488
- <sup>95</sup> Tetsuya Okuda and Ken-ichi Nakayama (2008) Identification and characterization of the

- 
- human Gb3/CD77 synthase gene promoter. *Glycobiology*, Dec;18(12):1028-35.
- <sup>96</sup> Iwamura K, Furukawa K, Uchikawa M, Sojka BN, Kojima Y, Wiels J, Shiku H, Urano T, Furukawa K. (2003) The blood group P1 synthase gene is identical to the Gb3/CD77 synthase gene. A clue to the solution of the P1/P2/p puzzle. *J Biol Chem*. 2Nov 7;278(45):44429-38.
- <sup>97</sup> Mallard, F., D. Tenza, C. Antony, J. Salamero, B. Goud, and L. Johannes. Direct pathway from early/recycling endosomes to the Golgi apparatus revealed through the study of Shiga toxin B-fragment transport. *J. Cell Biol*. 143:973-990, 1998
- <sup>98</sup> JM Lord, LM Roberts, WI Lencer (2005) Entry of protein toxins into mammalian cells by crossing the endoplasmic reticulum membrane: co-opting basic mechanisms of endoplasmic reticulum-associated degradation. *Curr Top Microbiol Immunol*300, 149-168
- <sup>99</sup> Boyd B, Lingwood C (1989) Verotoxin receptor glycolipid in human renal tissue. *Nephron* 51(4):582.
- <sup>100</sup> Fraser (2004) Structure of Shiga Toxin Type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157:H7
- <sup>101</sup> Irina Majoul, Tobias Schmidt, Maria Pomasanova, Evgenia Boutkevich, Yuri Kozlov and Hans-Dieter Söling. (2001) Differential expression of receptors for Shiga and Cholera toxin is regulated by the cell cycle. *Journal of Cell Science*
- <sup>102</sup> Van Setten, PA, Van Hinsbergh, VWM, van Der Velden, TJAN, van De Kar, NCAJ, Vermeer, M, Mahan, JD, Assmann, KJM, Van den Heuvel, LPWJ, Monnens, (1997) LAH. Effects of TNF $\alpha$  on verocytotoxicity in purified human glomerular microvascular endothelial cells. *Kidney Int*51: 1245–1256
- <sup>103</sup> Louise, CB, Obrig, TG (1991) Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome combined cytotoxic effects of Shiga toxin, IL-1-beta and TNF-alpha on human endothelial cells in vitro. *Infect Immunol*59: 4173–4179
- <sup>104</sup> Patricia B. Eisenhauer, Prasoon Chaturvedi, Richard E. Fine, Andrew J. Ritchie, Jordan S. Pober, Thomas G. Clear and David S. Newburg (2001) Tumor Necrosis Factor Alpha Increases Human Cerebral Endothelial Cell Gb<sub>3</sub> and Sensitivity to Shiga Toxin Infection and Immunity, p. 1889-1894, Vol. 69, No. 3
- <sup>105</sup> Tesh, V.L., et al., & Samuel, J.E. (1993). Comparison of the relative toxicities of Shiga-like toxins type I and type II for mice. *Infect. Immun*. 61, 3392-3402.
- <sup>106</sup> Tesh, V.L., Samuel, J.E., Perera, L.P., Sharefkin, J.B. & O'Brien, A.D. (1991). Evaluation of the role of Shiga and Shiga-like toxins in mediating direct damage to human vascular endothelial cells. *J. Infect. Dis*. 164, 344-352.
- <sup>107</sup> Head, S.C., Karmali, M.A. & Lingwood, C.A. (1991). Preparation of VT1 and VT2 hybrid toxins from their purified dissociated subunits. Evidence for B subunit modulation of A subunit function. *J. Biol. Chem*. 266, 3617-3621.
- <sup>108</sup> Tesh, V.L., et al., & Samuel, J.E. (1993). Comparison of the relative toxicities of Shiga-like toxins type I and type II for mice. *Infect. Immun*. 61, 3392-3402.
- <sup>109</sup> Head, S.C., Karmali, M.A. & Lingwood, C.A. (1991). Preparation of VT1 and VT2 hybrid toxins from their purified dissociated subunits. Evidence for B subunit modulation of A subunit function. *J. Biol. Chem*. 266, 3617-3621.



- 
- <sup>110</sup>A.D. (1990). Acute renal tubular necrosis and death of mice orally infected with *Escherichia coli* strains that produce Shiga-like toxin II. *Infect. Immun.* 58, 3959-3965.
- <sup>111</sup>Louise, C.B. & Obrig, T.G. (1995). Specific interaction of *Escherichia coli* O157:H7-derived Shiga-like toxin II with human renal endothelial cells. *J. Infect. Dis.* 172, 1397-1401.
- <sup>112</sup>Fumiko Obata, Koujiro Tohyama, Adrian D. Bonev, Glynis L. Kolling, Tiffany R. Keepers Lisa K. Gross, Mark T. Nelson, Shigehiro Sato, and Tom G. Obrig (2008) Shiga Toxin 2 Affects the Central Nervous System through Receptor Globotriaosylceramide Localized to Neurons *The Journal of Infectious Diseases*; 198:1398–406
- <sup>113</sup>Kiyomi Takahashi, Nobuaki Funata, Fusahiro Ikuta and Shigehiro Sato (2008) Neuronal apoptosis and inflammatory responses in the central nervous system of a rabbit treated with Shiga toxin-2 *Journal of Neuroinflammation*, 5:11 doi:10.1186/1742-2094-5-11
- <sup>114</sup>Obata, F., Tohyama, K., Bonev, A.D., Kolling, G.L., Keepers, T.R., Gross, L.K., Nelson, M.T., Sato, S., Obrig, T.G., (2008). Shiga toxin 2 affects the central nervous system through receptor globotriaosylceramide localized to neurons. *J. Infect. Dis.* 198, 1398–1406.
- <sup>115</sup> National Institutes of Health. (1998). NIH policy manual. Chapter 3035, working safely with hazardous biological materials. National Institutes of Health, Bethesda, MD.
- <sup>116</sup> Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- <sup>117</sup> Schagger H & von Jagow G (1987) Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa *Analytical Biochemistry* 166 (2) 368-379
- <sup>118</sup> Karmali M. A., et al . (2004) The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. 1985. *J. Infect. Dis.* 189:556–563
- <sup>119</sup> Paxinos, G., Watson, C., 2005. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* Fifth Edition. Elsevier Academic Press, Burlington, MA, U.S.A.
- <sup>120</sup> Boccoli, J., Loidl, C.F., Lopez-Costa, J.J., Creydt, V.P., Ibarra, C., 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.
- <sup>121</sup> Goldstein, J., Loidl, C.F., Creydt, V.P., Boccoli, J., 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.
- <sup>122</sup> Louise, C.B., Obrig, T.G., (1991). Shiga toxin-associated hemolytic-uremic syndrome: combined cytotoxic effects of Shiga toxin, interleukin-1 beta, and tumor necrosis factor alpha on human vascular endothelial cells in vitro. *Infect. Immun.* 59, 4173–4179.
- <sup>123</sup> Stone, M.K., Kolling, G.L., Lindner, M.H., Obrig, T., (2008). p38 mitogen-activated protein kinase mediates lipopolysaccharide and tumor necrosis factor alpha induction of shiga toxin 2 sensitivity in human umbilical vein endothelial cells. *Infect. Immun.* 76, 1115–1121.

