

Tesis Doctoral

Interacción entre la respuesta trombótica y la respuesta inflamatoria en el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH)

Abrey Recalde, María Jimena

2016-03-29

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

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

Cita tipo APA:

Abrey Recalde, María Jimena. (2016-03-29). Interacción entre la respuesta trombótica y la respuesta inflamatoria en el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Abrey Recalde, María Jimena. "Interacción entre la respuesta trombótica y la respuesta inflamatoria en el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH)". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-03-29.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

“Interacción entre la respuesta trombótica y la respuesta inflamatoria en el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH)”

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

Lic. María Jimena Abrey Recalde

Director de tesis: Dra. Marina S. Palermo

Consejero de Estudios: Dr. Eduardo Artz

Lugar de trabajo: Instituto de Medicina Experimental (IMEX-CONICET). Academia Nacional de Medicina. Laboratorio de Patogénesis e Inmunología de Procesos Infecciosos.

Buenos Aires, 2015

Interacción entre la respuesta trombótica y la respuesta inflamatoria en el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH)

El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), enfermedad caracterizada por anemia hemolítica, trombocitopenia y falla renal aguda, está asociado a infecciones enterohemorrágicas con *Escherichia coli* productores de toxina Shiga (Stx) (STEC).

Si bien el daño endotelial, generado por Stx, ha sido reconocido como el principal evento que conduce al estado protrombótico en el SUH, existen otros mecanismos que todavía no han sido completamente identificados. La interacción entre la respuesta trombótica e inflamatoria ha sido recientemente reportada en diversas patologías y dada la importancia de ambas en el SUH, hipotetizamos que podría tener un rol destacable en su desarrollo. En efecto, nuestro objetivo fue evaluar los mecanismos de activación de la respuesta trombótica y su interacción con la respuesta inflamatoria en el SUH. Utilizando un modelo murino de SUH, detectamos que Stx2 indujo directa o indirectamente una marcada activación plaquetaria que contribuyó con la respuesta inflamatoria a través de la activación del sistema de complemento y la formación de complejos entre Plaquetas y leucocitos polimorfonucleares (PMN). Por otro lado, en un sistema *in vitro*, se vió que Stx2 indujo un daño endotelial que derivó en la activación y adhesión plaquetaria. Por último, en ambos modelos, se observó la capacidad del antioxidante N-acetil-L-Cisteína (NAC) de prevenir los efectos protrombóticos de Stx2. En conclusión, en esta tesis hemos descrito como Stx2, mediante el daño endotelial, activa la respuesta trombótica y como el estrés oxidativo contribuye a este proceso. Asimismo hemos probado la participación de las plaquetas en la activación de la respuesta inflamatoria. Finalmente, dados los efectos preventivos de la NAC proponemos su uso en la etapa prodrómica de la diarrea.

Palabras Claves: SUH, Stx, estrés oxidativo, respuesta trombótica, respuesta inflamatoria.

Interaction between thrombotic and inflammatory response in Hemolytic Uremic Syndrome (HUS)

Hemolytic uremic syndrome (HUS) is a disease characterized by hemolytic anemia, thrombocytopenia and acute kidney failure. HUS is associated with Shiga toxin (Stx) producing *Escherichia coli* (STEC) infections.

While endothelial damage induced by Stx, has been recognized as the main event leading to the prothrombotic state in HUS, there are other mechanisms that have not yet been fully identified.

The interaction between thrombotic and inflammatory response has been recently reported in various diseases, since both are important in HUS, we hypothesize that could have a prominent role in its development.

In fact, our objective was to evaluate the activation mechanisms of thrombotic response and its interaction with the inflammatory response in HUS. Using a mouse model of HUS, we found that Stx2 directly or indirectly induced a marked platelet activation which contribute to the inflammatory response through activation of the complement system and the formation of complexes between platelets and polymorphonuclear leukocytes (PMN).

Moreover, in an in vitro system, it was found that Stx2 induced endothelial damage that led to the activation and platelet adhesion. Finally, we observed in both models, the ability of antioxidant drug N-acetyl-L-Cysteine (NAC) to prevent Stx2 prothrombotic effects. In conclusion, in this thesis we have described that Stx2 through endothelial damage, enhances the thrombotic response and the oxidative stress contributes to this process. We have also tested the involvement of platelets in activation of inflammatory response. Finally, given the preventive effects of NAC we propose its use in the prodromal stage of diarrhea.

Key words: HUS, Stx, oxidative stress, thrombotic response, inflammatory response

Durante todo el tiempo que me llevó escribir la tesis tuve en mente a toda la gente a la que le tenía que agradecer y que cosas decirle a cada uno. Sin embargo, ahora que llegó ese momento, no encuentro la manera de resumir lo inmensamente agradecida que estoy. Indudablemente, finalizar la tesis no es algo que pueda lograr uno solo. De hecho me hubiese resultado imposible si no hubiese contado con todas esas personas que me acompañaron, me apoyaron, me escucharon, me consolaron y me ayudaron en este largo camino.

Gracias a mis papás por haberme apoyado siempre en todas las decisiones, por haberme dejado hacer lo que me gusta y por haberme impulsado a estudiar. Gracias por haberme dado la posibilidad de venir a Buenos Aires y haber podido dedicarme de lleno al estudio. Gracias a los dos por todos los esfuerzos que hicieron por mí.

Gracias a mis hermanas por su incondicionalidad, por ser mis pilares fundamentales en la vida, porque a pesar de que a veces desaparezco siempre estuvieron cuando las necesité. Gracias por hacerme reír recordando anécdotas de nuestra infancia en Bolívar, gracias también por las peleas que nos ayudaron a crecer y a darnos cuenta cuanto nos necesitamos!!

Gracias a mis dos abuelas, a mi abuela paterna por haberme recibido en su casa cuando me vine a estudiar y por haberme apoyado en ese año tan difícil. A mi abuela materna, gracias por todo lo que nos ayudaste siempre, por tus mates antes de irme a trabajar y por tus comidas que son las más ricas que comí en mi vida.

Gracias a Lean, mi amor, por estar siempre a mi lado, por ser otro pilar en mi vida. Por tu apoyo y tu contención en estos dos años. Gracias por cuidarme y por pensar siempre en mí. Por todos los momentos compartidos y los viajes que hicimos. Gracias también a tu familia por siempre incluirme en todo y por supuesto gracias a tu mamá por todas las viandas que me preparó para traer al trabajo.

Gracias a Marina, mi directora. Gracias por haberme dado esta oportunidad y por brindarme un lugar en el laboratorio. Gracias por guiarme, por enseñarme, por

entenderme, por escucharme y sobre todo gracias por confiar en mí. Gracias por dejarme proponer ideas y por tu apoyo constante. Pero fundamentalmente gracias por estar siempre presente!!

Gracias a Pili, mi amiga, mi sostén, mi compañera en el labo y en el deporte. Gracias por ese oído que me prestaste todos estos años. Gracias por contenerme y por ayudarme siempre en todo lo que necesité. Gracias por enseñarme todo, desde usar el Photoshop hasta agarrar un ratón. Gracias también por los momentos compartidos en los juegos deportivos y en los partidos, por los almuerzos y las meriendas en Mc Donald. En fin, gracias por ser mi amiga!!

Gracias a Vicky, mi amiga, mi hermana mayor. Por todo lo que me enseñaste, por escucharme, por contenerme. Gracias por compartir tu espacio de investigadora grande conmigo, por prestarme la compu para que pudiese trabajar y escribir la tesis. Gracias también por todos esos mates que compartimos. Gracias por los viajes, las meriendas y todos los demás momentos que vivimos juntas!

Gracias a Romi, amiga y compañera. Por todo lo que me enseñaste, por toda tu ayuda y contención. Por todos los mates reconfortantes en la mitad de un día caótico. Gracias por los momentos en la pileta y por ser mi compañera de sol. Gracias por todas las meriendas, cenas y salidas compartidas!!

Gracias a Andre, por todos los momentos compartidos este año, por escucharme siempre y sobre todo por no interrumpirme cuando hablo!!!

Gracias a Gonza, por compartir su compu conmigo y por su alegría y buena onda. Te deseo mucha suerte en esta nueva etapa que comenzás.

Gracias a Martin, “el doctor martincho”, por ser una enciclopedia humana y despejar mis dudas. Gracias por estar siempre dispuesto a ayudar.

Gracias a mis compañeros que se fueron, Leti, Gabo y Anita. Por su gran apoyo y por todos los momentos compartidos.

Gracias a las cacatúas, tremendas amigas que me dejó la facu y por supuesto también a Juan. Gracias por estar siempre, por todas las juntadas, cenas, asados, meriendas. Gracias por todas las alegrías que me hicieron vivir y por todas esas risas. En definitiva, gracias por su amistad!!

Gracias a mis amigas de la infancia, porque a pesar de que nos vemos poco, cuando nos juntamos parece que el tiempo no pasó. Gracias por haberme acompañado todos estos años.

Gracias a mis amigas del deporte, por siempre levantarme el ánimo y por creer en mí. Porque su apoyo y buena energía me ayudaron a seguir adelante en los momentos de frustración.

Gracias a Fabi, por tu inmensa ayuda en toda mi tesis. Gracias por transmitirme tus conocimientos de plaquetas y por estar siempre ahí para todo lo que necesité. Sos una genia!!

Gracias a Martita y a Romi, por su enorme colaboración. Por haberme ayudado siempre en todo, por su buena predisposición, una gran parte de mi tesis se pudo realizar gracias a ustedes!

Gracias a todos los chicos del primer y tercer piso, a los que están y a los que se fueron: Deni, Lu, Dai, Mer, Merceditas, Juan, Carmencita, Bar, Moli, Noel y Gaby C.

Gracias a Evelita, por toda tu ayuda y colaboración. Sin vos el laboratorio sería un caos.

Índice

Página

- Resumen	2
- Resumen en Inglés	3
- Agradecimientos	4
- Abreviaturas	12
1-Introducción	15
1.1-Características generales del SUH	16
1.1.1- Epidemiología	17
1.1.2- Cuadro clínico.	18
1.1.3- Fisiopatología	19
1.2- La toxina Stx.	21
1.2.1- Estructura	21
1.2.2- Receptores de Stx	22
1.2.3- Transporte retrogrado y mecanismo de toxicidad	24
1.3- Hemostasia y función plaquetaria	24
1.3.1- Concepto clásico de coagulación	26
1.3.2- Concepto actual de la coagulación	28
1.3.3- Participación de la respuesta trombótica en el SUH	29
1.3.4- Trombocitopenia	31
1.4- Participación de la respuesta inflamatoria en el SUH	31
1.5- Interacción entre la respuesta trombótica e inflamatoria	35
1.5.1-CD40L soluble(sCD40L)	36
1.5.1.1- Activación de plaquetas vía CD40 y Glicoproteína IIb/IIIa	37
1.5.1.2- Producción de ROS	37
1.5.1.3- Expresión de FT por células endoteliales y monocitos	38
1.5.2- El sistema de complemento	39
1.5.2.1-El sistema de complemento en el SUH típico	40
1.6- Estrés oxidativo	43

1.6.1- Tipos celulares involucrados en la producción de ROS	43
1.6.2- Agentes antioxidantes	45
1.6.2.1-Agentes antioxidantes endógenos	45
1.6.2.2-Agentes antioxidantes exógenos	46
-N-acetil-L-Cisteína (NAC)	46
-S-etil-L-Cisteína (SEC)	47
1.6.3- Estrés oxidativo y activación plaquetaria	47
1.6.3.1-Influencia de ROS exógenas en la función plaquetaria	47
1.6.4- SUH y estrés oxidativo.	48
2- Objetivos	49
-Objetivo general	50
-Objetivos específicos	51
3- Materiales y Métodos	52
3.1-Estudios en el modelo murino.	53
3.1.1-Reactivos generales.	53
3.1.2-Ratones	53
3.1.3-Tratamientos <i>in vivo</i>	53
3.1.3.1-Stx2	53
3.1.3.2- NAC y SEC	54
3.1.4- Obtención de plasma rico en plaquetas (PRP)	54
3.1.5 - Determinación de urea plasmática.	54
3.1.6 - Recuento de células de sangre periférica.	55
3.1.7- Ensayo de unión de fibrinógeno.	55
3.1.8- Purificación de plaquetas murinas a partir de sangre entera	55
3.1.9- Expresión de P-selectina	55
3.1.10- Evaluación de depósito de C3b en la membrana plaquetaria	56
3.1.11- Evaluación de Complejos PMN-Plaquetas	56
3.2- Estudios en el modelo <i>in vitro</i> .	56
3.2.1- Reactivos	56

3.2.2- Buffers y medios de cultivo	57
3.2.3- Cultivos de células endoteliales de microvasculatura renal humana	57
3.2.4- Purificación de Plaquetas a partir de sangre humana.	57
3.2.5- Cultivos de HGEC y plaquetas	58
3.2.6- Estimulación de plaquetas con Stx2.	58
3.2.7- Tratamiento con NAC	58
3.2.8- Ensayo de citotoxicidad con rojo neutro.	58
3.2.9- Ensayo de fosfatasa ácida.	59
3.2.10- Determinación de sCD40L.	59
3.2.11- Depleción de sCD40L de plasmas humanos.	59
3.2.12- Purificación de leucocitos mononucleares de sangre periférica	59
3.2.13- Determinación del estallido respiratorio en monocitos	60
3.2.14- Determinación de la expresión de FT en monocitos	60
3.2.15- Ensayo funcional del FT	61
3.2.16- Determinación de TNF- α e IL1- β en sobrenadantes de leucocitos mononucleares	61
4- Resultados	62
4.1- Estudios en el modelo murino de SUH	63
4.1.1- Evaluación de la mortalidad causada por Stx2	63
4.1.2- Evaluación del daño sistémico causado por Stx2	64
4.1.2.1- Efecto de Stx2 sobre la función renal: determinación de Uremia	64
4.1.2.2- Efecto de Stx2 sobre el número de leucocitos de sangre periférica	65
4.1.3- Efecto de Stx2 sobre la Respuesta Trombótica	66
4.1.3.1- Efecto de Stx2 sobre el número de plaquetas circulantes	66
4.1.3.2- Efecto de Stx2 sobre la activación plaquetaria	66
4.1.4- Efecto de Stx2 en la formación de complejos plaqueta-PMN	69
4.1.5- Efecto de Stx2 sobre la interacción entre plaquetas y sistema de complemento	71
4.1.6- Efecto de antioxidantes sobre el daño causado por Stx2	72

4.1.6.1- Efecto de NAC y SEC sobre el índice de sobrevida	72
4.1.6.2- Efecto de NAC sobre los parámetros de daño sistémico causado por Stx2	73
4.1.6.2.1- Efecto de NAC sobre el daño renal causado por Stx2: Determinación de Uremia	73
4.1.6.2.2- Efecto de NAC sobre las alteraciones leucocitarias causadas por Stx2	74
4.1.6.3- Efecto de NAC sobre la activación plaquetaria inducida por Stx2	76
4.1.6.4- Efecto de NAC en la formación de complejos Plaqueta-PMN	78
4.2- Estudios en el modelo <i>in vitro</i> .	80
4.2.1- Efecto de las plaquetas sobre el daño endotelial causado por Stx2	80
4.2.2- Adhesión de las plaquetas al endotelio dañado por Stx2	82
4.2.3- Efecto del endotelio dañado por Stx2 en la liberación plaquetaria de sCD40L	84
4.2.4- Efecto directo de Stx2 sobre la liberación plaquetaria de sCD40L	85
4.2.5- Efecto de NAC sobre el daño endotelial inducido por Stx2	85
4.2.6- Efecto de NAC sobre la adhesión plaquetaria inducida por Stx2	87
4.2.7- Efecto de NAC sobre la liberación plaquetaria de sCD40L	89
4.3- Estudios en pacientes con SUH	90
4.3.1- Niveles plasmáticos de sCD40L en pacientes con SUH	90
4.3.2- Correlación entre niveles plasmáticos de sCD40L y el número de plaquetas circulantes.	91
4.3.3- Correlación entre niveles de sCD40L y niveles de Urea y Creatinina en plasma	92
4.3.4- Efecto del plasma de pacientes con SUH sobre monocitos	93
4.3.4.1- Efecto del plasma de pacientes con SUH en la producción de ROS (estallido respiratorio) por monocitos	93
4.3.4.2- Efecto del plasma de pacientes con SUH en la expresión de FT por monocitos	96

4.3.5- Participación de sCD40L presente en plasma de pacientes con SUH en los efectos observados sobre monocitos	98
4.3.5.1- Depleción de sCD40L en plasmas de pacientes con SUH e individuos sanos	98
4.3.5.2- Rol de sCD40L presente en el plasma de pacientes con SUH sobre la producción de ROS (estallido respiratorio) en monocitos	99
4.3.5.3- Rol de sCD40L presente en el plasma de pacientes con SUH sobre la expresión de FT en monocitos	101
4.3.5.4- Rol de sCD40L presente en el plasma de pacientes con SUH sobre la liberación de IL1- β y TNF- α por monocitos	103
5- Discusión	105
6- Referencias	126

Abreviaturas

5-HT: Serotonina

AA: Acido Araquidónico

ADP: Adenosina difosfato

β -TG: β -Tromboglobulina

β -TM: β -Tombomodulina

D-: Diarrea negativo

D+: Diarrea positivo

DHR-123: Dihidrorodamina-123

DO: Densidad óptica

ECGF: Factor de crecimiento de células endoteliales

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EHEC: *Escherichia coli* enterohemorrágicas

eNOS: Isoforma endotelial de la Óxido Nítrico Sintetasa

ESM: Error estándar de la media

e.v.: endovenoso

FB: Factor B

FI: Factor I

FITC: Isotiocianato de Fluoresceína

FH: Factor H

FT: Factor Tisular

G-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos

Gb₃: Globotriaosilceramida

Gb₄: Globotetraosilceramida

GP: Glicoproteína

GSH: Glutati3n reducido

GSSG: Glutati3n oxidado

HGEC: Células endoteliales glomerulares humanas

HMWK: Quinin3geno de alto peso molecular

iC3b: C3b inactivo
IMF: Intensidad media de fluorescencia
i.p.: Intraperitoneal
LDH: Lactato deshidrogenasa
LPS: Lipopolisacárido
MCP: Proteína cofactor de membrana
MDA: Malondialdehído
NAC: N-acetil-L-cisteína
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NO: Óxido Nítrico
PE: Ficoeritrina
PECAM-1: Molécula de Adhesión de Plaqueta a Célula Endotelial-1
PF4: Factor plaquetario 4
PGF: Factor de crecimiento de plaquetas
PGI₂: Prostaglandina I₂
p.i.: Post inoculación
PLA2: Fosfolipasa A2
PMA: Forbol-Acetato Miristato
PNP: p-nitrofenilfosfato
PRP: Plasma rico en plaquetas
PTT: Purpura trombocitopénica trombótica
RE: Retículo endoplasmático
ROS: Especies reactivas del oxígeno
rpm: Revoluciones por minuto
SEC: S-Etil-L-Cisteína
SFB: Suero Fetal Bovino
sCD40L: CD40L soluble
SNC: Sistema nervioso Central
SOD: Super óxido dismutasa

STEC: *Escherichia coli* productora de toxina Shiga

Stx: Toxina Shiga

SUH: Síndrome Urémico Hemolítico

TAFI: Inhibidor de Fibrinólisis activable por trombina

TxA₂: Tromboxano A₂

vWF : Factor von Willebrand

Introducción

1- Introducción

1.1- Características generales del SUH

El síndrome urémico hemolítico (SUH) es un desorden trombótico, caracterizado por anemia hemolítica (eritrocitos fragmentados), trombocitopenia y grados variables de insuficiencia renal [1]. Existen dos tipos de SUH, etiológicamente diferentes: el típico o post enteropático (SUH D+) y el atípico o idiopático (SUH D-)[2]. La mayoría de los pacientes con SUH atípico tienen un defecto en la vía alternativa del complemento. Entre ellos podemos mencionar a las mutaciones en los genes para el factor H, el factor I, o un déficit en una proteína constitutiva de la pared celular llamada proteína cofactor de membrana (MCP). Las mutaciones en el factor H son las descritas más frecuentemente [3]. Sin embargo, también han sido descritos casos de SUH atípico con función normal del sistema complemento. En esos pacientes se han detectado defectos en la proteasa ADAMTS 13, cuya función consiste en inactivar multímeros del factor von Willebrand (vWF), determinando su persistencia en circulación y estimulando la agregación plaquetaria y la lesión endotelial [4].

El SUH típico afecta principalmente a niños entre seis meses y cinco años de edad (aunque también puede producirse en adultos) y es usualmente precedido por un pródromo de diarrea sanguinolenta. En Argentina, constituye la causa más frecuente de insuficiencia renal aguda pediátrica, la segunda causa de insuficiencia renal crónica y es responsable del 20% de los trasplantes renales en niños y adolescentes [5]. En la etapa aguda de la enfermedad la mortalidad es de entre un 2 y 4% de los niños afectados.

Si bien en un principio se especuló que el agente etiológico era de origen viral [1], luego se demostró que el agente etiológico del SUH es una endotoxina denominada toxina Shiga (Stx), producida por *Shigella* y ciertas cepas de *Escherichia coli* enterohemorrágicas (EHEC). La cepa de *E. coli* O157:H7 es la de mayor importancia epidemiológica, aunque existen muchas otras también capaces de causar la enfermedad (O26, O111, O113, O121, O145, etc.).

La bacteria es capaz de colonizar el intestino y secretar la Stx la cual, por un mecanismo aún no completamente elucidado, atraviesa la barrera intestinal, ingresa a la circulación y alcanza su órgano blanco, el riñón. Allí se internaliza a través de su receptor específico globotriaosilceramida (Gb₃) y causa el efecto citotóxico inhibiendo la síntesis proteica. Se estima que aproximadamente el 10 % de las infecciones por EHEC, en niños menores de 10 años, evolucionan hacia el SUH [6].

Actualmente no existe un tratamiento específico para el SUH, sino más bien terapias de soporte destinadas a paliar los síntomas, constituyendo la diálisis peritoneal el principal tratamiento para eliminar los metabolitos tóxicos y reducir el daño renal agudo. De esta forma se ha logrado disminuir significativamente la mortalidad, sin embargo, un 5% de niños con SUH desarrolla insuficiencia renal crónica, requiriendo en pocos años diálisis o trasplante renal[7].

1.1.1- Epidemiología

El SUH es la causa más frecuente de insuficiencia renal aguda en la infancia en Argentina. Está ampliamente distribuido en el mundo y frecuentemente se lo describe como una enfermedad epidémica con baja tasa de incidencia en países industrializados, como EE.UU, Canadá y Japón (1-3 casos/100.000 niños menores de 5 años). En cambio, dentro de América del Sur presenta una tasa de incidencia significativamente mayor. Por ejemplo, en Chile y Uruguay se producen 4-5 casos/100.000 niños menores de 5 años por año. En nuestro país se registran aproximadamente 500 nuevos casos por año, que corresponde a una incidencia de 17,5 casos/100.000 niños menores de 5 años [8] constituyendo la tasa más alta del mundo. Si bien el rango de edad de afectados es entre 6 meses y 5 años de edad, la incidencia máxima se encuentra en niños entre los 6 a 36 meses de edad, sin distinción de sexo [9].

La variación de la incidencia en distintos países y aún en distintas regiones de un mismo país puede estar relacionada con los métodos de procesamiento y los hábitos de consumo de la carne propios de cada región. En Argentina la frecuencia de aparición de SUH es

mayor en las provincias del centro y sur durante los meses cálidos, aunque se registran casos esporádicos durante todo el año [5].

El ganado vacuno es el principal reservorio natural de cepas de EHEC, pero también se encontró en otros animales domésticos como ovejas, cabras, cerdos, perros y gatos [10]. La entrada de la bacteria a la cadena alimentaria se produce en general por la contaminación de la carne vacuna con heces o contenidos del intestino del animal durante el faneamiento. Es decir que el modo más frecuente de transmisión es el consumo de carne mal cocida, particularmente la carne picada representa el mayor riesgo porque al ser picada, la contaminación en la superficie es distribuida al interior. La cocción insuficiente de este alimento lo transforma en el mayor factor de riesgo asociado al SUH. También existen reportes de otras vías de transmisión, producto de la contaminación cruzada con la materia fecal del ganado bovino, que incluyen jugos de frutas no pasteurizados, productos fermentados, lácteos no pasteurizados, vegetales regados con agua contaminada, abastecimientos de aguas (piscinas y lagos) [11] y el contacto persona-persona [12].

1.1.2- Cuadro clínico

Durante un periodo de incubación de 3 a 8 días, los pacientes desarrollan diarrea acuosa seguida por diarrea sanguinolenta y, en la mayoría de los casos, calambres abdominales. Alrededor del 50% de estos pacientes desarrollan náuseas y vómitos y un 30% tiene fiebre. Estos síntomas son seguidos por las alteraciones hematológicas nefrológicas típicas: anemia hemolítica, trombocitopenia e insuficiencia renal. El cuadro clínico es marcado por el aumento de palidez anémica y oliguria o anuria. Además de edema, hipertensión arterial, proteinuria, puede ocurrir hematuria. Otras características son eritrocitos fragmentados, decaimiento agudo de la hemoglobina, aumento masivo de lactato deshidrogenasa (LDH), niveles bajos o indetectables de haptoglobina y trombocitopenia.

Dependiendo del daño renal, se pueden encontrar altos niveles de urea y creatinina en sangre [13]. Si bien el riñón y el tracto gastrointestinal son los órganos más comúnmente afectados en el SUH, otros órganos como el sistema nervioso central (SNC), páncreas y miocardio también podrían resultar afectados [14-16]. La afectación gastrointestinal con colitis severa puede resultar en necrosis transmural con perforación y/o el posterior desarrollo de estenosis de colon [15, 16].

La participación del SNC en el SUH es común y con frecuencia se manifiesta como letargo, irritabilidad y convulsiones y en los casos más graves, como paresia, coma y edema cerebral. El 70% de los pacientes que desarrollan SUH requieren transfusiones de glóbulos rojos, 50% necesita diálisis y el 25% tiene afectación neurológica, incluyendo accidente cerebrovascular, convulsiones y coma [12, 17]. La mortalidad en el SUH es entre 3% y 5% y está casi siempre asociada con afecciones extrarrenales graves, incluyendo afección grave del SNC [15, 18, 19]

1.1.3- Fisiopatología

Luego de la ingesta, la bacteria coloniza el colon y se adhiere a las microvellosidades del enterocito a través de la proteína intimina, un factor de virulencia codificado por el gen *eae* [20]. Paralelamente, la bacteria entra en fase lítica y libera la Stx, que contribuye con el daño epitelial y endotelial local (intestino) y con la inducción de una fuerte respuesta inflamatoria. La acción de la Stx y la hemolisina, otro factor de virulencia, conducen a la síntesis de IL-8 y otras citoquinas proinflamatorias, por los enterocitos, que atraen neutrófilos y macrófagos al sitio de la infección. Estos fenómenos son los responsables de la diarrea sanguinolenta característica de la patología [21]

Stx es el elemento clave en la fisiopatología, luego de su liberación por la bacteria, pasa a la circulación general. Si bien el mecanismo por el cual atraviesa el epitelio intestinal, aún no ha sido completamente elucidado existen varias hipótesis. La más aceptada es que durante la etapa temprana de la infección, Stx utiliza diferentes vías de pasaje entre ellas: la transcitosis independiente de Gb3 estimulada por STEC, el transporte paracelular durante la transmigración de PMN al sitio de infección y el transporte retrógrado vía Gb3

estimulado por STEC. En la etapa tardía de la infección podría atravesar libremente el intestino dañado [22, 23]. Sin embargo, nunca ha sido encontrada toxina libre en la sangre de pacientes con SUH. Esto puede deberse, o bien a que la cantidad de toxina que circula libremente es demasiado baja para ser detectada [23, 24] y/o los receptores celulares tiene alta afinidad por la toxina; o la circulación de la toxina se produce a través de un transportador. Esta última hipótesis propone que la toxina circula unida a su transportador mediante la interacción con un receptor no Gb₃, por el cual tiene menor afinidad, lo que permite la separación de la toxina de su transportador para unirse a su órgano blanco [25]. Aunque, todavía no se ha determinado con certeza cuales son los transportadores, se han propuesto como candidatos a los PMN, [26-29], monocitos [30, 31] y plaquetas [32-34].

Una vez que la toxina alcanza su órgano blanco el riñón, se une a su receptor específico Gb₃ [35] que es expresado fundamentalmente por las células mesangiales y endoteliales glomerulares [36] y por las células epiteliales tubulares renales [37, 38], provocando su muerte por apoptosis. El daño sufrido por el endotelio renal hace que se expongan elementos del subendotelio como el factor tisular (FT) y vWF, implicados en la coagulación y la agregación plaquetaria, respectivamente. Por lo tanto, se produce una trombosis en la microvasculatura, la cual es la entidad anatomopatológica responsable de la tríada clásica del SUH: consumo de plaquetas que da origen a la trombocitopenia, destrucción mecánica de los eritrocitos, que intentan pasar a través del trombo, lo que origina la anemia hemolítica y la obstrucción de la microvasculatura renal, que contribuye a la insuficiencia renal aguda [25, 39].