- 
- <sup>124</sup>Tesh, V.L., Samuel, J.E., Perera, L.P., Sharefkin, J.B., O'Brien, A.D., (1991). Evaluation of the role of Shiga and Shiga-like toxins in mediating direct damage to human vascular endothelial cells. *J Infect. Dis.* 164, 344–352.
- <sup>125</sup>Goldstein, J., Loidl, C.F., Creydt, V.P., Boccoli, J., 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.
- <sup>126</sup>Mizuguchi, M., Tanaka, S., Fujii, I., Tanizawa, H., Suzuki, Y., Igarashi, T., Yamanaka, T., Takeda, T., Miwa, M., 1996. Neuronal and vascular pathology produced by verocytotoxin 2 in the rabbit central nervous system. *Acta Neuropathol.* 91, 254–262.
- <sup>127</sup>Fujii, J., Kinoshita, Y., Kita, T., Higure, A., Takeda, T., Tanaka, N., Yoshida, S., 1996. Magnetic resonance imaging and histopathological study of brain lesions in rabbits given intravenous verotoxin 2. *Infect. Immun.* 64, 5053–5060.
- <sup>128</sup>Fujii, J., Kinoshita, Y., Yamada, Y., Yutsudo, T., Kita, T., Takeda, T., Yoshida, S., 1998. Neurotoxicity of intrathecal Shiga toxin 2 and protection by intrathecal injection of anti-Shiga toxin 2 antiserum in rabbits. *Microb. Pathog.* 25, 139–146.
- <sup>129</sup>Mizuguchi, M., Tanaka, S., Fujii, I., Tanizawa, H., Suzuki, Y., Igarashi, T., Yamanaka, T., Takeda, T., Miwa, M., 1996. Neuronal and vascular pathology produced by verocytotoxin 2 in the rabbit central nervous system. *Acta Neuropathol.* 91, 254–262
- <sup>130</sup>Fujii, J., Kinoshita, Y., Yamada, Y., Yutsudo, T., Kita, T., Takeda, T., Yoshida, S., 1998. Neurotoxicity of intrathecal Shiga toxin 2 and protection by intrathecal injection of anti-Shiga toxin 2 antiserum in rabbits. *Microb. Pathog.* 25, 139–146.
- <sup>131</sup>Sánchez, C., Díaz-Nido, J., Avila, J., 2000. Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Prog. Neurobiol.* 61, 133–168. Sandvig, K., van Deurs, B., 2005. Delivery int
- <sup>132</sup>Kato, K., Masa, T., Tawara, Y., Kobayashi, K., Oka, T., Okabe, A., Shiosaka, S., 2001. Dendritic aberrations in the hippocampal granular layer and the amygdalohippocampal area following kindled-seizures. *Brain Res.* 901, 281–295.
- <sup>133</sup>Obata, F., Tohyama, K., Bonev, A.D., Kolling, G.L., Keepers, T.R., Gross, L.K., Nelson, M.T., Sato, S., Obrig, T.G., 2008. Shiga toxin 2 affects the central nervous system through receptor globotriaosylceramide localized to neurons. *J. Infect. Dis.* 198, 1398–1406.
- <sup>134</sup>Cotter, D., Wilson, S., Roberts, E., Kerwin, R., Everall, I.P., 2000. Increased dendritic MAP2 expression in the hippocampus in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 41, 313–323.
- <sup>135</sup>Pei, Q., Burnet, P.J., Zetterström, T.S., 1998. Changes in mRNA abundance of microtubule associated proteins in the rat brain following electroconvulsive shock. *NeuroReport* 9, 391–394.
- <sup>136</sup>Zhou, Q., Zhang, Q., Zhao, X., Duan, Y.Y., Lu, Y., Li, C., Li, T., 2010. Cortical electrical stimulation alone enhances functional recovery and dendritic structures after focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 1311, 148–157.
- <sup>137</sup>Faddis, B.T., Hasbani, M.J., Goldberg, M.P., 1997. Calpain activation contributes to dendritic remodeling after brief excitotoxic injury in vitro. *J. Neurosci.* 17, 951–959.
- <sup>138</sup>Fiala, J.C., Spacek, J., Harris, K.M., 2002. Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? *Brain Res. Brain Res. Rev.* 39, 29–54.

- <sup>139</sup>Barnett, N.D.P., Kaplan, A.M., Bernes, S.M., Cohen, M.L., 1995. Hemolytic uremic syndrome with particular involvement of basal ganglia and favorable outcome. *Pediatr. Neurol.* 12, 155–158.
- <sup>140</sup>Fujii, J., Kita, T., Yoshida, S., Takeda, T., Kobayashi, H., Tanaka, N., Ohsato, K., Mizuguchi, Y., 1994. Direct evidence of neuron impairment by oral infection with verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H- in mitomycin-treated mice. *Infect. Immun.* 62, 3447–3453.
- <sup>141</sup>Francis, D.H., Moxley, R.A., Andraos, C.Y., 1989. Edema disease-like brain lesions in gnotobiotic piglets infected with *Escherichia coli* serotype O157:H7. *Infect. Immun.* 57, 1339–1342.
- <sup>142</sup>Zhou, Q., Zhang, Q., Zhao, X., Duan, Y.Y., Lu, Y., Li, C., Li, T., 2010. Cortical electrical stimulation alone enhances functional recovery and dendritic structures after focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 1311, 148–157.
- <sup>143</sup>Bidmon, H.J., Jancsik, V., Schleicher, A., Hagemann, G., Witte, O.W., Woodhams, P., Zilles, K., 1998. Structural alterations and changes in cytoskeletal proteins and proteoglycans after focal cortical ischemia. *Neuroscience* 82, 397–420.
- <sup>144</sup>Goldstein, J., Loidl, C.F., Creydt, V.P., Boccoli, J., 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.
- <sup>145</sup>Boccoli, J., Loidl, C.F., Lopez-Costa, J.J., Creydt, V.P., Ibarra, C., 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.
- <sup>146</sup>Sakuma, M., Hyakawa, N., Kato, H., Araki, T., 2008. Time dependent changes of striatal interneurons after focal cerebral ischemia in rats. *J. Neural Transm.* 115, 413–422.
- <sup>147</sup>Sakuma, M., Hyakawa, N., Kato, H., Araki, T., 2008. Time dependent changes of striatal interneurons after focal cerebral ischemia in rats. *J. Neural Transm.* 115, 413–422.
- <sup>148</sup>Liu, X., Sullivan, K.A., Madl, J.E., Legare, M., Tjalkens, R.B., 2006. Manganese-induced neurotoxicity: the role of astroglial-derived nitric oxide in striatal interneuron degeneration. *Toxicol. Sci.* 91, 521–531.
- <sup>149</sup>Dupuis, L., Pehar, M., Cassina, P., Rene, F., Castellanos, R., Rouaux, C., Gandelman, M., Dimos, L., Schwab, M.E., Loeffler, J.P., Barbeito, L., Gonzalez de Aguilar, J.L., 2008. Nogo receptor antagonizes p75NTR-dependent motor neuron death. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105, 740–745.
- <sup>150</sup>Goldstein, J., Loidl, C.F., Creydt, V.P., Boccoli, J., 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
- <sup>151</sup>Eisenhauer, P.B., Chaturvedi, P., Fine, R.E., Ritchie, A.J., Pober, J.S., Cleary, T.G., Newburg, D.S., 2001. Tumor necrosis factor alpha increases human cerebral endothelial cell Gb3 and sensitivity to Shiga toxin. *Infect. Immun.* 69, 1889–1894
- <sup>152</sup>Stricklett, P.K., Hughes, A.K., Ergonul, Z., Kohan, D.E., 2002. Molecular basis for upregulation by inflammatory cytokines of Shiga toxin 1 cytotoxicity and globotriaosylceramide expression. *J. Infect. Dis.* 186, 976–982.
- <sup>153</sup>Ridet, J.L., Malhotra, S.K., Privat, A., Gage, F.H., 1997. Reactive astrocytes: cellular and molecular clues to biological function. *Trends Neurosci.* 20, 570–577.
- <sup>154</sup>Pehar, M., Cassina, P., Vargas, M.R., Castellanos, R., Viera, L., Beckman, J.S., Estevez, A.G., Barbeito, L., 2004. Astrocytic production of nerve growth factor in motor

- neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* 89, 464–473
- <sup>155</sup>Cassina, P., Pehar, M., Vargas, M.R., Castellanos, R., Barbeito, A.G., Estevez, A.G., Thompson, J.A., Beckman, J.S., Barbeito, L., 2005. Astrocyte activation by fibroblast growth factor-1 and motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* 93, 38–46.
- <sup>156</sup>Liu, C.L., Siesjo, B.K., Hu, B.R., 2004. Pathogenesis of hippocampal neuronal death after hypoxia-ischemia changes during brain development. *Neuroscience* 127, 113–123.
- <sup>157</sup>Jones, N.L., Islur, A., Haq, R., Mascarenhas, M., Karmali, M.A., Perdue, M.H., Zanke, B.W., Sherman, P.M., 2000. *Escherichia coli* Shiga toxins induce apoptosis in epithelial cells that is regulated by the Bcl-2 family. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 278, G811–G819.
- <sup>158</sup>Johansson, D., Johansson, A., Grankvist, K., Andersson, U., Henriksson, R., Bergström, P., Brännström, T., Behnam-Motlagh, P., 2006. Verotoxin-1 induction of apoptosis in Gb3-expressing human glioma cell lines. *Cancer Biol. Ther.* 5, 1211–1217.
- <sup>159</sup>Bolam, J.P., Hanley, J.J., Booth, P.A., Bevan, M.D., 2000. Synaptic organisation of the basal ganglia. *J. Anat.* 196, 527–542.
- <sup>160</sup>Barnett, N.D.P., Kaplan, A.M., Bernes, S.M., Cohen, M.L., 1995. Hemolytic uremic syndrome with particular involvement of basal ganglia and favorable outcome. *Pediatr. Neurol.* 12, 155–158.
- <sup>161</sup>Steinborn, M., Leiz, S., Rüdissler, K., Griebel, M., Harder, T., 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.
- <sup>162</sup>Psozka, M.A., Obata, F., Kolling, G.L., Gross, L.K., Saleem, M.A., Satchell, S.C., Mathieson, P.W., Obrig, T.G., 2009. Shiga toxin 2 targets the murine renal collecting duct epithelium. *Infect. Immun.* 77, 959–969.
- <sup>163</sup>Lechan, R.M., Fekete, C., 2006. The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism. *Prog. Brain Res.* 153, 209–235.
- <sup>164</sup>Wang, W., Svanberg, E., Delbro, D., Lundholm, K., 2005. NOS isoenzyme content in brain nuclei as related to food intake in experimental cancer cachexia. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 134, 205–214.
- <sup>165</sup>Boccoli, J., Loidl, C.F., Lopez-Costa, J.J., Creydt, V.P., Ibarra, C., 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.
- <sup>166</sup>Scarlett, J.M., Jobst, E.E., Enriori, P.J., Bowe, D.D., Batra, A.K., Grant, W.F., Cowley, M.A., Marks, D.L., 2007. Regulation of central melanocortin signaling by interleukin-1 beta. *Endocrinology* 148, 4217–4225.
- <sup>167</sup>Eriksson KJ, Boyd SG, Tasker RC (2001). Acute neurology and neurophysiology of haemolytic-uraemic syndrome. *Arch Dis Child* 84: 434-435.
- <sup>168</sup>Wilking E, Götsch G, Meier H, Thiele D, Askar M, Dehnert M, Frank C, Fruth A, Krause G, Prager R, Stark K, Böddinghaus B, Bellinger O, Gottschalk R (2012) Identifying Risk Factors for Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* by Payment Information, *Emerg Infect Dis.* January; 18(1): 169–170.

- 
- <sup>169</sup>Magnus, T. et al. (2012) The neurological syndrome in adults during the 2011 northern German *E. coli* serotype O104:H4 outbreak. *Brain* 135, 1850–1859
- <sup>170</sup> Magnus, T. et al. (2012) The neurological syndrome in adults during the 2011 northern German *E. coli* serotype O104:H4 outbreak. *Brain* 135, 1850–1859
- <sup>171</sup>Fujii J, Kita T, Yoshida S, Takeda T, Kobayashi H, et al. (1994) Direct evidence of neuron impairment by oral infection with verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H- in mitomycin-treated mice. *Infect Immun* 62: 3447-3453.
- <sup>172</sup>Kurioka T, Yunou Y, Kita E (1998) Enhancement of susceptibility to Shiga toxin producing *Escherichia coli* O157:H7 by protein calorie malnutrition in mice. *Infect Immun* 66: 1726-1734.
- <sup>173</sup>Isogai E, Isogai H, Kimura K, Hayashi S, Kubota T, et al. (1998) Role of tumor necrosis factor alpha in gnotobiotic mice infected with an *Escherichia coli* O157:H7 strain. *Infect Immun* 66: 197–202.
- <sup>174</sup>Taguchi H, Takahashi M, Yamaguchi H, Osaki T, Komatsu A, et al. (2002). Experimental infection of germ-free mice with hyper-toxigenic enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, strain 6. *J Med Microbiol* 51: 336-343.
- <sup>175</sup>Isogai E, Isogai H, Kimura K, Hayashi S, Kubota T, et al. (1998) Role of tumor necrosis factor alpha in gnotobiotic mice infected with an *Escherichia coli* O157:H7 strain. *Infect Immun* 66: 197–202.
- <sup>176</sup>Kita E, Yunou Y, Kurioka T, Harada H, Yoshikawa S, et al. (2000) Pathogenic mechanism of mouse brain damage caused by oral infection with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* 68: 1207-1214.
- <sup>177</sup>Kurioka T, Yunou Y, Kita E (1998) Enhancement of susceptibility to Shiga toxin producing *Escherichia coli* O157:H7 by protein calorie malnutrition in mice. *Infect Immun* 66: 1726-1734.
- <sup>178</sup>Watanabe M, Matsuoka K, Kita E, Igai K, Higashi N, et al. (2004) Oral therapeutic agents with highly clustered globotriose for treatment of Shiga toxigenic *Escherichia coli* infections. *J Infect Dis* 189: 360-368.
- <sup>179</sup>Taguchi H, Takahashi M, Yamaguchi H, Osaki T, Komatsu A, et al. (2002). Experimental infection of germ-free mice with hyper-toxigenic enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, strain 6. *J Med Microbiol* 51: 336-343.
- <sup>180</sup>Sugatani J, Igarashi T, Munakata M, Komiyama Y, Takahashi H, et al. (2000) Activation of coagulation in C57BL/6 mice given verotoxin 2 (VT2) and the effect of co-administration of LPS with VT2. *Thromb Res* 100: 61-72.

- 
- <sup>181</sup>Obata F, Tohyama K, Bonev AD, Kolling GL, Keepers TR, et al. (2008) Shiga toxin 2 affects the central nervous system through receptor globotriaosylceramide localized to neurons. *J Infect Dis* 198: 1398-1406.
- <sup>182</sup>Nishikawa K, Matsuoka K, Kita E, Okabe N, Mizuguchi M, et al. (2002) A therapeutic agent with oriented carbohydrates for treatment of infections by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 7669-7674.
- <sup>183</sup>Okuda T, Tokuda N, Numata S, Ito M, Ohta M, et al. (2006) Targeted disruption of Gb3/CD77 synthase gene resulted in the complete deletion of globo-series glycosphingolipids and loss of sensitivity to verotoxins. *J Biol Chem* 281: 10230-10235.
- <sup>184</sup>Sugatani J, Igarashi T, Munakata M, Komiyama Y, Takahashi H, et al. (2000) Activation of coagulation in C57BL/6 mice given verotoxin 2 (VT2) and the effect of co-administration of LPS with VT2. *Thromb Res* 100: 61-72.
- <sup>185</sup>Obata F, Tohyama K, Bonev AD, Kolling GL, Keepers TR, et al. (2008) Shiga toxin 2 affects the central nervous system through receptor globotriaosylceramide localized to neurons. *J Infect Dis* 198: 1398-1406.
- <sup>186</sup>Goldstein J, Loidl CF, Creydt VP, Boccoli J, 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.
- <sup>187</sup>Boccoli J, Loidl CF, Lopez-Costa JJ, Creydt VP, Ibarra C, et al. (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.
- <sup>188</sup>Takahashi K, Funata N, Ikuta F, Sato S, (2008) Neuronal apoptosis and inflammatory responses in the central nervous system of a rabbit treated with Shiga toxin-2. *J Neuroinflammation* 5: 11.
- <sup>189</sup>Mizuguchi M, Sugatani J, Maeda T, Momoi T, Arima K, et al. (2001) Cerebrovascular damage in young rabbits after intravenous administration of Shiga toxin 2. *Acta Neuropathol (Berl)* 102: 306-312.
- <sup>190</sup>Fujii J, Kinoshita Y, Kita T, Higure A, Takeda T, et al. (1996) Magnetic resonance imaging and histopathological study of brain lesions in rabbits given intravenous verotoxin 2. *Infect Immun* 64: 5053-5060.

- 
- <sup>191</sup>Matise I, Sirinarumitr T, Bosworth BT, Moon HW (2000) Vascular ultrastructure and DNA fragmentation in swine infected with Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Vet Pathol* 37: 318-327.
- <sup>192</sup>Dean-Nystrom EA, Pohlenz JF, Moon HW, O'Brien AD (2000) *Escherichia coli* O157:H7 causes more-severe systemic disease in suckling piglets than in colostrum deprived neonatal piglets. *Infect Immun* 68: 2356-2358.
- <sup>193</sup>Tzipori S, Chow CW, Powell HR (1988) Cerebral infection with *Escherichia coli* O157:H7 in humans and gnotobiotic piglets. *J Clin Pathol* 41: 1099-1103.
- <sup>194</sup>Donohue-Rolfe A, Kondova I, Oswald S, Hutto D, Tzipori S (2000) *Escherichia coli* O157:H7 strains that express Shiga toxin (Stx) 2 alone are more neurotropic for gnotobiotic piglets than are isotypes producing only Stx1 or both Stx1 and Stx2. *J Infect Dis* 181: 1825-1829.
- <sup>195</sup>Tzipori S, Chow CW, Powell HR (1988) Cerebral infection with *Escherichia coli* O157:H7 in humans and gnotobiotic piglets. *J Clin Pathol* 41: 1099-1103.
- <sup>196</sup>Dean-Nystrom EA, Pohlenz JF, Moon HW, O'Brien AD (2000) *Escherichia coli* O157:H7 causes more-severe systemic disease in suckling piglets than in colostrum deprived neonatal piglets. *Infect Immun* 68: 2356-2358
- <sup>197</sup>Siegler RL, Pysher TJ, Tesh VL, Taylor FB Jr, (2001) Response to single and divided doses of Shiga toxin-1 in a primate model of hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 12: 1458-1467.
- <sup>198</sup> Jeong YK, Kim IO, Kim WS, Hwang YS, Choi Y, et al. (1994) Hemolytic uremic syndrome: MR findings of CNS complications. *Pediatr Radiol* 24: 585-586.
- <sup>199</sup> Barnett NDP, Kaplan AM, Bernes SM, Cohen ML (1995) Hemolytic uremic syndrome with particular involvement of basal ganglia and favorable outcome. *Pediatr Neurol* 12: 155-158.
- <sup>200</sup> . Hager A, Staudt M, Klare B, von Einsiedel HG, Krägeloh-Mann I (1999) Hemolytic-uremic syndrome with involvement of basal ganglia and cerebellum. *Neuropediatrics* 30: 210-3.
- <sup>201</sup> Jeong YK, Kim IO, Kim WS, Hwang YS, Choi Y, et al. (1994) Hemolytic uremic syndrome: MR findings of CNS complications. *Pediatr Radiol* 24: 585-586.
- <sup>202</sup> Steinborn M, Leiz S, Rudisser K, Griebel M, Harder T, et al. (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.

- 
- <sup>203</sup>Peters AG, Festing MFW (1985) NIH/Ola: a highly productive inbred strain of the laboratory mouse. *Lab. Anim.* 19, 320- 327.
- <sup>204</sup>Priestley JV, Alvarez FJ, Averill S (1992) Pre-embedding electron microscopic immunocytochemistry. In: Polak, J.M., Priestley, J.V. (Eds.), *Electron Microscopic Immunocytochemistry*. Oxford University Press, Oxford, pp. 89-121
- <sup>205</sup>Schmued LC, Hopkins KJ (2000) Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res* 874: 123-130.
- <sup>206</sup>
- Wang D, Noda Y, Zhou Y, Mouri A, Mizoguchi H, Nitta A, Chen W, Nabeshima T. (2007) The allosteric potentiation of nicotinic acetylcholine receptors by galantamine ameliorates the cognitive dysfunction in beta amyloid25-35 i.c.v.-injected mice: involvement of dopaminergic systems. *Neuropsychopharmacology*. 2007 Jun;32(6):1261-71.
- <sup>207</sup> Rick A Bevins & Joyce Besheer Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. (2006) *Nature Protocols* 1, -1306 - 1311
- <sup>208</sup> Alicia A Walf & Cheryl A Frye (2007) A The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols* 2, -322 - 328
- <sup>209</sup> Lister RG. (1987) The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)* 92:180–5.
- <sup>210</sup> Godoy MC, Figuera MR, Souza FR, Flores AE, Rubin MA, Oliveira MR, et al. (2004) Alpha 2-adrenoceptors and 5-HT receptors mediate the antinociceptive effect of new pyrazolines, but not of dipyrone. *Eur J Pharmacol* ;496:93–7.
- <sup>211</sup> Miranda, A.S., Vieira, L.B., Lacerda-Queiroz, N., Souza, A.H., Rodrigues, D.H., Vilela, M.C., Gomez, M.V., Machado, F.S., Rachid, M.A., Teixeira, A.L (2010) .Increased levels of glutamate in the central nervous system are associated with behavioral symptoms in experimental malaria. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 43: 1173-1177
- <sup>212</sup> Karin Weissenborn, MD, Frank Donnerstag, MD, Jan T. Kielstein, MD, Meike Heeren, MD, Hans Worthmann, MD, Hartmut Hecker, PhD, Roland Schmitt, MD, Mario Schiffer, MD, Thomas Pasedag, Ramona Schuppner, Anita B. Tryc, MD, Peter Raab, MD, Hans Hartmann, MD, Xiaoqi Q. Ding, MD, PhD, Carsten Hafer, MD, Jan Menne, MD, Bernhard M.W. Schmidt, MD, Eva Bültmann, MD, Hermann Haller, MD, Reinhard Dengler, MD, Heinrich Lanfermann, MD and Anja M. Giesemann, MD