La trombosis y el daño en los tejidos se ven agravados tanto por la isquemia [40], como por las citoquinas proinflamatorias liberadas por el endotelio lesionado, lo cual produce la atracción de PMN, monocitos y macrófagos activados que a su vez liberan citoquinas (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, etc.). Las citoquinas como TNF- α e IL1- β también pueden aumentar la expresión de Gb₃ en la superficie de las células endoteliales, aumentando la sensibilidad a la toxina [25].

1.2- La toxina Shiga 2 (Stx2)

1.2.1- Estructura

La familia de las toxinas Shiga es un grupo de exotoxinas relacionadas estructural y funcionalmente, que incluye la toxina Shiga producida por *Shigella dysenteriae* serotipo 1 y las Stx producidas por las cepas de EHEC.

Se han identificado dos tipos: Stx1 y Stx2, que a su vez poseen distintas variantes. La familia de Stx1 consiste en Stx1 y Stx1c mientras que Stx2 contiene las variantes Stx2c, Stx2c2, Stx2d, Stx2d activable, Stx2e y Stx2f.

Los genes para estas toxinas están codificados en bacteriófagos lamboides, integrados al genoma bacteriano [41]. Las bacterias pueden expresar más de un tipo de Stx porque pueden contener más de un bacteriófago codificante. Se ha encontrado que las cepas productoras de Stx1, sola o en combinación con Stx2, son menos virulentas que las cepas que producen solo Stx2 [42].

Si bien los dos tipos de Stx son antigénicamente diferentes, ambas son holotoxinas que poseen una conformación AB₅ [43, 44]. Una subunidad A enzimáticamente activa, de 32kDa, se encuentra asociada de forma no covalente a un homopentámero de subunidades B, de 7,7 kDa cada una [45] (**figura A**). El pentámero de subunidades B media la unión a su receptor Gb₃ en la superficie de la célula blanco mientras que la subunidad A tiene actividad N-glicosilasa y actúa removiendo un residuo de adenina específico de la subunidad ribosomal 28s, inhibiendo la síntesis proteica e induciendo la muerte celular [46]. Cabe destacar que la subunidad A esta compuesta de dos fragmentos unidos por un puente disulfuro, el cual es clivado proteolíticamente por enzimas del retículo endoplasmático (RE) y del citosol generando la subunidad A1 responsable de la actividad enzimática y liberando el fragmento menor A2 [47].

En relación a la actividad *in vivo* de las distintas variantes de Stx, se ha demostrado en estudios en ratones que la dosis letal 50 (DL50) de la Stx2 es 400 veces menor que para la Stx1 [48]. La Stx2 es más estable que la Stx1, aunque la Stx1 posee 10 veces más afinidad

por el Gb₃ que la Stx2. Sin embargo, la capacidad de inhibir la síntesis de proteínas de ambas toxinas es equivalente [48].

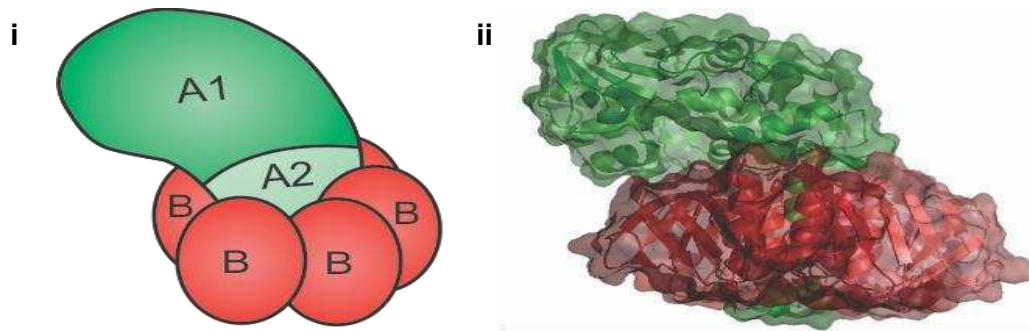


Figura A. Estructura de la toxina Shiga. i. Esquema representativo de Stx, formado por la subunidad A (StxA), la cual se cliva en los fragmentos A1 y A2 y las cinco subunidades B que constituyen el homopentámero de unión al receptor (StxB). ii. Diagrama de cintas de Stx. En verde se observa StxA y en rojo el pentámero StxB.

1.2.2- Receptores

El pentámero de subunidades B de Stx contiene sitios de unión a glicosfingolípidos, presentes en la superficie de las células blanco, por lo tanto estas estructuras son las que median la entrada a las células, de la subunidad A, con actividad catalítica. Los glicosfingolípidos son moléculas anfipáticas compuestas de una cadena de carbohidratos hidrofílica y una porción de ceramida hidrofóbica, formada por una esfingosina unida por un puente amino a un ácido graso cuya longitud puede variar de 16 a 24 carbonos [49]. Todas las variantes se unen preferencialmente al glicosfingolípido Gb₃, donde el trisacárido terminal α -gal (1 \rightarrow 4) - β -gal (1 \rightarrow 4) - β -glc, proporciona la especificidad (**figura B**). La excepción a esto es Stx2e, que se une preferentemente a globotetraosilceramida (Gb₄) [50, 51].

En humanos, el receptor Gb₃ es expresado sobre el epitelio renal de túbulo distales, células glomerulares mesangiales y en las células endoteliales de la microvasculatura del

riñón [35], el intestino [52] y el cerebro [53]. De todas formas, la sensibilidad a Stx no siempre se correlaciona con la cantidad de receptores presentes en el órgano blanco. Esto se debe a que la composición de glicolípidos presente en los receptores también regula la unión de la toxina y su internalización y por lo tanto el grado de citotoxicidad [54].

El reconocimiento y unión de Stx a su receptor Gb₃ dependen no solo de la presencia del mismo en el tejido blanco, sino también de su composición lipídica. Es decir que la forma de presentación del glicolípidos tendrá influencia sobre la capacidad de la toxina para reconocer la estructura del receptor. Por ejemplo, cuando la composición de ácidos grasos es heterogénea, la unión de la toxina al Gb₃ es mejor que cuando es homogénea.

Por otra parte, la longitud de la cadena de carbonos de los ácidos grasos, así como el grado de saturación, también afecta la unión a la toxina: Stx1 se une en forma óptima a Gb₃ conformados por ácidos grasos de 20-22 carbonos, mientras que Stx2c se une mejor a receptores que posean cadenas de 18 átomos de carbono en sus ácidos grasos [55, 56]. Para ambos subtipos de toxina la unión al receptor mejora cuando los ácidos grasos son insaturados. Esta característica estructural podría explicar las variaciones que se observan *in vivo* en la especificidad de unión o susceptibilidad de la toxina a los diversos tejidos o tipos celulares [57].

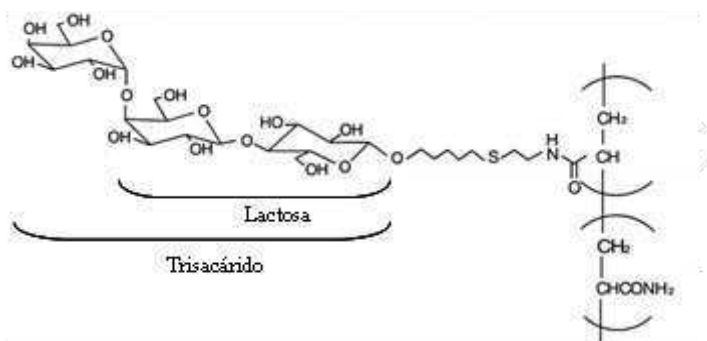


Figura B. Estructura del receptor Gb₃ y de los trisacáridos terminales necesarios para la unión de Stx

1.2.3- Transporte retrógrado y mecanismo de toxicidad

Las Stx entran a las células por la membrana apical pero deben acceder al citoplasma para ejercer sus efectos en la síntesis proteica. Estas toxinas se mueven de forma retrógrada a través de la maquinaria celular que transporta proteínas desde los ribosomas a la membrana apical de la célula y entonces inhiben la síntesis proteica al nivel de los ribosomas.

Se ha demostrado que Stx puede entrar a la célula por endocitosis dependiente de clatrina [58]. Sin embargo, cuando esta vía es inhibida la toxina aun es absorbida eficientemente, indicando que la vía de clatrina no es necesaria para los pasos iniciales de la entrada de la toxina a la célula. Si bien la clatrina no está involucrada en esta etapa, es requerida para el escape de la toxina Shiga de los endosomas tempranos [59-61].

Algunos tipos celulares que expresan Gb₃ son insensibles a la citotoxicidad de Stx. Esto se debe a que los endosomas tempranos, que contienen la toxina, se fusionan con los lisosomas y esta es degradada por su contenido [62]. En células sensibles a Stx, la toxina entra por endosomas y mediante transporte retrógrado es llevada a la red del trans-golgi, al RE y a la envoltura nuclear. Durante las primeras etapas del proceso de entrada, en los endosomas, la subunidad A es clivada en los fragmentos A1 y A2 (que permanece unido a StxB) por la endoproteasa furina [47]. Sin embargo, el fragmento A1 permanece unido al complejo A2-StxB a través de un puente disulfuro [47, 63, 64]. Este puente es finalmente reducido en el lumen del RE, liberando el fragmento enzimático A1 el cual es subsecuentemente transportado al citosol. El fragmento A1 libre es el que posee la actividad N-glicosilasa que actúa sobre los ribosomas, inhibiendo la síntesis proteica y conduciendo a la muerte celular.

1.3- Hemostasia y función plaquetaria

La hemostasia es el proceso que mantiene la integridad del sistema circulatorio después de sufrir un daño vascular. Se trata de un proceso dinámico y fuertemente regulado. Bajo circunstancias normales, una lesión en la pared del vaso rápidamente inicia una serie de

eventos coordinados, diseñados para sellar la brecha generada por la injuria. Estos acontecimientos conducen a la formación del coágulo y ambos requieren el reclutamiento y activación de plaquetas, así como la generación de trombina y fibrina [65].

Las plaquetas son células incompletas, formadas a partir de megacariocitos en la médula ósea [66]. Su estructura es compleja, de forma discoide y delimitada por una membrana plasmática ampliamente invaginada, formando un sistema canalicular. Esta membrana contiene numerosas glicoproteínas (GP), que actúan como moléculas de adhesión y juegan un papel importante en la función plaquetaria. Intracelularmente, la plaqueta contiene numerosos microfilamentos, un sistema tubular denso y dos tipos de gránulos: α -gránulos, que contienen fibrinógeno, vWF, factor plaquetario 4 (PF4) y factor de crecimiento de plaquetas (PGF); gránulos densos, que contienen ciertos nucleótidos de adenosina como la adenosina difosfato (ADP) y serotonina (5-HT) [67, 68].

En condiciones normales, las plaquetas no se adhieren al endotelio que reviste los vasos sanguíneos. Sin embargo, cuando la vasculatura se daña, se expone a la sangre el subendotelio que contiene colágeno y microfibrillas.

La glicoproteína (GP) Ib-IX-V y GPVI, dos moléculas de adhesión, son las principales responsables de regular la adhesión inicial de las plaquetas y la activación, al unirse al vWF y colágeno, respectivamente [69-72]. A raíz de esta adhesión, las plaquetas se activan, cambian de forma, convirtiéndose en más esféricas y envían pseudópodos que mejoran la interacción intraplaquetaria [73]. Además, mediante un mecanismo de transducción de señales se produce el ensamblado de integrinas en la membrana, que median la adhesión y agregación. La más importante es la GPIIb/IIIa que se une a vWF o fibrinógeno, facilitando la agregación plaquetaria, ya que este último forma un puente entre las plaquetas adyacentes [69, 74].

En la activación, las plaquetas también liberan el contenido de sus gránulos. La 5-HT que es liberada actúa como un potente vasoconstrictor. Además, se expone un fosfolípido de la membrana, el factor plaquetario 3 (PF3) y se libera ácido araquidónico de los fosfolípidos, el cual es convertido por una ciclooxigenasa a tromboxano A₂ (TxA₂) dentro de las plaquetas y contribuye a la vasoconstricción localizada [68]. Además, TxA₂ junto

con el ADP liberado de los gránulos densos promueve aún más la activación de las plaquetas, la agregación y la degranulación [67]. De esta manera, se construye rápidamente un agregado de plaquetas que taponan el vaso sanguíneo dañado. La propagación del tapón plaquetario hacia sitios lejanos al sitio de la lesión, es impedido por la producción de Prostaglandina I₂ (PGI₂), que es un potente inhibidor de la agregación plaquetaria y es liberado, por el endotelio normal en las zonas adyacentes [75, 76].

1.3.1- Concepto clásico de la coagulación:

El tapón plaquetario proporciona un sitio en torno al cual, se forma un tapón hemostático más definitivo. La reacción fundamental, en la formación del coagulo definitivo, es la conversión del fibrinógeno soluble en fibrina insoluble, por acción de la trombina. Esta actúa separando dos cadenas polipeptídicas de la molécula de fibrinógeno, para formar un monómero de fibrina, que se polimeriza para constituir una malla. Inicialmente, las hebras, que forman la malla, se mantienen unidas débilmente por enlaces de hidrógeno, pero la activación del factor XIII por la trombina, conduce a la formación de puentes cruzados covalentes, entre las cadenas de fibrina, fortaleciendo la unión y estabilizando la malla [77].

La conversión de la protrombina, precursor inactivo, a trombina, implica la acción de una serie de serin-proteasas plasmáticas, denominadas factores de coagulación, que circulan en forma de proenzima inactiva, conocidas como zimógenos, volviéndose activas en una secuencia en cascada [78].

La cascada de coagulación, tradicionalmente ha sido clasificada en vías intrínseca y extrínseca, que convergen en la activación del factor X (**figura C**).

Vía extrínseca

Se considera como el primer paso en la hemostasia mediada por plasma. Se activa por el FT, también conocido como factor III [79].

FT es una glicoproteína de membrana, con acción procoagulante, presente en el tejido subendotelial y fibroblastos. Se localiza predominantemente en la túnica media y la

túnica adventicia de los vasos sanguíneos y una pequeña cantidad se encuentra circulante en la membrana de los monocitos [80-82]. En condiciones fisiológicas normales, el endotelio vascular minimiza el contacto entre FT y los factores de coagulación plasmáticos, pero la injuria vascular hace que se exponga y se una con el factor VII y calcio para promover la activación del factor X [78, 81, 83].

Vía intrínseca

Se desencadena cuando la sangre entra en contacto con una superficie extraña, es decir, diferente al endotelio vascular.

En el caso de una lesión vascular, la membrana basal del endotelio o las fibras colágenas del tejido conectivo, proporcionan el punto de iniciación.