- 
- (2012), Neurologic manifestations of E coli infection–induced hemolytic-uremic syndrome in adults, *Neurology* 2012;79;1466
- <sup>213</sup>Signorini E, Lucchi S, Mastrangelo M, Rapuzzi S, Edefonti A, et al. (2000) Central nervous system involvement in a child with hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol* 14: 990-992.
- <sup>214</sup> Jeong YK, Kim IO, Kim WS, Hwang YS, Choi Y, et al. (1994) Hemolytic uremic syndrome: MR findings of CNS complications. *Pediatr Radiol* 24: 585-586.
- <sup>215</sup> DiMario FJJr, Bronte-Stewart H, Sherbotie J, Turner ME (1987) Lacunar infarction of the basal ganglia as a complication of hemolytic-uremic syndrome. MRI and clinical correlations. *Clin Pediatr (Phila)* 26: 586-590.
- <sup>216</sup>Tiffany R. Keepers, Mitchell A. Psotka, Lisa K. Gross, and Tom G. Obrig (2006) A Murine Model of HUS: Shiga Toxin with Lipopolysaccharide Mimics the Renal Damage and Physiologic Response of Human Disease. *J Am Soc Nephrol* 17: 3404 –3414
- <sup>217</sup> Elżbieta Wirth-Dzięciołowska, Jadwiga Karaszewska, Tomasz Sadowski, Kazimiera Pyśniak, , Marta Gajewska, (2009), Selected blood serum biochemical indicators in twelve inbred strains of laboratory mice. *Animal Science Papers and Reports* vol. 2 no. 2, 159-167.
- <sup>218</sup>Gagnadoux MF, Habib R, Gubler MC, Bacri JL, Broyer M (1996) Long-term (15-25 years) outcome of childhood hemolytic-uremic syndrome. *Clin Nephrol.*46(1):39-41.
- <sup>219</sup> Dere E, Huston JP, De Souza Silva MA. (2007) The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neurosci Biobehav Rev.* 2007;31(5):673-704. Epub 2007 Feb 12.
- <sup>220</sup> Lyon L, Saksida LM, Bussey TJ. (2012) Spontaneous object recognition and its relevance to schizophrenia: a review of findings from pharmacological, genetic, lesion and developmental rodent models. *Psychopharmacology (Berl)*. 2012 Apr;220(4):647-72.
- <sup>221</sup> Carobrez AP, Bertoglio LJ. (2005) Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev*;29:1193–205.
- <sup>222</sup> Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. (1985) Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* ;14:149–67.
- <sup>223</sup>Hall, CS; Ballachey EL (1932). "A study of the rat's behavior in a field: a contribution to method in comparative psychology.". *University of California Publications in Psychology* 6: 1–12.

- 
- <sup>224</sup> Stanford, SC (2007). "The Open Field Test: Reinventing the Wheel". *Journal of Psychopharmacology* 21 (2): 134-4.
- <sup>225</sup> Bolivar VJ, Caldarone BJ, Reilly AA, Flaherty L. (2000). Habituation of activity in an open field: A survey of inbred strains and F1 hybrids. *Behav Genet*,.30(4). 285-93.
- <sup>226</sup> Choleric, E., et al., A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. (2001) *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 25(3): 235-260.
- <sup>227</sup> Kafkafi, N. and G.I. Elmer (2005), Activity density in the open field: a measure for differentiating the effect of psychostimulants. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 80(2): p. 239.
- <sup>228</sup>Carola, V., et al., (2002) Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice.*Behavioural Brain Research*. 134(1-2): p. 49.
- <sup>229</sup> Jones BJ, Roberts DJ. (1968) The quantitative measurement of motor inco-ordination in naive mice using an accelerating rotarod. *J Pharm Pharmacol*. Apr;20(4):302
- <sup>230</sup>Tironi-Farinati C, Loidl CF, Boccoli J, Parma Y, Fernandez-Miyakawa ME, Goldstein J. *J Neuroimmunol* (2010).Intracerebroventricular Shiga toxin 2 increases the expression of its receptor globotriaosylceramide and causes dendritic abnormalities.2010 May;222(1-2):48-61.
- <sup>231</sup> Obata 2008
- <sup>232</sup> Weissenborn K, Donnerstag F, Kielstein JT, Heeren M, Worthmann H, Hecker H, Schmitt R, Schiffer M, Pasedag T, Schuppner R, Tryc AB, Raab P, Hartmann H, Ding XQ, Hafer C, Menne J, Schmidt BM, Bültmann E, Haller H, Dengler R, Lanfermann H, Giesemann AM. (2012) Neurologic manifestations of E coli infection-induced hemolytic-uremic syndrome in adults. *Neurology*. 2012 Oct 2;79(14):1466-73. doi: 10.1212/WNL.0b013e31826d5f26. Epub Sep 19.
- <sup>233</sup> Kioka N, Minami K, Tamura A, Yoshikawa N. (2012) Chemokine expression in human astrocytes in response to shiga toxin 2. *Int J Inflam*. 2012;2012:135803. doi: 10.1155/2012/135803. Epub 2012 Dec 10.
- <sup>234</sup> Weissenborn K, Donnerstag F, Kielstein JT, Heeren M, Worthmann H, Hecker H, Schmitt R, Schiffer M, Pasedag T, Schuppner R, Tryc AB, Raab P, Hartmann H, Ding XQ, Hafer C, Menne J, Schmidt BM, Bültmann E, Haller H, Dengler R, Lanfermann H, Giesemann AM. (2012) Neurologic manifestations of E coli infection-induced hemolytic-uremic syndrome in adults. *Neurology*. 2012 Oct 2;79(14):1466-73. doi: 10.1212/WNL.0b013e31826d5f26. Epub Sep 19.

- 
- <sup>235</sup> Karin Weissenborn, MD, Frank Donnerstag, MD, Jan T. Kielstein, MD, Meike Heeren, MD, Hans Worthmann, MD, Hartmut Hecker, PhD, Roland Schmitt, MD, Mario Schiffer, MD, Thomas Pasedag, Ramona Schuppner, Anita B. Tryc, MD, Peter Raab, MD, Hans Hartmann, MD, Xiaoqi Q. Ding, MD, PhD, Carsten Hafer, MD, Jan Menne, MD, Bernhard M.W. Schmidt, MD, Eva Bültmann, MD, Hermann Haller, MD, Reinhard Dengler, MD, Heinrich Lanfermann, MD and Anja M. Giesemann, MD (2012), Neurologic manifestations of E coli infection–induced hemolytic-uremic syndrome in adults, *Neurology* 2012;79;1466;.
- <sup>236</sup> Eriksson KJ, Boyd SG, Tasker RC (2001). Acute neurology and neurophysiology of haemolytic-uraemic syndrome. *Arch Dis Child* 84: 434-435
- <sup>237</sup> Ruan YW, Ling GY, Zhang JL, Xu ZC (2003) Apoptosis in the adult striatum after transient forebrain ischemia and the effects of ischemic severity. *Brain Res* 982: 228-40.
- <sup>238</sup> Northington FJ, Zelaya ME, O’Riordan DP, Blomgren K, Flock DL, et al. (2007) Failure to complete apoptosis following neonatal hypoxia-ischemia manifests as "continuum" phenotype of cell death and occurs with multiple manifestations of mitochondrial dysfunction in rodent forebrain. *Neuroscience* 149: 822-33.
- <sup>239</sup> Petito CK, Pulsinelli WA, Jacobson G, Plum F (1982) Edema and vascular permeability in cerebral ischemia: comparison between ischemic neuronal damage and infarction. *J Neuropathol Exp Neurol* 41: 423-36.
- <sup>240</sup> Grundmann K, Glöckle N, Martella G, Sciamanna G, Hauser TK, et al.(2012) Generation of a novel rodent model for DYT1 dystonia. *Neurobiol Dis* 47: 61-74.
- <sup>241</sup> Davies SW, Turmaine M, Cozens BA, DiFiglia M, Sharp AH, et al. (1997) Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* 90: 537-48.
- <sup>242</sup> Bots GThAM, Bruyn GW (1987) Neuropathological changes of the nucleus accumbens in Huntingtons chorea. *Acta Neuropathol* 55: 21-22.
- <sup>243</sup> Roos RAC, Bots GThAM (1983) Nuclear membrane indentations in Huntingtons chorea. *J Neurol Sci* 61: 37-47.
- <sup>244</sup> Lieberman AR (1971) A review of the principal features of perikaryal responses to axon injury. *Int. Rev. Neurobiol.* 14: 49-124.
- <sup>245</sup> Malamud N, Hirano A (1974) *Atlas of Neuropathology-2nd revised edition*, Berkeley and Los Angeles: University of California Press. pp 36-38.