Comienza con el factor XII, quininógeno de alto peso molecular (HMWK) y precalicreína, que resulta en la activación del factor XI. El factor XI activado, activa luego al factor IX, que interactúa con su cofactor, el factor VIII, para formar el complejo tenasa sobre una superficie de fosfolípidos, que finalmente activan al factor X [84, 85].

Vía común

El Factor X activado, junto con su cofactor, el factor V, fosfolípidos del tejido, fosfolípidos de las plaquetas y calcio, forman, el llamado complejo protrombinasa, que convierte la protrombina en trombina. La trombina escinde al fibrinógeno circulante en fibrina insoluble y activa al factor XIII, que une covalentemente los polímeros de fibrina incorporados en el tapón plaquetario. Esto crea una red de fibrina que estabiliza el coágulo y forma el tapón hemostático secundario definitivo [84, 85].

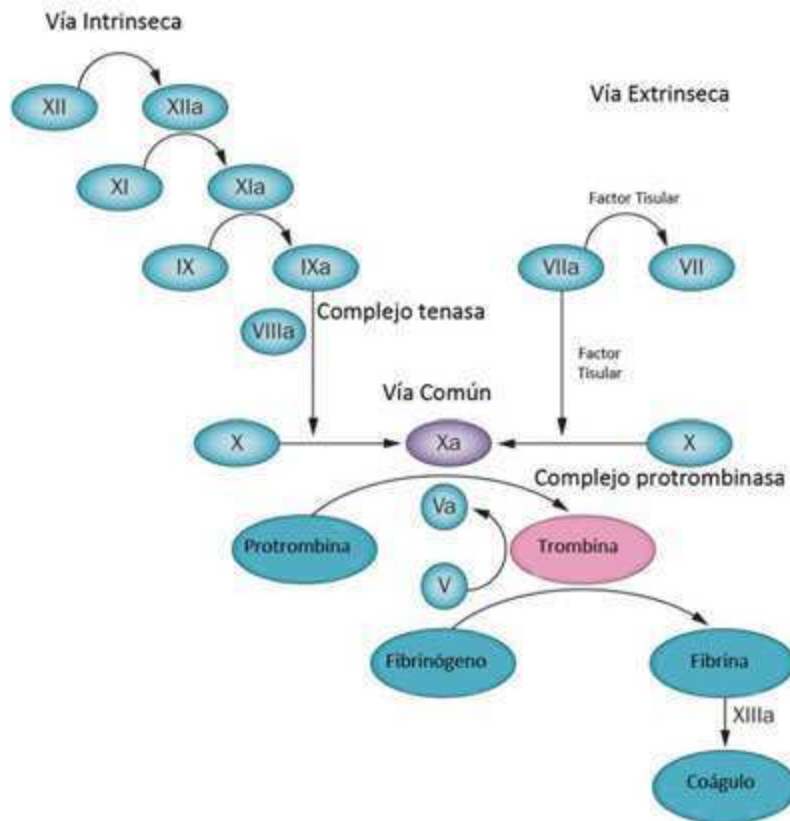


Figura C. Esquema que representa el concepto clásico de la cascada de coagulación (adaptado de Sabir, I. et al, 2014 [86])

1.3.2- Concepto actual de la coagulación

La evidencia actual apoya el concepto de que la vía intrínseca no es un camino paralelo para la activación de trombina, sino que es un proceso de amplificación, en el cual, aumenta la generación de trombina iniciada principalmente por la vía extrínseca [87]. Un modelo reciente, describe la coagulación con los pasos siguientes:

Iniciación

Se produce mediante la expresión del FT en la superficie vascular dañada, que se une al factor VII, para activar al factor IX y al factor X. Esta activación del factor IX por el

complejo FT-VII sirve como puente entre las vías extrínseca e intrínseca clásicas. El factor X activado a continuación, se une a la protrombina para formar trombina. Sin embargo, la generación de trombina a través de esta reacción no es robusta y se puede terminar efectivamente por inhibidores de la vía del FT.

Amplificación

Como la cantidad de trombina generada no es suficiente, existen varios ciclos de retroalimentación positiva para que la trombina logre unirse a las plaquetas. La trombina generada en la fase de iniciación, es capaz de activar al factor V, que sirve como cofactor en el complejo protrombinasa y al factor VIII, cofactor del complejo tenasa, acelerando la activación del factor X.

Propagación

Los complejos enzimáticos acumulados en la superficie de las plaquetas (complejo tenasa y protrombinasa) aseguran una generación continua de trombina y posteriormente la producción de fibrina, para formar un coágulo suficientemente grande y estable.

Estabilización

La generación de trombina conduce a la activación del factor XIII (factor estabilizador de fibrina) que une covalentemente polímeros de fibrina y proporciona fuerza y estabilidad a la malla incorporada al tapón plaquetario. Además, la trombina activa al inhibidor de fibrinólisis activable por trombina (TAFI), que protege al coágulo de la fibrinólisis [79, 88].

1.3.3- Participación de la respuesta trombótica en el SUH

El daño endotelial juega un papel central en la secuencia de eventos que conducen al proceso microangiopático en el SUH [89]. Si bien es una enfermedad sistémica, las células endoteliales glomerulares son el blanco principal de los efectos tóxicos de Stx, que luego de la unión al receptor Gb₃, desencadena una cascada de eventos de señalización

que contribuyen al desarrollo de la disfunción vascular, al reclutamiento de leucocitos y plaquetas, a la formación de trombos y a la deposición de fibrina.

Las lesiones endoteliales se localizan mayoritariamente en la microvasculatura renal, ya que su expresión de Gb₃ es 50 veces más alta que la del endotelio perteneciente a los grandes vasos y por lo tanto tienen mayor sensibilidad a los efectos tóxicos de Stx [90].

Durante la fase aguda de la enfermedad, las plaquetas circulantes han sido degranuladas [91], en consecuencia presentan un bajo contenido de β trombomodulina (β TM) intracelular [92] y una menor capacidad de agregación [93]. El plasma de pacientes con SUH es capaz de inducir la agregación de plaquetas normales [94] y además, presenta elevados niveles de β TM, PF4 [93] y P-selectina [95], lo que refleja que las plaquetas sufrieron un proceso de activación. Existen estudios que han explorado una posible interacción entre Stx y plaquetas humanas. En principio se ha determinado que la toxina se une a un glicolípido denominado banda 0,03 en plaquetas [34]. También existe un informe que muestra que filtrados de cultivos de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (STEC) inducen la agregación de plaquetas [96], seguido por datos que indicaban que Stx1 y 2 purificadas no eran capaces de inducir tal efecto [97, 98]. Sin embargo, otros estudios documentaron que existe una unión directa de Stx1 a las plaquetas, lo que deriva en la activación plaquetaria [33, 99].

El estado protrombótico en el SUH ha sido principalmente atribuido al daño endotelial. Se ha reportado que Stx induce la liberación de vWF y la expresión de FT por células endoteliales humanas, conduciendo a la generación de trombina y a la agregación plaquetaria [100-102]. Otros estudios muestran que en presencia de Stx, se forman trombos sobre células endoteliales microvasculares humanas y que el proceso involucra vWF, P-selectina y la molécula de adhesión de plaqueta a células endoteliales 1 (PECAM-1) [103]. Además, la estimulación de células endoteliales de microvasculatura renal con Stx, resulta también en un efecto antifibrinolítico [104]. Además se halló que Stx inhibe la producción de PGI₂ [105] e incrementa la liberación de TxA₂ por células endoteliales [106], favoreciendo la agregación plaquetaria.

Teniendo en cuenta estos hallazgos, se propone que la injuria endotelial causada por Stx, hace que se expongan elementos del subendotelio capaces de adherir plaquetas. Además, el endotelio activado pierde su fenotipo tromborresistente normal, lo que desencadena la expresión de moléculas de adhesión como PECAM-1 y P-Selectina [103] y la liberación de ciertos factores que inducen la activación y la adhesión de plaquetas [107], culminando en la formación de trombos que puede ocluir la microcirculación de diversos órganos, fundamentalmente del riñón.

1.3.4- Trombocitopenia

La trombocitopenia es una de las características principales del SUH y se debe a que las plaquetas activadas son agregadas en pequeños trombos, los cuales pueden comprometer el suministro de sangre a varios órganos, particularmente el riñón. La trombocitopenia ha sido relacionada con una pobre recuperación de la función renal [108, 109], además una prolongada duración de la misma fue vinculada a un incremento en el riesgo de sufrir secuelas renales tales como, reducida tasa de filtración glomerular, hematuria, proteinuria e hipertensión [110].

1.4- Participación de la respuesta inflamatoria en el SUH

Durante el SUH se producen extensas lesiones tisulares, que generan una respuesta inflamatoria a través de la activación de leucocitos y la producción de citoquinas.

Existe considerable evidencia de que los PMN y monocitos desempeñan un papel activo en la patogénesis del SUH y que su interacción con las células endoteliales activadas amplifica la lesión microvascular en el riñón. El SUH ha sido frecuentemente asociado con leucocitosis [111-113], cuyo grado en el inicio de la enfermedad se correlaciona con la severidad y el pronóstico [114, 115]. Además, el aumento en los recuentos de neutrófilos circulantes [116, 117] y macrófagos [117] se asocian con la gravedad de la insuficiencia renal. Por otra parte, biopsias renales de niños con SUH mostraron la presencia de leucocitos mononucleares y PMN dentro de los glomérulos, a lo largo de la zona de lesión microvascular [118, 119]. En esos pacientes, también se detectaron altos niveles urinarios

de IL-8 y MCP-1, dos factores quimiotácticos para PMN y monocitos/macrófagos, además, un estudio realizado *in vitro* muestra que Stx2 estimula su producción en células endoteliales glomerulares [120], implicando el papel de estas quimioquinas en la acumulación de células inflamatorias a nivel glomerular [119, 121].

Los PMN son esenciales para la defensa contra las infecciones microbianas, pero también pueden estar asociados con efectos secundarios de destrucción tisular y especialmente con daño a las células endoteliales [122, 123]. La contribución de los PMN a la patogénesis del SUH ha sido sugerida por varias evidencias. Estudios en ratones inyectados con Stx, indicaron una aceleración en el arribo de leucocitos a la circulación periférica y una migración reducida a los tejidos [124]. También, se demostró una correlación positiva entre el porcentaje de neutrofilia y el daño renal [125] y ratones depletados de PMN presentaron una sensibilidad reducida a la toxicidad renal y efectos letales dependientes de Stx2 [124]. Además, se han registrado niveles elevados de elastasa en plasma de niños con SUH [126] [127, 128]. Esto es indicador de activación y degranulación de PMN ya que la elastasa es la principal proteína lisosomal liberada por los PMN activados [114, 129]. Otros factores indicadores de activación tales como, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) [130] e IL-8 [127] también fueron detectados elevados. Por otro lado, se vio que los PMN de pacientes con SUH presentan una reducción en el contenido de sus gránulos [126, 131] y alteraciones en la expresión de sus marcadores de superficie como pérdida de CD16, (receptor de Fc para inmunoglobulinas tipo III) y CD11b (molécula de adhesión) [131]. También presentan alteraciones funcionales como mayor capacidad de adhesión a endotelio [132], menor capacidad de degranularse en respuesta a citoquinas y también menor generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) [133]. Esto demuestra que los PMN están parcialmente desactivados durante el periodo agudo de la enfermedad, sugiriendo que la activación se produjo durante el lapso de tiempo que transcurre entre la diarrea sanguinolenta y los primeros signos de SUH.

Además se ha propuesto que los PMN podrían funcionar como transportadores de la Stx, transportándola desde el intestino, donde se alojan las bacterias STEC, hasta el riñón. En

línea con esto, ciertos estudios han demostrado que la Stx puede unirse directamente al PMN y activarlo induciendo su degranulación [134].

Los monocitos constituyen en circulación periférica una población minoritaria (4-8% de los leucocitos totales) y tienen la capacidad de migrar a los tejidos, en respuesta a ciertos estímulos, donde se diferencian a macrófagos. Constituyen una población celular importante en la respuesta inmune innata, caracterizada por su alta capacidad de fagocitar a los antígenos que penetran en los tejidos y la producción de citoquinas, con el consiguiente reclutamiento y activación de otras células de la inmunidad innata y adaptativa.

Los monocitos pueden jugar un papel central en la patogénesis del SUH. Esto fue evidenciado en un estudio en ratones donde la depleción de los macrófagos hepáticos o esplénicos, mediante el uso de clodronato, causaba una reducción en la citotoxicidad de Stx2 [135]. En los pacientes se ha observado un aumento en el número absoluto de monocitos circulantes, acompañado de alteraciones fenotípicas y funcionales. Entre las alteraciones fenotípicas se observó una disminución en la expresión de CD14 (mediador de la respuesta al lipopolisacárido (LPS)), de CD64 (involucrado en la fagocitosis) y de CD11b (receptor para moléculas de adhesión). Entre las alteraciones funcionales se vió una reducida capacidad de producción de TNF- α en respuesta a la incubación con LPS y una menor citotoxicidad dependiente de Fc gamma [136]. Durante el periodo agudo, los monocitos circulantes también presentan alteraciones en el perfil de expresión de los receptores de quimioquinas como CX3CR1 [22], CCR1, CCR2 y CCR5 [137], acompañado de un mayor nivel de los factores responsables del reclutamiento de monocitos hacia el sitio target, tales como G-CSF, MIP-1 β y MCP-1 [138]. Además, Stx es capaz de unirse a monocitos humanos a través de un subtipo diferente de Gb₃, lo que conduce a la secreción de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 [31]. Estos estudios muestran que Stx, además de ser tóxica para las células humanas, es capaz de desencadenar la producción y liberación de citoquinas. Es importante destacar que, las células endoteliales glomerulares aumentan la expresión de Gb₃ en respuesta a ciertas citoquinas inflamatorias como TNF- α [139]. Por lo tanto, las citoquinas producidas localmente por monocitos estimulados con Stx, pueden

amplificar los procesos inflamatorios fundamentales para el daño de las células endoteliales de la microvasculatura renal y la activación de otros leucocitos.

En conjunto, estas células podrían participar del daño endotelial mediante la producción de citoquinas inflamatorias, el transporte de la Stx y la acción citotóxica directa sobre el endotelio (**figura D**).