- 
- <sup>246</sup>Lei M, Hua X, Xiao M, Ding J, Han Q, et al. (2008) Impairments of astrocytes are involved in the d-galactose-induced brain aging. *Biochem Biophys Res Commun* 369: 1082-1087.
- <sup>247</sup>Maragakis N. J. and Rothstein J. D. (2006) Mechanisms of disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 2(12), 679–689.
- <sup>248</sup>Aviles-Reyes RX, Angelo MF, Villarreal A, Rios H, Lazarowski A, Ramos AJ. (2010) Intermittent hypoxia during sleep induces reactive gliosis and limited neuronal death in rats: implications for sleep apnea. *J Neurochem.* 112(4):854-69.
- <sup>249</sup>Obata F, Tohyama K, Bonev AD, Kolling GL, Keepers TR, et al. (2008) Shiga toxin 2 affects the central nervous system through receptor globotriaosylceramide localized to neurons. *J Infect Dis* 198: 1398-1406.
- <sup>250</sup>Barron KD, Marciano FF, Amundson R, Mankes R (1990) Perineuronal glial responses after axotomy of central and peripheral axons. A comparison. *Brain Res* 523: 219-229.
- <sup>251</sup>Moran LB, Graeber MB (2004) The facial nerve axotomy model. *Brain Res Brain Res Rev* 44:154-78.
- <sup>252</sup>Obata F, Tohyama K, Bonev AD, Kolling GL, Keepers TR, et al. (2008) Shiga toxin 2 affects the central nervous system through receptor globotriaosylceramide localized to neurons. *J Infect Dis* 198: 1398-1406.
- <sup>253</sup>Pastor AM, Moreno-López B, De La Cruz RR, Delgado-García JM (1997) Effects of botulinum neurotoxin type A on abducens motoneurons in the cat: ultrastructural and synaptic alterations. *Neuroscience* 81: 457-478.
- <sup>254</sup>Ballabh P, Braun A, Nedergaard M (2004) The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis* 16:1-13.
- <sup>255</sup>Garbuzova-Davis S, Louis MK, Haller EM, Derasari HM, Rawls AE, et al. (2011) Blood-Brain Barrier Impairment in an Animal Model of MPS III B. *PLoS ONE* 6(3): e16601. doi:10.1371/journal.pone.0016601
- <sup>256</sup>Fujii J, Kita T, Yoshida S, Takeda T, Kobayashi H, et al. (1994) Direct evidence of neuron impairment by oral infection with verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H- in mitomycin-treated mice. *Infect Immun* 62: 3447-3453.
- <sup>257</sup>Garbuzova-Davis S, Louis MK, Haller EM, Derasari HM, Rawls AE, et al. (2011) Blood-Brain Barrier Impairment in an Animal Model of MPS III B. *PLoS ONE* 6(3): e16601. doi:10.1371/journal.pone.0016601

- 
- <sup>258</sup>Goldstein J, Loidl CF, Creydt VP, Boccoli J, 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.
- <sup>259</sup>Mazzetti S., Frigerio S., Gelati M., Salmaggi A., Vitellaro-Zuccarello . , 2004. Lycopersicon esculentum lectin: an effective and versatile endothelial marker of normal and tumoral blood vessels in the central nervous system. *Eur J Histochem.* 2004 Oct-Dec;48(4):423-8.
- <sup>260</sup>Curry FE, Adamson RH. (2012) Endothelial glycocalyx: permeability barrier and mechanosensor. *Ann Biomed Eng.* 2012 Apr;40(4):828-39.
- <sup>261</sup>Salmon AH, Satchell SC. (2012) Endothelial glycocalyx dysfunction in disease: albuminuria and increased microvascular permeability. *J Pathol.*2012 Mar;226(4):562-74.
- <sup>262</sup>Murata F, Spicer SS (1974) Ultrastructural comparison of basophilic leukocytes and mast cell in the guinea pig. *Am J Anat* 139: 335-352.
- <sup>263</sup>Murata F, Spicer SS (1974) Ultrastructural comparison of basophilic leukocytes and mast cell in the guinea pig. *Am J Anat* 139: 335-352.
- <sup>264</sup>Florenzano F, Bentivoglio M (2000) Degranulation, density and distribution of mast cells in the rat thalamus: a light and electron microscopic study in basal conditions and after intracerebroventricular administration of nerve growth factor. *J Comp Neurol* 424: 651-669.
- <sup>265</sup>Strbian D, Karjalainen-Lindsberg ML, Tatlisumak T, Lindsberg PJ (2006) Cerebral mast cells regulate early ischemic brain swelling and neutrophil accumulation. *J Cereb Blood Flow Metab* 26: 605-612.
- <sup>266</sup>Uranova N, Orlovskaya D, Vikhрева O, Zimina I, Kolomeets N, Vostrikov V, Rachmanova V (2001) Electron microscopy of oligodendroglia in severe mental illness. *Brain Res Bull* 55: 597-610.
- <sup>267</sup>Kohutnicka M, Lewandowska E, Kurkowska-Jastrzebska I, Członkowski A, Członkowska A (1998) Microglial and astrocytic involvement in a murine model of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Immunopharmacology* 39: 167-180.
- <sup>268</sup>Uranova N, Orlovskaya D, Vikhрева O, Zimina I, Kolomeets N, Vostrikov V, Rachmanova V (2001) Electron microscopy of oligodendroglia in severe mental illness. *Brain Res Bull* 55: 597-610.
- <sup>269</sup>Berciano MT, Fernandez R, Pena E, Calle E, Villagra NT, et al. (1999) Necrosis of schwann cells during tellurium-induced primary demyelination: DNA fragmentation,

- 
- reorganization of splicing machinery, and formation of intranuclear rods of actin. *J Neuropathol Exp Neurol* 58: 1234-1243.
- <sup>270</sup>Uranova N, Orlovskaya D, Vikhрева O, Zimina I, Kolomeets N, Vostrikov V, Rachmanova V (2001) Electron microscopy of oligodendroglia in severe mental illness. *Brain Res Bull* 55: 597-610.
- <sup>271</sup> Goldstein J, Loidl CF, Creydt VP, Boccoli J, 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.
- <sup>272</sup> Goldstein J, Loidl CF, Creydt VP, Boccoli J, 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.
- <sup>273</sup> Obata F, Tohyama K, Bonev AD, Kolling GL, Keepers TR, et al. (2008) Shiga toxin 2 affects the central nervous system through receptor globotriaosylceramide localized to neurons. *J Infect Dis* 198: 1398-1406.
- <sup>274</sup> Ballabh P, Braun A, Nedergaard M (2004) The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis* 16:1-13.
- <sup>275</sup> Gerfen CR (2004) Basal ganglia, In: Paxinos, G. (Ed.), *The Rat Nervous System*, third edition. Elsevier Academic Press, London, pp. 455-508.
- <sup>276</sup> Gerfen CR (2004) Basal ganglia, In: Paxinos, G. (Ed.), *The Rat Nervous System*, third edition. Elsevier Academic Press, London, pp. 455-508.
- <sup>277</sup> West MO, Carelli RM, Pomerantz M, Cohen SM, Gardner JP, et al. (1990). A region in the dorsolateral striatum of the rat exhibiting single-unit correlations with specific locomotor limb movements. *J Neurophysiol* 64: 1233-1246.
- <sup>278</sup> Karin Weissenborn, MD, Frank Donnerstag, MD, Jan T. Kielstein, MD, Meike Heeren, MD, Hans Worthmann, MD, Hartmut Hecker, PhD, Roland Schmitt, MD, Mario Schiffer, MD, Thomas Pasedag, Ramona Schuppner, Anita B. Tryc, MD, Peter Raab, MD, Hans Hartmann, MD, Xiaoqi Q. Ding, MD, PhD, Carsten Hafer, MD, Jan Menne, MD, Bernhard M.W. Schmidt, MD, Eva Bültmann, MD, Hermann Haller, MD, Reinhard Dengler, MD, Heinrich Lanfermann, MD and Anja M. Giesemann, MD (2012), Neurologic manifestations of E coli infection–induced hemolytic-uremic syndrome in adults, *Neurology* 2012;79;1466
- <sup>279</sup> Amirlak, I., and B. Amirlak. (2006) Haemolyticuraemic syndrome: an overview. *Nephrology* 11:213-218.
- <sup>280</sup> Karmali, M., 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 stool. *Lancet* i: 619- 620.
- <sup>281</sup> Craig S. Wong<sup>1</sup>, Jody C. Mooney<sup>2</sup>, John R. Brandt<sup>1</sup>, Amy O. Staples<sup>1</sup>, Srdjan Jelacic<sup>2</sup>, Daniel R. Boster<sup>2</sup>, Sandra L. Watkins<sup>2</sup>, and Phillip I. Tarr<sup>3</sup> (2012) Risk Factors for the Hemolytic Uremic Syndrome in Children Infected With *Escherichia coli* O157:H7: A Multivariable Analysis, *Clin Infect Dis.* 55 (1): 33-41.
- <sup>282</sup> Michael J. Smith, Angela R. Melton-Celsa, James F. Sinclair, Humberto M. Carvalho, Cory M. Robinson, Alison D. O'Brien\* (2009) Monoclonal Antibody 11E10, Which Neutralizes Shiga Toxin Type 2 (Stx2), Recognizes Three Regions on the Stx2 A Subunit, Blocks the Enzymatic Action of the Toxin In Vitro, and Alters the Overall Cellular Distribution of the Toxin. *Infect Immun.* July; 77(7): 2730–2740.
- <sup>283</sup> Hauswaldt S., Nitschke M., Sayk F., Solbach W., Knobloch J, (2012) Lessons Learned From Outbreaks of Shiga Toxin Producing *Escherichia coli* *Curr Infect Dis Rep.* 2013 February; 15(1): 4–9.
- <sup>284</sup> Silberstein C, Lucero MS, Zotta E, Copeland DP, Lingyun L, Repetto HA, Ibarra C. (2011) A glucosylceramide synthase inhibitor protects rats against the cytotoxic effects of shiga toxin 2. *Pediatr Res.* May;69(5 Pt 1):390-4.
- <sup>285</sup> Takahashi K, Funata N, Ikuta F, Sato S. (2008) Neuronal apoptosis and inflammatory responses in the central nervous system of a rabbit treated with Shiga toxin-2. *J Neuroinflammation.* Mar 21;5:11.
- <sup>286</sup> Kita E, Yunou Y, Kurioka T, Harada H, Yoshikawa S, Mikasa K, Higashi N. (2000) Pathogenic mechanism of mouse brain damage caused by oral infection with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun.* Mar;68(3):1207-14.
- <sup>287</sup> Sasaki S, Omoe K, Tagawa Y, Iwakura Y, Sekikawa K, Shinagawa K, Nakane A. (2002) Roles of gamma interferon and tumor necrosis factor-alpha in shiga toxin lethality. *MicrobPathog.* 2002 Jul;33(1):43-7.
- <sup>288</sup> Okayama A, Mikasa K, Matsui N, Higashi N, Miyamoto M, 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.* Dec 15;190(12):2129-36.
- <sup>289</sup> Fujii J, Kinoshita Y, Matsukawa A, Villanueva SY, Yutsudo T, Yoshida S. (2009) Successful steroid pulse therapy for brain lesion caused by Shiga toxin 2 in rabbits. *MicrobPathog.* Apr;46(4):179-84.
- <sup>290</sup> Van de Beek D, de Gans J, McIntyre P, Prasad K (2007) Corticoids for acute bacterial meningitis. *Cochrane Database Syst Rev* (1): CD004405doi:10.1002/14651858.
- <sup>291</sup> Mary L Previti, Weibing Zhang and William E Van Nostrand (2006) Dexamethasone diminishes the pro-inflammatory and cytotoxic effects of amyloid  $\beta$ -protein in cerebrovascular smooth muscle cells. *Journal of Neuroinflammation* 2006, 3:18
- <sup>292</sup> Sun H, Yang T, Li Q, Zhu Z, Wang L, Bai G, Li D, Li Q, Wang W. (2012) Dexamethasone and vitamin B(12) synergistically promote peripheral nerve regeneration in rats by upregulating the expression of brain-derived neurotrophic factor. *Arch Med Sci.* 2012 Nov 9;8(5):924-30
- <sup>293</sup> Kopicová J, Púzerová A, Bernátová I. (2012) L-NAME in the cardiovascular system - nitric oxide synthase activator? *Pharmacol Rep.* 2012;64(3):511-20.
- <sup>294</sup> Marc Feldmann & Ravinder N Maini (2003) TNF defined as a therapeutic target for rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nature Medicine* 9, 1245 - 1250 (2003)

- 
- <sup>295</sup> Madhusudan S, Muthuramalingam S, Braybrooke J., Wilner S, Kaur K, Han C, Hoare S, Balkwill F, Ganesan T (2005) Study of Etanercept, a Tumor Necrosis Factor-Alpha Inhibitor, in Recurrent Ovarian Cancer JCO September 1, 2005 vol. 23 no. 25 5950-5959
- <sup>296</sup> Okayama A, Mikasa K, Matsui N, Higashi N, Miyamoto M, 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.* Dec 15;190(12):2129-36.
- <sup>297</sup> Deree J, Martins JO, Melbostad H, Loomis WH, Coimbra R. (2008). "Insights into the Regulation of TNF- $\alpha$  Production in Human Mononuclear Cells: The Effects of Non-Specific Phosphodiesterase Inhibition". *Clinics (Sao Paulo)*. 63 (3): 321–8.
- <sup>298</sup> Peters-Golden M, Canetti C, Mancuso P, Coffey MJ. (2005). "Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses". *J Immunol.* 174 (2): 589–94. PMID 15634873.
- <sup>299</sup> Britton R & Versalovic J. (2008) Probiotics and Gastrointestinal Infections. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, Volume 2008, Article ID 290769
- <sup>300</sup> Liu JR, Chen MJ, Lin CW. (2005) Antimutagenic and antioxidant properties of milk-kefir and soymilk-kefir. *J Agric Food Chem.* Apr 6;53(7):2467-74.
- <sup>301</sup> Vinderola G, Perdigón G, Duarte J, Farnworth E, Matar C. (2006) Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirianofaciens* on the gut mucosal immunity. *Cytokine.* 2006 Dec;36(5-6):254-60
- <sup>302</sup> Zacconi, C., Parisi, M.G., Sarra, P.G., Dallavalle, P., (1995) Competitive exclusion of *Salmonella kedougou* in kefir fed chicks. *Microbiologie, Aliments, Nutrition* 12, 387–390.
- <sup>303</sup> Garrote, G.L., Abraham, A.G., De Antoni, G.L., (2000). Inhibitory power of kefir: the role of organic acids. *Journal of Food Protection* 63, 364–369.
- <sup>304</sup> Kakisu EJ, Abraham AG, Pérez PF, De Antoni GL. (2007) Inhibition of *Bacillus cereus* in milk fermented with kefir grains. *J Food Prot.* 2007 Nov;70(11):2613-6.
- <sup>305</sup> Oberhelman RA, Gilman RH, Sheen P, Taylor DN, Black RE, Cabrera L, Lescano AG, Meza R, Madico G (1999) A placebo-controlled trial of *Lactobacillus GG* to prevent diarrhea in undernourished Peruvian children. *J. Pediatr.* 134: 1-2.
- <sup>306</sup> Szymanski H, Pejcz J, Jawien M (2006) Treatment of acute infectious diarrhoea in infants with a mixture of three *Lactobacillus rhamnosus* strains: a randomised double blind placebo controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther*; 23(2): 247-253.
- <sup>307</sup> Ingrassia I, Leplingard A, Darfeuille-Michaud A (2005) *Lactobacillus casei* DN-114 001 inhibits the ability of adherent-invasive *Escherichia coli* isolated from Crohn's disease patients to adhere and to invade intestinal epithelial cells. *Applied and Environmental Microbiology* 71:2880-7.
- <sup>308</sup> Fernández MF, Boris S, Barbes C (2003). Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *J. Appl. Microbiol.* 94: 449-455
- <sup>309</sup> Sherman P.M., Johnson-Henry K.C., Yeung H.P., Ngo P.S., Goulet J., Tompkins T.A. (2005) Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7- and enteropathogenic *E. coli* O127:H6-induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements *Infect Immun* 73
- <sup>310</sup> Medellín-Peña MJ, Griffiths MW. (2009). Effect of molecules secreted by *Lactobacillus acidophilus* strain La-5 on *Escherichia coli* O157:H7 colonization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(4): 1165-1172.