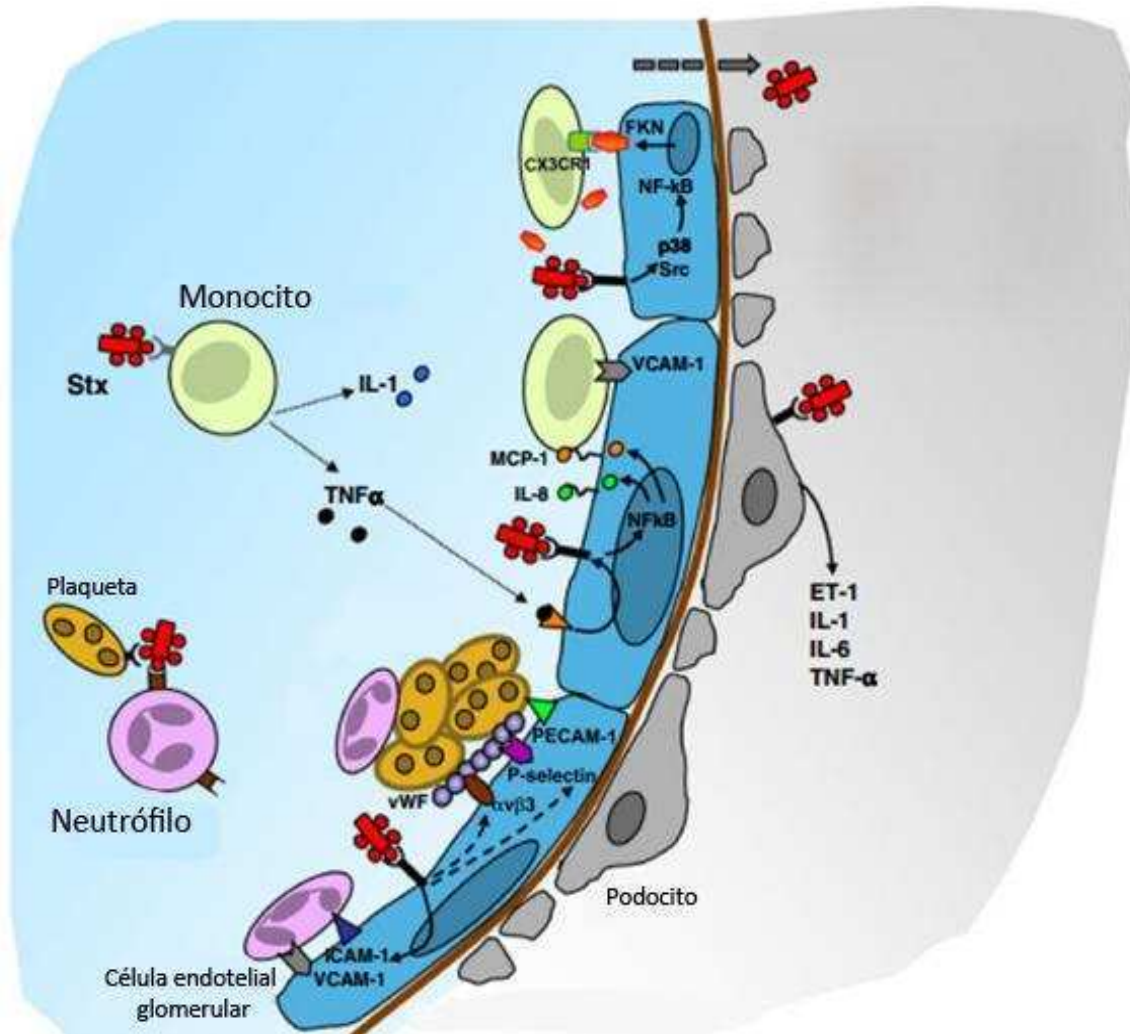


Figura D. Esquema de la participación de las respuestas trombótica e inflamatoria en el desarrollo del SUH (adaptado de Zoja, C. et al, 2010 [140])

1.5- Interacción entre Respuesta trombótica e inflamatoria

La inflamación conduce a un desequilibrio entre las propiedades procoagulantes y anticoagulantes del endotelio que puede conducir a una estimulación local de la cascada de la coagulación. Las citoquinas proinflamatorias, IL-1, IL-6, MCP-1 y TNF- α , pueden estar implicadas en la ruptura de este equilibrio [141-143]. Durante la progresión de la respuesta inflamatoria el equilibrio se desplaza hacia el estado procoagulante, por la capacidad de estas moléculas para disminuir la expresión de proteínas antitrombóticas como la trombosmodulina y la proteína C y aumentar la expresión de proteínas protrombóticas. La más importante de ellas es el FT, expresado en el endotelio y monocitos, que actúa para regular el estado de activación de la vía extrínseca de la coagulación, estimulando la producción de trombina y la formación de fibrina. Varias de las citoquinas inflamatorias responsables del estado procoagulante, se encuentran incrementadas en plasma [121, 127, 130, 144-150] y orina [121, 144, 147, 149, 151, 152] de niños con SUH.

Además, los gránulos α de las plaquetas contienen varias quimioquinas capaces de mediar procesos inflamatorios. Por ejemplo PF4, IL-8, RANTES y β -TG, son capaces de reclutar y activar leucocitos [153-157].

Los procesos de trombosis e inflamación vascular suelen ir acompañados de la formación de complejos plaquetas-leucocitos [158, 159]. Luego de la activación de plaquetas, la P-selectina se expresa en la superficie, permitiendo la unión a su ligando PSGL-1, expresado constitutivamente en leucocitos. Esta unión media la formación de complejos en la circulación y sobre las superficies vasculares dañadas, en las que se han depositado previamente plaquetas y fibrina [160]. Además, estudios *in vivo* e *in vitro* demostraron que la unión de P-selectina a PGSL-1 potencia la generación de micropartículas derivadas de leucocitos, conteniendo FT en membrana [161].

Por otro lado la unión de las plaquetas a monocitos y neutrófilos resulta en la expresión de la integrina CD11b/CD18 en estos leucocitos, que permite además la formación de nuevos complejos a través de la interacción con el receptor GPIIb en plaquetas [162] y alternativamente, con el fibrinógeno unido al receptor GPIIb/IIIa expresado en plaquetas

activadas [163]. La presencia de estos conjugados en la microcirculación juega un papel importante en la iniciación de la trombogénesis y la inflamación [164]. Los leucocitos pueden rodar sobre las plaquetas activadas permitiendo la unión y la migración a los tejidos inflamatorios, además la interacción entre plaquetas y leucocitos es importante para su activación ya que induce en los leucocitos la producción de citoquinas proinflamatorias perfilándolos hacia un fenotipo inflamatorio [165-167] y particularmente en los PMN aumenta su capacidad fagocítica y el estallido respiratorio [168].

Estos complejos podrían cumplir un rol en la patogénesis del SUH, ya que se ha demostrado que Stx2 junto con el LPS, son capaces de inducir la formación de los mismos, que a su vez expresan FT y liberan macropartículas que contienen FT en superficie [99]. Estos hallazgos fueron confirmados en sangre entera de pacientes con SUH [169] y sugieren que los complejos plaquetas-leucocitos y las macropartículas derivadas de estos, podrían contribuir al estado protrombótico. Asimismo, dada la importancia de los complejos en la activación y reclutamiento de leucocitos a los tejidos inflamados, podrían contribuir al daño tisular que ocurre en el SUH.

1.5.1- CD40L soluble (sCD40L)

CD40L es una glicoproteína transmembrana de 39 kD, perteneciente a la familia de factor de necrosis tumoral α (TNF- α). Es expresado por linfocitos, células endoteliales, células musculares lisas, macrófagos y plaquetas activadas [170]. Las plaquetas contienen CD40L almacenado en los gránulos alfa, el cual es translocado a la membrana una vez que esta se activa [170], luego es clivado y circula en forma soluble (sCD40L) [171], siendo capaz de activar a su receptor CD40 [172]. Se estima que más del 95% de sCD40L presente en circulación proviene de plaquetas. Su receptor, CD40 se encuentra presente en una variedad de células, entre ellas, células endoteliales, plaquetas, monocitos y macrófagos. Una vez que sCD40L interactúa con su receptor, se disparan una serie de mecanismos que podrían contribuir a la patogénesis del SUH.

sCD40L es capaz de desencadenar una respuesta procoagulante a través de diversos mecanismos:

1.5.1.1- Activación de plaquetas vía CD40 y Glicoproteína IIb/IIIa:

sCD40L es capaz de activar plaquetas a través de su receptor CD40 presente constitutivamente en la membrana plaquetaria [173] o mediante un mecanismo alternativo, a través de dominios KGD, puede actuar como ligando de la (GPIIb/IIIa) y comportarse como un agonista plaquetario que contribuye a la estabilidad del trombo [174].

1.5.1.2- Producción de ROS:

Las plaquetas, monocitos y PMN podrían interactuar entre sí a través de la unión de CD40L, a su receptor CD40 y amplificar los procesos inflamatorios y trombóticos a través de la producción de ROS. En efecto, se ha descrito que sCD40L es capaz de inducir la producción de ROS en PMN [175] y plaquetas [176], a través de la activación de Akt y p38 MAPK, causando una posterior activación plaquetaria y una liberación adicional de sCD40L. Paralelamente, hay evidencias de que sCD40L tiene un efecto prooxidante, ya que induce la producción de ROS en células endoteliales y una concomitante reducción de los niveles de óxido nítrico, causando una disfunción endotelial al inhibir el proceso de reendotelización [177, 178].

1.5.1.3 Expresión de FT por células endoteliales y monocitos:

La interacción de CD40L con su receptor CD40, induce la expresión de FT en células del músculo liso, células endoteliales y monocitos [179]. Como hemos mencionado previamente, el FT actúa como receptor para el factor VII de la coagulación y el complejo FT-VII, es considerado como el más importante iniciador de la cascada de coagulación. El FT no está expresado normalmente en células endoteliales ni monocitos, pero puede ser sintetizado en respuesta a varias moléculas inflamatorias. La anormal expresión de FT por estas células es responsable de la trombosis observada en varias enfermedades inflamatorias. Estudios previos han demostrado que el estrés oxidativo juega un rol importante en la expresión monocítica de FT, por promover la activación del factor de

transcripción NF-kappa-B [180]. Este factor de transcripción es uno de los responsables de la expresión, dependiente de CD40L, del gen que codifica para FT [181]. También antioxidantes como la NAC o inhibidores de la NADPH-oxidasa son capaces de revertir dicha expresión [182, 183].

En conjunto, estos procesos pueden dar lugar a un ciclo de retroalimentación positiva, iniciado por plaquetas activadas y mediado por la liberación de sCD40L, que podría amplificar la respuesta trombótica e inflamatoria a través de la producción de ROS.

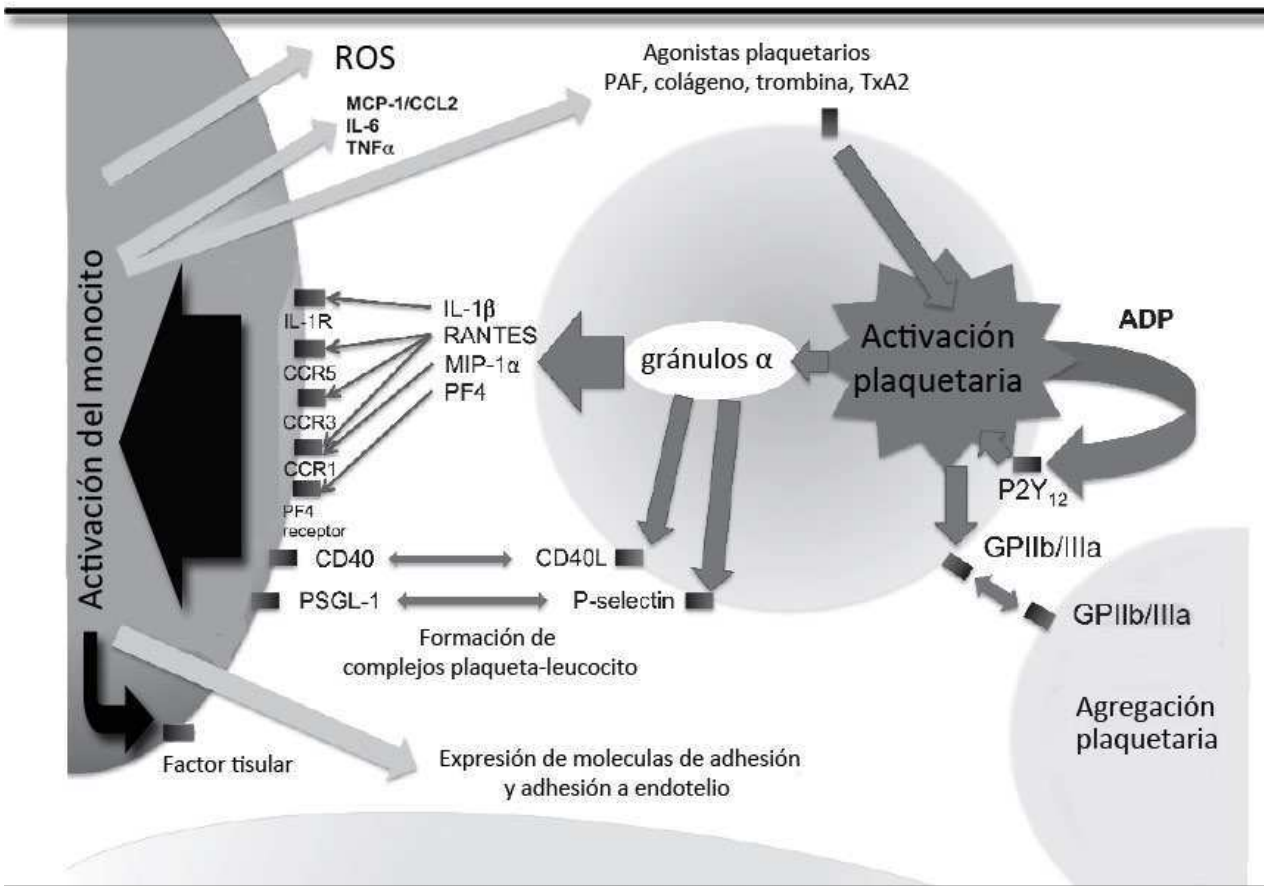


Figura E. Esquema de la interacción de la respuesta plaquetaria con la respuesta inflamatoria (adaptado de Thomas, M.R. et al, 2015 [184])

1.5.2- El Sistema de Complemento

El Sistema de complemento es parte del Sistema inmune innato y consiste en un gran número de proteínas plasmáticas distintas que reaccionan entre sí para opsonizar patógenos e inducir una serie de respuestas inflamatorias que ayudan a combatir una infección. Este sistema se activa a través de una cascada de enzimas proteolíticas denominadas zimógenos, en la cual una enzima activa generada por el clivaje de su zimógeno precursor escinde su sustrato, otro zimógeno, a su forma activa enzimática. Este, a su vez escinde y activa el siguiente zimógeno en la vía del complemento. Algunas proteínas del complemento son proteasas que se activan a sí mismas autoclivándose.

Existen tres vías distintas a través de las cuales el sistema de complemento se puede activar, la vía clásica, la vía de las lectinas y la vía alternativa. Estas vías dependen de diferentes moléculas para su iniciación, pero convergen para generar el mismo conjunto de moléculas efectoras. Hay tres maneras en que el sistema del complemento protege contra la infección. En primer lugar, genera un gran número de proteínas activadas que se unen covalentemente a los patógenos, opsonizándolos para que sean fagocitados. En segundo lugar, los pequeños fragmentos de algunas proteínas del complemento actúan como quimioattractantes para reclutar más fagocitos al sitio de activación del complemento y también para activarlos. En tercer lugar, los componentes terminales del complemento producen la lisis de ciertas bacterias mediante la formación de poros en la membrana bacteriana.

En las primeras fases de una infección, la cascada del complemento se puede activar a través de una, o más, de las tres vías mencionadas. La vía clásica puede ser iniciada por la unión de C1q, la primera proteína en la cascada del complemento, directamente a la superficie del patógeno. También se puede activar durante una respuesta inmune adaptativa por la unión de C1q a un complejo anticuerpo-antígeno y es así un vínculo clave entre los mecanismos efectoras de la inmunidad innata y adaptativa. La vía de las lectinas es iniciada por la unión de una proteína plasmática de unión a manosa denominada lectina, a los carbohidratos de bacterias o virus que contienen residuos manosa. Finalmente, la vía alternativa se puede iniciar cuando un componente del

complemento se activa de forma espontánea y se une a una superficie protectora de los mecanismos de inhibición. Cada vía sigue una secuencia de reacciones que genera una proteasa llamada C3 convertasa. Estas reacciones se conocen como los eventos de activación temprana del complemento. Luego la C3 convertasa formada se une covalentemente a la superficie del patógeno. Aquí se escinde C3 para generar grandes cantidades de C3b, la molécula efectora principal del sistema del complemento y C3a, un mediador peptídico de la inflamación. Las moléculas de C3b actúan como opsoninas y también se une a la C3 convertasa para formar la C5 convertasa, que cliva a la proteína C5 y produce el más importante mediador de la inflamación con propiedades quimioattractantes, C5a, así como un gran fragmento activo, C5b, que inicia los eventos tardíos de la activación del complemento. Estos comprenden una secuencia de reacciones de polimerización en el que los componentes terminales del complemento, C6, C7, C8 y C9 interactúan para formar el complejo de ataque de membrana, el complejo C5b-9, que crea un poro en las membranas celulares de algunos patógenos que pueden conducir a la muerte [185].

1.5.2.1- El Sistema de complemento en el SUH típico

La activación del complemento sobre las células propias es controlada por un conjunto de proteínas reguladoras que pueden ser de membrana, como la proteína cofactor de membrana CD46 y la trombomodulina; o solubles, como el FH del complemento. Estas proteínas reguladoras actúan por varios mecanismos: favorecen la escisión de C3b a C3b inactivo (iC3b) por el factor del complemento I (FI), provocan la disociación de C3-convertasa y C5 convertasa o previenen el ensamble de C9 en el complejo C5b-9, que luego formaría el poro [186].

La activación exacerbada del complemento puede, sin embargo, superar la protección de los reguladores del complemento y resultar en una perturbación endotelial, en el reclutamiento de leucocitos y activación de plaquetas, que son todos los eventos que contribuyen al daño tisular y a la formación de trombos. Esta situación se encuentra en

condiciones patológicas agudas, como sepsis, isquemia o en enfermedades crónicas autoinmunes o inflamatorias [187].

Si bien el sistema de complemento tiene amplia relevancia en el SUH atípico, debido a que se produce como consecuencia de alteraciones en los genes de algunos componentes del complemento [188], en el SUH típico su rol está siendo investigado.

Existen estudios antiguos, en los que se encontraron bajos niveles séricos de C3 [189-191] y un aumento en los niveles de los productos de degradación de los dos componentes de la C3 convertasa de la vía alterna, C3 (C3b, C3c, C3d) y un fragmento del factor B (FBa) [192], en niños con sospecha de haber tenido SUH.

Estudios recientes han confirmado la disminución de C3 plasmático en los casos más graves de SUH [193, 194] y el aumento de los niveles plasmáticos de otro fragmento del factor B (FBb) y de la forma soluble del complejo terminal del complemento (sC5b-9), en 17 niños con SUH durante la fase aguda [195]. Todos estos parámetros se normalizaron rápidamente después de la resolución del episodio agudo [195]. Resultados similares se obtuvieron en un grupo sueco de 10 niños, los cuales mostraron los niveles plasmáticos elevados de C3a y sC5b-9 (en el inicio de la enfermedad y la normalización durante la recuperación [169]. Estos hallazgos apuntan a la activación de la vía alternativa del complemento en el SUH.

Estudios *in vitro* también han demostrado que Stx podría contribuir directamente a la activación del complemento por inducir la deposición de C3 en líneas de células endoteliales microvasculares, este proceso dependía de la expresión en membrana de la P-selectina, que se ha demostrado que se une a C3b con alta afinidad [196, 197], iniciando así la vía alternativa. Este mecanismo también se demostró que ocurre sobre plaquetas activadas, ya que al degranularse exponen la P-selectina en su membrana [197]. La relevancia funcional de este mecanismo ha sido demostrado a través del bloqueo de P-selectina con anticuerpos monoclonales o con su ligando soluble PSGL-1. El depósito de C3b sobre estas células inicia la vía alternativa del complemento, culminando en la deposición de c5b-c9 sobre la membrana. Este complejo en cantidades sublépticas, puede ser un potente agonista de plaquetas, mediante la despolarización del potencial de

membrana [198], que culmina en la degranulación [199, 200] y la liberación de macropartículas procoagulantes [201]. Sugiriendo que la activación del complemento podría jugar un papel patogénico también en el SUH típico.

La interacción de Stx y LPS con plaquetas y leucocitos podrían ser la base de otro mecanismo de activación del complemento en pacientes con SUH típico. Esta idea deriva de experimentos realizados *in vitro*, incubando sangre entera humana con Stx2 y/o LPS. En los mismos, se observó que los complejos de plaquetas-leucocitos y las macropartículas derivadas de éstos, presentaban C3 y C9 sobre sus superficies y C3a y sC5b-9 en la fracción plasmática [169]. La activación del complemento fue máxima cuando se utilizaron LPS y Stx concomitantemente.

Estudios realizados en animales arrojaron resultados contradictorios. En un modelo murino de SUH obtenido por coinyección de Stx2 y LPS, se observó expresión de P-selectina en el endotelio glomerular, asociada a deposición de C3 y formación de trombos [196]. En el mismo estudio ratones deficientes para FB tratados con LPS y Stx2, exhibieron menor trombocitopenia y menor deterioro de la función renal. Estos resultados sugieren que la activación del complemento a través de la vía alterna, podría estar implicada en el proceso trombótico glomerular. Por otro lado estudios en un modelo juvenil de primate no humano desafiado con Stx, que exhibía la tríada característica del SUH: trombocitopenia, anemia hemolítica y microangiopatía trombótica glomerular, no demostraron un aumento en los niveles plasmáticos de sC5b-9 [202].

También hay evidencias que muestran que Stx2 activa el complemento en la fase fluida, ya que observaron la formación de sC5b-9 tras la incubación de suero humano con Stx2 [203]. Este proceso fue dependiente de la concentración de Stx2, se produjo principalmente por la vía alternativa y no implicó la degradación de los reguladores del complemento FH o FI. Sin embargo, se demostró que la unión directa de Stx2 a FH, reducía la velocidad con la que ejercía su acción [203].

1.6- Estrés Oxidativo

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

El término ROS, incluye todos los metabolitos inestables de oxígeno molecular (O_2) que tienen mayor reactividad que este, como el anión superóxido (O_2^-) y el radical hidroxilo (OH^\cdot) y moléculas no radicales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

Hay diversas fuentes endógenas que contribuyen a la producción celular de la mayoría de las ROS. Una de ellas es la respiración aeróbica, como consecuencia de este proceso, las mitocondrias consumen O_2 y lo reducen, en una serie de pasos para producir H_2O . Sin embargo, aproximadamente un 2% del O_2 , queda parcialmente reducido dando lugar a la formación de H_2O_2 y OH^- [204].

Otra fuente son los peroxisomas, orgánulos encargados de degradar ácidos grasos y otras moléculas. Estos producen H_2O_2 como un subproducto, que es degradado por la catalasa. Bajo ciertas condiciones, algunas moléculas de H_2O_2 escapan a la degradación y son liberadas a otros compartimentos celulares, contribuyendo al daño oxidativo en el DNA [205].

Finalmente, las enzimas del citocromo P450, en los animales constituyen una de los sistemas de defensa primaria contra sustancias químicas tóxicas. La inducción de estas enzimas previene efectos tóxicos agudos, pero también resulta en subproductos oxidantes que dañan el ADN [206].

1.6.1- Tipos celulares involucrados en la producción de ROS

Las principales células involucradas en la producción de ROS son los PMN y monocitos a través del estallido respiratorio, como consecuencia de su activación. La enzima involucrada es la NADPH oxidasa que cataliza la formación de anión superóxido como agente citotóxico. Este es convertido en otros agentes oxidantes poderosos como

hipohalitos, H_2O_2 , OH^- y cloraminas, con poderosa actividad microbicida [207]. Aproximadamente el 50-70 % de las ROS es producida dentro de los compartimientos intracelulares, pero el resto es volcado al espacio extracelular causando daño tisular [208]. Las células que forman parte de la pared de los vasos sanguíneos, como células endoteliales, células del músculo liso y fibroblastos también son una fuente de ROS. Estas expresan una variedad de enzimas generadoras de ROS, siendo las más importantes, la NADPH oxidasa asociada a membrana y el citocromo P450 [209, 210]. Las NADPH oxidasas de los distintos tipos celulares vasculares no son idénticas. Sin embargo comparten las unidades estructurales y son reguladas por los mismos mecanismos [211]. A su vez, son estructuralmente similares a la de los PMN, pero producen menos cantidad de O_2^- [212].

En células endoteliales, otra enzima importante en la producción de ROS es la isoforma endotelial de NO sintetasa (eNOS). Esta enzima durante el funcionamiento normal de la pared del vaso produce óxido nítrico (NO). Sin embargo, bajo ciertas circunstancias se desacopla y produce mayoritariamente O_2^- en lugar de NO [213] [214].

Otro tipo celular con capacidad de producir ROS son las plaquetas. La liberación de varias ROS, incluyendo O_2 , OH^- y H_2O_2 es un fenómeno que se ha observado en plaquetas antes y después de la estimulación con agonistas tales como el colágeno o trombina [215-217]. Las ROS endógenas tienen efectos autocrinos o paracrinos en la activación plaquetaria. Las ROS derivadas de las plaquetas, al igual que las de la pared vascular, provienen de diferentes fuentes enzimáticas, pero la más importante es la isoforma plaquetaria de NADPH oxidasa, ya que puede ser activada por agonistas que inducen también la activación de la plaqueta [218-221].

La relevancia de NADPH oxidasa en plaquetas ha sido probada, ya que el DPI, un inhibidor de esta enzima, es capaz de inhibir también la agregación plaquetaria [222] y la formación de O_2^- [223, 224]. Por otra parte la producción de O_2^- , dependiente de NADPH oxidasa, aumenta el reclutamiento de plaquetas al trombo, ya que aumenta la biodisponibilidad de ADP [218]. Notablemente, la cantidad de O_2^- producido por plaquetas es similar a la

cantidad producida por el endotelio [225] y corresponde al 1% de lo que producen los PMN [226].

Existe una variedad de otras enzimas capaces de producir ROS en las plaquetas. Hay evidencia de que la eNOS puede ser relevante en plaquetas, ya que plaquetas de ratones deficientes en la misma, muestran una marcada reducción en la producción de O_2^- [227]. La xantina oxidasa contribuye a la producción plaquetaria de ROS inducida por trombina [217]. La fosfolipasa A2 (PLA2) [215] y otras enzimas del metabolismo del AA, tales como lipoxigenasas, también podrían participar [228, 229], aunque no hay suficiente evidencia.

1.6.2- Agentes antioxidantes

1.6.2.1- Agentes antioxidantes endógenos

Para contrarrestar los efectos nocivos del estrés oxidativo, las células y tejidos poseen mecanismos antioxidantes activos que previenen o revierten el daño oxidativo

Las defensas antioxidantes endógenas incluyen una red enzimática antioxidante compartimentalizada así como también moléculas no enzimáticas que normalmente se distribuyen dentro del citoplasma y diversos orgánulos celulares.

En los organismos eucariotas, existen enzimas antioxidantes primarias ubicuas, como superóxido dismutasa (SOD), catalasa y peroxidasas, que catalizan una compleja cascada de reacciones para convertir ROS en moléculas más estables, tales como agua y O_2 . Estas enzimas tienen como propósito minimizar la exposición de las células a las ROS. La SOD cataliza la conversión de O_2^- a H_2O y O_2 , la catalasa convierte H_2O_2 en agua y oxígeno libre y las peroxidasas catalizan la reducción de H_2O_2 a H_2O . Además, numerosas enzimas secundarias actúan en estrecha asociación con antioxidantes de bajo peso molecular para formar ciclos de óxido-reducción que proporcionan cofactores necesarios para el funcionamiento de las enzimas antioxidantes primarias.

Los antioxidantes no enzimáticos, como glutatión reducido (GSH), NADPH, tioredoxina, vitaminas E y C y trazas de metales, tales como el selenio, también funcionan como eliminadores directos de ROS. El más importante es el GSH, ya que es el más abundante

en células eucariotas, actúa como un reductor intracelular y protege a las células secuestrando ROS y detoxificando sustancias tóxicas [230]. Sin embargo, el papel central de GSH en la defensa antioxidante se debe a su capacidad de regenerar ácido ascórbico, otro poderoso antioxidante [231, 232]. El GSH también se encuentra involucrado en muchas funciones celulares: es un reservorio de cisteína, mantiene el estatus de tioles de proteínas, previniendo la oxidación de grupos sulfhidrilos (SH^-) o reduciendo uniones disulfuro inducidas por el estrés oxidativo. Además, es un modulador de procesos celulares como síntesis de DNA, procesos asociados a los microtúbulos y funciones inmunes [233, 234].

La síntesis de GSH depende de la disponibilidad de sus precursores: glutamato, glicina o cisteína [235]. El GSH es sustrato de la enzima GSH peroxidasa, que reduce H_2O_2 o peróxidos lipídicos formando glutatión oxidado (GSSG), cuya acumulación es nociva para la célula dado que puede interrumpir la función proteica [234].