- 
- <sup>311</sup>Matijasic BB, Stojkovic S, Rogelj I.(2006) Survival and in vivo adhesion of human isolates *Lactobacillus gasseri* LF221 and K7 in weaned piglets and their effects on coliforms, clostridia and lactobacilli viable counts in faeces and mucosa. *J Dairy Res.* 2006 Nov;73(4):417-22
- <sup>312</sup>Golowczyc MA, Mobili P, Garrote GL, Abraham AG, De Antoni GL (2007) Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Int J Food Microbiol.* 2007 Sep 30;118(3):264-73.
- <sup>313</sup>Hussein HS, Bollinger LM.(2005) Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle. *J Food Prot*;68:2224-41.
- <sup>314</sup>Meichtri L, Gioffré A, Miliwebsky E, Chinen I, Chillemi G, Masana M, et al. (2004) Prevalence and characterization of Shiga toxin producing *Escherichia coli* in beef cattle from Argentina. *J Food Microbiol*;96:189-98.
- <sup>315</sup>Kang SJ, Ryu SJ, Chae JS, Eo SK, Woo GJ, Lee JH. (2004) Occurrence and characteristics of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in calves associated with diarrhoea. *Vet Microbiol.* 2004;98:323-8.
- <sup>316</sup>Hussein HS, Bollinger LM.(2005) Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle. *J Food Prot*, 68:2224-41.
- <sup>317</sup>Clabough, D. L., H. S. Conboy, and M. C. Roberts (1989). Comparison of four screening techniques for the diagnosis of equine neonatal hypogammaglobulinemia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 194:1717– 1720
- <sup>318</sup> Pistone Creydt Virginia (2004), Stx2 provoca la acumulación de fluidos en el colon de rata en colon loops in VIVO, esto se relaciona con el daño del tejido colónico epitelial. *Jw144144Stx2 in vitro inhibe el flujo absortivo a través del colon humano IN VITRO.* 144144Brazilian Journal,
- <sup>319</sup> Mossman, 1983
- <sup>320</sup> Mori S, Watanabe W, Shigeta S. (1995) A colorimetric LDH assay for the titration of infectivity and the evaluation of anti-viral activity against ortho- and paramyxoviruses. *Tohoku J Exp Med.* 1995 Dec;177(4):315-25.
- <sup>321</sup> Kita E, Yunou Y, Kurioka T, Harada H, Yoshikawa S, Mikasa K, Higashi N. (2000) Pathogenic mechanism of mouse brain damage caused by oral infection with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun.* 2000 Mar;68(3):1207-14.
- <sup>322</sup>Kiyomi Takahashi, Nobuaki Funata, Fusahiro Ikuta and Shigehiro Sato (2008) Neuronal apoptosis and inflammatory responses in the central nervous system of a rabbit treated with Shiga toxin-2 *Journal of Neuroinflammation*, 5:11 doi:10.1186/1742-2094-5-11
- <sup>323</sup> Okayama A, Mikasa K, Matsui N, Higashi N, Miyamoto M, 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.* Dec 15;190(12):2129-36.
- <sup>324</sup>Van De Kar, N. C. A. J., T. Kooistra, M. Vermeer, W. Lesslauer, L. A. H. Monnens, and V. W. M. van Hinsbergh. 1995. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces endothelial galactosyltransferase activity and verocytotoxin receptors. Role of specific tumor necrosis factor receptors and protein kinase C. *Blood* 85:734–743.
- <sup>325</sup>Tesh, V. L., J. E. Samuel, L. P. Perera, J. B. Sharefkin, and A. D. O'Brien.(1991) 1991. Evaluation of the role of Shiga and Shiga-like toxins in mediating direct damage to human vascular endothelial cells. *J. Infect. Dis.* 164:344–352.
- <sup>326</sup>Isogai, E., H. Isogai, K. Kimura, S. Hayashi, T. Kubota, N. Fujii, and K. Takeshi. 1998. Role of tumor necrosis factor  $\alpha$  in gnotobiotic mice

- 
- infected with an *Escherichia coli* O157:H7 strain. *Infect. Immun.* 66:197–202.
- <sup>327</sup>Takahashi K, Funata N, Ikuta F, Sato S. Neuronal apoptosis and inflammatory responses in the central nervous system of a rabbit treated with Shiga toxin-2. *J Neuroinflammation* 2008;5:11.
- <sup>328</sup>Tunkel AR, Scheld WM. Pathogenesis and pathophysiology of bacterial meningitis. *Annu Rev Med* 1993;44:103–20.
- <sup>329</sup>Zhao T, Doyle MP, Harmon BG, Brown CA, Mueller PO, Parks AH. (1998) Reduction of carriage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cattle by inoculation with probiotic bacteria. *J Clin Microbiol.* Mar;36(3):641-7.
- <sup>330</sup>Medellin-Peña MJ, Griffiths MW. (2009). Effect of molecules secreted by *Lactobacillus acidophilus* strain La-5 on *Escherichia coli* O157:H7 colonization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(4): 1165-1172.
- <sup>331</sup>Hugo AA, Kakisu E, De Antoni GL, Perez PF (2008) Lactobacilli antagonize biological effects of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in vitro. *Lett Appl Microbiol* 46:613–619
- <sup>332</sup>Kim Y, Han KS, Imm JY, Oh S, You S, Park S, Kim SH. (2006) Inhibitory effects of *Lactobacillus acidophilus* lysates on the cytotoxic activity of shiga-like toxin 2 produced from *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl Microbiol.* 2006 Nov;43(5):502-7.
- <sup>333</sup>Carey CM, Kostrzynska M, Ojha S, Thompson S. (2008) The effect of probiotics and organic acids on Shiga-toxin 2 gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Microbiol Methods.* 2008 May;73(2):125-32.
- <sup>334</sup>Asahara T, Shimizu K, Nomoto K, Hamabata T, Ozawa A, Takeda Y. (2004) Probiotic bifidobacteria protect mice from lethal infection with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun.* 2004 Apr;72(4):2240-7.
- <sup>335</sup>Nakamura A, Imaizumi A, Kohsaka T, Huang C, Huang C, Johns EJ. (2012) The actions of Shiga toxin-2 administration into the brain on renal sympathetic nerve activity. *Clin Exp Nephrol.* 2012 Jun;16(3):382-8