Estos sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos son necesarios para sostener la vida manteniendo un delicado equilibrio oxidativo intracelular y minimizando el daño celular indeseable causado por ROS [236].

1.6.2.2- Agentes antioxidantes exógenos

N-acetil-L-cisteína (NAC)

NAC es un derivado sintético de la cisteína que actúa como quimioprotector contra la exposición a sustancias químicas tóxicas [237]

Históricamente, se la ha utilizado como un agente mucolítico en enfermedades respiratorias crónicas, así como un antídoto para hepatotoxicidad por sobredosis de acetaminofén. Más recientemente, estudios en animales y humanos demostraron que es un poderoso antioxidante y un agente terapéutico potencial en el tratamiento del cáncer, enfermedades cardíacas, infección por VIH, toxicidad de metales pesados y otras enfermedades caracterizadas por radicales libres y daño oxidativo [238-240].

NAC presenta propiedades antioxidantes directas e indirectas. Su grupo tiol libre es capaz de interactuar con los grupos electrofílicos de las ROS [241, 242] y además, al ser

precursor de GSH ejerce un efecto antioxidante indirecto aumentando su biosíntesis [242]. El mantenimiento adecuado de los niveles intracelulares de GSH es esencial para superar los efectos dañinos de agentes tóxicos.

S-Etil-L-Cisteína (SEC)

SEC es un compuesto orgánico hidrofílico, derivado del ajo. Posee propiedades antioxidantes ya que al contener azufre es capaz de reducir grupos tioles. Es similar a NAC, ya que actúa secuestrando ROS directa o indirectamente [243].

1.6.3- Estrés oxidativo y activación plaquetaria

Los cambios en el estado oxidativo ocurren como consecuencia de la activación plaquetaria normal. La agregación plaquetaria está asociada a un gran consumo de oxígeno [244] y a un marcado aumento de GSSG [245]. Sin embargo, la generación de un estrés oxidativo adicional en ciertos ambientes, puede ser protrombótico. La modulación del estado redox vascular, la presencia de ROS y la adición de antioxidantes exógenos pueden alterar la activación de plaquetas *in vitro* e *in vivo* y puede tener consecuencias patológicas.

1.6.3.1- Influencia de ROS exógenas en la función plaquetaria

Las ROS derivadas de varias fuentes vasculares han demostrado alterar la respuesta plaquetaria. Se han realizado numerosos estudios *in vitro* para investigar el rol de distintas ROS. La exposición directa de plaquetas a H_2O_2 , inhibe la activación plaquetaria dependiente de ADP [246, 247], mientras que potencia la activación dependiente de colágeno y ácido araquidónico (AA) [248].

Otros estudios demostraron que O_2^- , reduce el umbral para la activación plaquetaria inducida por trombina, colágeno, ADP, AA y también induce agregación espontánea [218, 249-251]. EL O_2^- es la ROS más importante, ya que además de activar plaquetas directamente y bajar el umbral para su activación por diferentes agonistas, es capaz de reaccionar con el NO derivado del endotelio, para formar peroxinitrito ($ONOO^-$). Esto

causa la disminución en la biodisponibilidad de NO, el cual es un potente inhibidor plaquetario. Así mismo, ONOO⁻ tiene un doble efecto sobre las plaquetas, inhibe la agregación inducida por ADP, trombina, colágeno y otros estímulos [252, 253], pero también las activa en solución buffer, invirtiéndose el efecto cuando se le agrega plasma [253, 254].

1.6.4- SUH y Estrés Oxidativo

El estrés oxidativo ha sido analizado en varios estudios con niños enfermos de SUH, cursando por el período agudo y en la recuperación [255-258].

En general, encontraron que los pacientes durante la fase aguda poseen altos niveles de GSSG [257] y mayor peroxidación lipídica sobre la membrana plasmática de los eritrocitos [259], con valores de malondialdehído (MDA) significativamente mayores que los controles y un aumento en las proteínas con signos de un avanzado proceso de oxidación [260]. En paralelo, se encontró una disminución significativa en la actividad de la SOD en eritrocitos de pacientes y la adición de su propio plasma provocaba que su actividad disminuya aún más [261].

Por otro lado, nosotros estudiamos el estrés oxidativo en el modelo murino de SUH por inoculación e.v. de Stx2. El principal hallazgo fue demostrar que Stx2 induce, directa o indirectamente, un estrés oxidativo fuerte que participa en el daño tisular y los procesos de insuficiencia renal. El estrés oxidativo fue visto tanto a nivel sistémico como localmente a nivel del riñón, a través del aumento de la producción de ROS por los PMN circulantes y la peroxidación lipídica de la membrana en células renales, respectivamente. También encontramos que los antioxidantes exógenos, NAC y SEC, mejoraron el desequilibrio oxidativo, reduciendo la producción de ROS y la peroxidación lipídica y protegiendo parcialmente a los ratones contra la insuficiencia renal y la letalidad [262].

En conjunto, estos datos sugieren que el daño oxidativo sobre la membrana plasmática de eritrocitos podría ser uno de los factores responsables de la anemia hemolítica característica de los pacientes con SUH y que el estrés oxidativo podría estar implicado en el daño tisular y en la falla renal durante el SUH.

Objetivos

2- Objetivos

Objetivo general

El SUH es una entidad clínica y anatomopatológica, caracterizada por la aparición brusca de anemia hemolítica, insuficiencia renal aguda y trombocitopenia, consecuencia de una microangiopatía de localización renal predominante, pero que puede afectar también otros sistemas como el sistema nervioso central y/o gastrointestinal.

El estado protrombótico en SUH ha sido principalmente atribuido al daño endotelial, ya que las células endoteliales en respuesta a Stx se activan y pierden su fenotipo tromborresistente normal, desencadenando la formación de trombos plaquetarios. Sin embargo, podría haber otros mecanismos involucrados.

Paralelamente, los principales factores patogénicos de las bacterias STEC: los LPS y la Stx, son fuertes estímulos inflamatorios y la respuesta inflamatoria, tanto a nivel local en el intestino, como a nivel sistémico, contribuyen a la patogénesis del SUH.

Recientemente ha sido documentado que las plaquetas además de su función hemostática poseen la capacidad de estimular a la respuesta inflamatoria mediante diversos mecanismos: formación de complejos con PMN y monocitos, activación del sistema de complemento, liberación de mediadores solubles proinflamatorios como el sCD40L, entre otros. Estas funciones tienen destacada participación en diferentes situaciones patogénicas, como diabetes y aterosclerosis. En este contexto, la interacción entre trombosis e inflamación, podría tener un rol destacado en el desarrollo del SUH.

Por lo tanto el **objetivo general** de este trabajo de tesis fue evaluar los mecanismos de activación de la respuesta trombótica y su interacción con la respuesta inflamatoria en el contexto del SUH.

Dentro de este marco los **Objetivos específicos** fueron:

- 1- Evaluar distintos parámetros que reflejen la activación trombótica y sus efectos proinflamatorios, durante el SUH, en un modelo murino por inoculación e.v. de Stx2:

- 1a-** Activación de la respuesta trombótica: a través del recuento plaquetario, unión de fibrinógeno a la plaqueta y expresión de P-selectina en superficie.
 - 1b-** Interacción con la respuesta inflamatoria: a través de la detección de complejos entre PMN y plaquetas circulantes y depósito de C3b en la membrana plaquetaria.
- 2-** Evaluar el mecanismo de activación plaquetaria inducido por Stx2. Para ello se utilizarán cultivos primarios de células endoteliales de glomérulo renal humano, tratados previamente con Stx2 e incubados con plaquetas. Particularmente se tomará la liberación de sCD40L por las plaquetas, como uno de los efectos proinflamatorios centrales durante su activación.
- 3-** Analizar la participación del estrés oxidativo en la activación plaquetaria y en la evolución del SUH. Analizaremos los efectos de las drogas antioxidantes NAC y SEC, sobre el efecto protrombótico de la Stx2 en los modelos *in vivo* e *in vitro*, indicados en los puntos 1 y 2 respectivamente.
- 4-** Evaluar los niveles de sCD40L en el plasma de pacientes con SUH en la etapa aguda y la existencia de correlación con el grado de severidad.
- 5-** Analizar el rol de sCD40L en la actividad protrombótica y proinflamatoria de los plasmas de pacientes con SUH.

Materiales y métodos

3- Materiales y métodos

3.1- Estudios en el modelo murino de SUH

3.1.1- Reactivos generales

SEC, NAC, ADP y trombina fueron obtenidos en Sigma (St. Louis, MO). Anticuerpo monoclonal anti CD11b de ratón marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), anticuerpo monoclonal anti CD41 de ratón marcado con Ficoeritrina (PE) fueron obtenidos de BD (Becton Dickinson). Anticuerpo policlonal anti C3b humano, anticuerpo policlonal anti fibrinógeno humano marcado con FITC y anticuerpo policlonal anti conejo marcado con FITC, fueron obtenidos de DAKO.

3.1.2- Ratones

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

3.1.3- Tratamientos *in vivo*

3.1.3.1- Toxina Shiga-2 (Stx2)

El poder letal de la Stx2 fue evaluado inoculando a los ratones de forma e.v. por el plexo retroorbital bajo anestesia, como se describe en un manuscrito previo [125], con diluciones seriadas de la toxina en solución salina libre de pirógenos con 0.1% de suero fetal bovino (SFB). Esta dosis corresponde a 100 ng/kg (aproximadamente 2 ng/ratón) y fue la utilizada en todos los experimentos, la cual indujo $\approx 100\%$ de mortalidad entre las

72 y 96 horas luego de la inoculación. En todos los experimentos se utilizó toxina proveniente de la misma preparación con la misma dosis.

3.1.3.2- NAC y SEC

Las drogas antioxidantes se administraron por dos vías diferentes: oral (en el agua de bebida) e intraperitoneal (i.p.). Para el tratamiento vía oral, los ratones fueron tratados con 1 mg/ml de NAC y SEC en el agua de bebida (1mg/ml o 100mg/Kg/día) en agua potable teniendo en cuenta que cada ratón bebe aproximadamente 1 ml de líquido por día. Para el tratamiento vía i.p. los ratones fueron tratados con 5 mg/ratón de NAC y SEC en solución salina. Se utilizaron dos protocolos distintos según el tiempo de administración de ambos agentes: 48 horas antes o en simultáneo con la inoculación de Stx2. El tratamiento con los antioxidantes se prolongó hasta el final del experimento (entre las 48 y 72 horas post Stx2) para todos los ensayos realizados.

3.1.4- Obtención del Plasma Rico en Plaquetas (PRP)

La sangre fue obtenida por punción del plexo retroorbital, bajo anestesia, a las 24, 48 y 72 horas p.i. de Stx2. Para obtener el PRP, nueve volúmenes de sangre entera fue recolectada en tubos de polietileno conteniendo 1 volumen de citrato de sodio 3·8% (p/vol). Luego se diluyó al medio con Buffer HEPES-Mg (pH 7,4) y se centrifugo a 100 g por 20 minutos a temperatura ambiente. [22].

3.1.5- Determinación de urea plasmática.

El nitrógeno ureico plasmático fue determinado empleando un kit comercial enzimático-colorimétrico (Weiner Lab.) siguiendo las instrucciones del mismo. Un estándar de una concentración de 60 mg de urea/100 ml fue utilizado para calcular la concentración de las muestras testeadas.

3.1.6- Recuento de células de sangre periférica.

Se tomó una alícuota de sangre periférica (80µl), diluida con EDTA (20 µmol/L) y se realizó el recuento de plaquetas, leucocitos totales y PMN utilizando un contador hematológico veterinario (Abacus Junior Vet.)

3.1.7- Ensayo de unión de fibrinógeno.

Se incubaron 10 µl de PRP con 40 µl de buffer HEPES-Mg y 2,5 µl de anticuerpo anti fibrinógeno acoplado a FITC, con o sin 5 µl de ADP (200 µmol/L), durante 10 minutos a temperatura ambiente, en oscuridad. Para detener la reacción, se agregaron 50 µl de paraformaldehído 0.5%. Las plaquetas fueron analizadas utilizando el citómetro de flujo Becton Dickinson FACScan. En un gráfico de puntos (Dotplot), se identificó la población plaquetaria, fácilmente diferenciable de los eritrocitos, según tamaño y complejidad y se analizó la intensidad media de fluorescencia (IMF) de 10000 plaquetas.

3.1.8- Purificación de plaquetas murinas a partir de sangre entera

Se tomaron 600 µl de PRP y se agregó PBS hasta completar un volumen de 1500 µl. A continuación se agregó EDTA (2mM final) y se centrifugó a 200 g durante 5 minutos. Finalmente se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las plaquetas en RPMI a una concentración de 5×10^7 plaquetas/ml.

3.1.9- Expresión de P-selectina

Se incubaron 18 µl de la suspensión de plaquetas (1×10^6 plaquetas) con 1 µl de anticuerpo anti P-selectina acoplado a PE, con o sin 2 µl de trombina (0.5 U/ml) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Para detener la reacción, se agregaron 50 µl de paraformaldehído 0.5%. El porcentaje de células positivas y la IMF se midieron utilizando el citómetro de flujo (FACSCAN de Becton Dickinson).

3.1.10- Evaluación de depósito de C3b en la membrana plaquetaria

Se fijaron 50 μ l de PRP con 50 μ l de paraformaldehído 0.5% durante 30 minutos y se centrifugó 10 minutos a 3000 revoluciones por minuto (rpm) para obtener las plaquetas puras. Luego, se incubaron las plaquetas con una dilución 1/20 de un anticuerpo anti C3b hecho en conejo, se lavó y se incubó con una dilución 1/100 de un anticuerpo anti conejo acoplado a FITC. El porcentaje de células positivas y la IMF se midió utilizando el citómetro de flujo (FACSCAN de Becton Dickinson).

3.1.11- Evaluación de Complejos plaqueta-PMN

100 μ l de sangre periférica se incubaron con 1 μ l de anticuerpo anti CD11b (para identificar PMN) y 1 μ l de anti CD41 (para identificar plaquetas), durante 30 minutos, a temperatura ambiente. Luego se lisaron los glóbulos rojos con 900 μ l de agua destilada durante 1 minuto y se frenó la reacción con 100 μ l de PBS 10X. Se centrifugó durante 5 minutos a 4000 rpm, se lavó con 1 ml de PBS y se fijó con 150 μ l de paraformaldehído 0.5%. El porcentaje de eventos doble positivos son interpretados como complejos PMN-plaquetas y se midieron utilizando el citómetro de flujo (FACSCAN de Becton Dickinson).

3.2- Estudios *in vitro*

3.2.1- Reactivos generales

Stx2 fue obtenida de Phoenix Laboratory. Dihidrorodamina-123 (DHR-123), Forbol-Acetato Miristato (PMA), PGI₂, LPS, p-nitrofenilfosfato (PNP), factor de crecimiento de células endoteliales (ECGF) y el medio M199 fueron obtenidos de Sigma (St. Louis, MO). La L-glutamina, penicilina/estreptomicina y la tripsina fueron obtenidas de Gibco (EE.UU.). El anticuerpo anti FT acoplado a PE y el anticuerpo anti CD40L fueron obtenidos de BD (Becton Dickinson).

3.2.2- Buffers y medios de cultivo.

- **Medio de crecimiento de HGEC:** Medio M199 suplementado con 20% de SFB, 3,2 mM L-glutamina, 100 U/ml de penicilina/estreptomicina y 25 µg/ml de ECGF.
- **Buffer de lavado de plaquetas:** Buffer Tris 0,01 M, ClNa 0,15 M, Ph 7,4.
- **Buffer de reacción de fosfatasa ácida:** Buffer Citrato 0.1M y Tritón 0.1% , Ph 5,4.

3.2.3- Cultivos de células endoteliales de microvasculatura renal humana

Las células endoteliales glomerulares humanas, HGEC (Human Glomerular Endotelial Cells), fueron aisladas a partir de fragmentos de corteza de riñones pediátricos obtenidos de nefrectomías realizadas en el Hospital Alejandro Posadas. Se cultivaron en botellas recubiertas de gelatina (0,2%) con el medio detallado antes, en estufa a 37 °C y 5% de CO₂. Cuando alcanzaron la confluencia, se subcultivaron por tripsinización con tripsina (0,05%) EDTA (0,02%). Para los experimentos, se utilizaron células entre 2-7 pasajes.

3.2.4- Purificación de Plaquetas a partir de sangre humana.

Sangre de dadores normales voluntarios (División trombosis-Academia Nacional de Medicina) fue recolectada en citrato/dextrosa/adenina (ACD) y centrifugada a 200g durante 15 minutos, sin freno, para obtener el PRP. A continuación, el PRP fue recolectado en un tubo limpio y luego del agregado de PGI₂, se centrifugó a 800 g durante 10 minutos sin freno, para obtener el pellet de plaquetas. Luego se agregó un volumen de Buffer de lavado y se centrifugó nuevamente con las mismas condiciones que el paso anterior. Finalmente, se resuspendieron las plaquetas en RPMI, a una concentración de 1×10^9 plaquetas/ml.

3.2.5- Cultivos de HGEC y plaquetas.

Las HGEC se cultivaron en placas de 24 pocillos a una concentración de 50000 células por pocillo y una vez alcanzada la confluencia celular, fueron expuestas o no a Stx2 (0.1 y 1 ng/ml) durante 24 horas y en condiciones de arresto celular (SFB 10% y sin EGSF). Luego, se incorporaron plaquetas humanas purificadas (1×10^8 plaquetas por pocillo) y al cabo de 24 horas de cultivo se recolectaron los sobrenadantes y se almacenaron a -20°C .

3.2.6- Estimulación de plaquetas con Stx2

Las plaquetas (1×10^8) se incubaron con o sin Stx2 (1 ng/ml) durante 1 hora a 37 grados. Como control positivo se utilizó trombina (0.2 u/ml). Por último, se recolectaron los sobrenadantes y se almacenaron a -20°C .

3.2.7- Tratamiento con NAC

Las HGEC fueron incubadas con NAC (1mM). Se realizaron dos esquemas de tratamiento, uno incorporando la droga en el mismo momento que se incorpora la Stx2 y otro incorporándola 1 hora antes de la adición de las plaquetas.

3.2.8- Ensayo de citotoxicidad de rojo neutro.

Luego de recolectar los sobrenadantes pertenecientes a los cultivos antes mencionados, se añadieron 500 μl por pocillo del colorante vital, rojo neutro, recién diluido en M199 a una concentración final de 10 mg/ml y se incubó durante 1 hora en estufa a 37°C en 5% de CO_2 . A continuación se lavaron las células con 500 μl de CaCl_2 1% + formaldehído 1% y se solubilizó el colorante captado con 200 μl de ácido acético 1% en etanol al 50%. Finalmente la Densidad óptica (DO) en cada pocillo se midió en un espectrofotómetro de placas automático a 540 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de captación de rojo neutro, donde el 100% representa la viabilidad de las células control incubadas en condiciones idénticas pero sin tratamiento con Stx2.

3.2.9- Ensayo de fosfatasa ácida.

Luego de recolectar los sobrenadantes pertenecientes a los cultivos antes mencionados, se añadieron 400 µl por pocillo del sustrato PNP (1mg/ml) diluido en el buffer de reacción. Se incubó durante 1 hora en estufa a 37°C y finalmente se detuvo la reacción agregando 150 µl de NaOH 2N a cada pocillo. La DO en cada pocillo se midió en un espectrofotómetro a 405 nM. La DO en cada pocillo representa la actividad de fosfatasa acida proveniente tanto de HGEC como de plaquetas. La DO obtenida en los pocillos que contenían HGEC+plaquetas se compararon con la obtenida para su respectivo control con HGEC solas, atribuyendo la diferencia a las plaquetas adheridas.

3.2.10- Determinación de sCD40L.

Los niveles de sCD40L en plasmas y sobrenadantes fueron determinado mediante un kit de ELISA (E-Biosciences) según las instrucciones del proveedor.

3.2.11- Depleción de sCD40L de plasmas humanos.

Se sensibilizó una placa de 96 pocillos con un anticuerpo anti CD40L (2µg/pocillo) diluido en PBS, durante una noche. Al otro día se lavó 3 veces con PBS y se bloqueó la placa con PBS-BSA (0.5%) durante 1 hora. Luego de 3 lavados con PBS, se agregaron los plasmas a depletar. Luego de 2 horas de incubación se recogieron y almacenaron a -20°C. Los plasmas sin depletar, fueron incubados en paralelo en pocillos tratados en idénticas condiciones pero sin sensibilizar con el anti CD40L.

3.2.12- Purificación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

Sangre de dadores normales voluntarios (Servicio de hemoterapia-Hospital Fernandez) fue recolectada en citrato (3,8%). La sangre fue diluida al medio con PBS y se sembró sobre un gradiente de Ficoll-Hypaque formando un sistema bifásico, el cual fue centrifugado 30 minutos a 1600 rpm a 4°C. Luego de la centrifugación se obtuvo una interfase conteniendo los leucocitos mononucleares periféricos y un sedimento de eritrocitos y

granulocitos. Los leucocitos mononucleares de sangre fueron recolectados, lavados y resuspendidos en RPMI. La viabilidad celular fue siempre mayor al 98% de acuerdo al test de exclusión de azul Tripan.

3.2.13- Determinación del estallido respiratorio en monocitos

Los leucocitos mononucleares fueron resuspendidos en RPMI a una concentración de 2×10^6 /ml. A continuación se colocaron en tubos de polipropileno (1×10^6 células por tubo) y se incubaron durante 1 hora con los plasmas de pacientes SUH o sanos. Como control basal se utilizó medio RPMI suplementado con SFB 10% y como control positivo LPS (100 ng/ml). A continuación, se los traspasó a tubos eppendorf y se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos. Luego se resuspendieron en 200 μ l de RPMI y se agregó la DHR-123 (5 μ M), se incubó durante 15 minutos a 37°C en estufa gaseada, se agregó el PMA (200 ng/ml) y se incubó durante 15 minutos más. Se agregó 1 ml de PBS y se centrifugo nuevamente a 4000 RPM durante 5 minutos. Por último se resuspendieron en 200 μ l de PBS y se midió la fluorescencia verde en el citómetro de flujo. El análisis se realizó sobre 10000 eventos para cada muestra utilizando el programa Cell Quest (Becton Dickinson).

3.2.14- Determinación de la expresión de FT en monocitos

Los leucocitos mononucleares fueron resuspendidos en RPMI a una concentración de 2×10^6 /ml. A continuación se colocaron en tubos de polipropileno (1×10^6 células por tubo) y se incubaron, durante toda la noche, con los plasmas de pacientes SUH o sanos. Como control basal se utilizó medio RPMI suplementado con SFB 10% y como control positivo LPS (100 ng/ml). A continuación, se los traspasó a tubos eppendorf y se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos. Luego, se recolectaron los sobrenadantes y se almacenaron a -20 °C. Los PBMC fueron resuspendidos en 100 μ l de RPMI, 150000 células fueron separadas para el ensayo funcional. Los leucocitos mononucleares restantes fueron marcados, con 10 μ l de un anticuerpo anti FT acoplado a PE, durante 1 hora a 4 °C. Finalmente se lavaron con 1 ml de PBS y se determinó la fluorescencia roja en el citómetro de flujo. El

análisis se realizó sobre 10000 eventos para cada muestra utilizando el programa Cell Quest (Becton Dickinson).

3.2.15- Ensayo funcional del FT

Los leucocitos mononucleares, separados del ensayo anterior, fueron sembrados en placas de 96 pocillos (50000 células/pocillo). A continuación se agregaron 50 µl de plasma de un individuo sano, obtenido a partir de sangre citratada. El plasma se utilizó como fuente de los factores de coagulación, por lo cual fue previamente suplementado con CaCl₂ (1 mM final), para que la reacción de coagulación pudiese ocurrir. Finalmente, la cinética de la reacción fue determinada mediante turbidez registrada en un espectrofotómetro a 450 nM. Se realizaron mediciones cada 1 minuto y a partir de estas se construyeron curvas cinéticas de la reacción. El tiempo medio de coagulación fue calculado a partir de dichas curvas.

3.2.16- Determinación de TNF-α e IL1-β en sobrenadantes de leucocitos mononucleares

Se determinaron los niveles de ambas citoquinas en los sobrenadantes, mediante el uso de dos kits comerciales (E-Biosciences), siguiendo las instrucciones del proveedor.

Resultados

4- Resultados

4.1- Estudios en el modelo murino de SUH

El objetivo de este trabajo, es evaluar la interacción entre la respuesta trombótica e inflamatoria en el modelo murino de SUH, por inoculación intravenosa de Stx2. Si bien la respuesta inflamatoria en este modelo, ha sido caracterizada en profundidad por nuestro grupo de investigación, la respuesta trombótica es un área poco estudiada. Con lo cual para comenzar dichos estudios, primero se tuvo que hallar la dosis de Stx2 efectiva para inducir alteraciones hematológicas y renales y evaluarla a través de ciertos parámetros de daño sistémico, bien descritos por nuestro grupo: Función renal, a través de la determinación de uremia y las alteraciones en el recuento de leucocitos, neutrofilia y leucopenia.

4.1.1- Evaluación de la mortalidad causada por Stx2

La dosis de Stx2 apropiada para causar las alteraciones mencionadas, corresponde a la dosis que mata al 100 por ciento de los animales a las 96 horas post-inoculación (p.i.). Entonces, con el objetivo de encontrar dicha dosis, se realizó una curva de supervivencia con diferentes concentraciones de Stx2. Para ello, los ratones fueron inoculados con las dosis: 1,5; 2; 2,5 y 3 ng/ratón y se observó la mortalidad.

Como se muestra en la **figura 1**, las dosis de 2,5 y 3 ng/ratón fueron demasiado potentes, ya que el 100 por ciento de los ratones murieron a las 72 horas, por lo tanto fueron descartadas, la dosis correspondiente a 1,5 ng/ratón fue muy débil ya que ocasionó la muerte del 60 por ciento de los animales a las 96 horas p.i. por ende, también fue descartada. Por último la dosis correspondiente a 2 ng/ratón ocasionó la muerte del 100 por ciento de los animales a las 96 horas p.i. con lo cual, fue la dosis elegida para continuar con los ensayos.

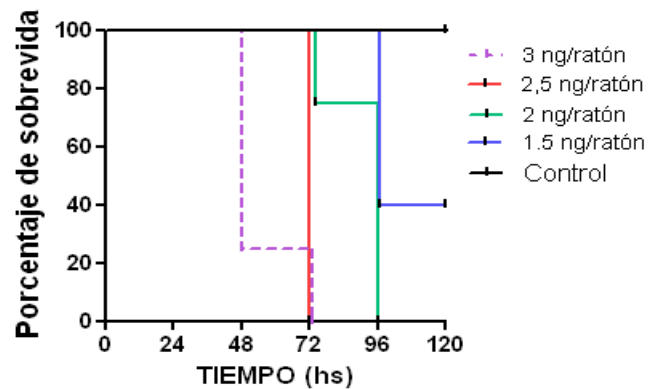


Figura 1. Curva de sobrevivencia. Los ratones fueron inoculados con Stx2 (1,5; 2; 2,5 y 3 ng/ratón) La sobrevivencia fue determinada por observaciones frecuentes de los animales. El gráfico muestra el porcentaje de sobrevivientes de 4 ratones por grupo.

4.1.2- Evaluación del daño sistémico causado por Stx2

4.1.2.1- Efecto de Stx2 sobre la función renal: determinación de uremia

En este modelo murino de SUH, los niveles elevados de urea en plasma correlacionan con el daño renal producido por Stx2 [263]. Por lo tanto, utilizamos este parámetro para confirmar el efecto renotóxico de Stx2, a la dosis elegida. Para esto, ratones inoculados con Stx2 o PBS, fueron sangrados a 24, 48 y 72 horas p.i., se obtuvo el plasma por centrifugación y se determinó la uremia con un kit comercial. Se observa en la **figura 2**, el incremento significativo de la uremia, en ratones inoculados con Stx2 a partir de las 48 horas, respecto de los ratones controles, confirmando así el daño renal causado por Stx2.

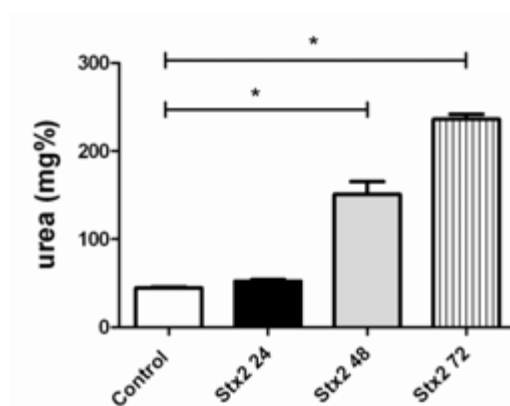


Figura 2. Determinación de uremia. Los ratones fueron inoculados con una dosis letal de Stx2 (2ng/ratón) y sangrados a los tiempos que aparecen en la figura (24, 48 y 72 horas). Los niveles de urea plasmática se midieron como parámetro del daño renal. Cada barra representa la Media±ESM de 6-10 ratones/grupo. Los datos fueron analizados con ANOVA, seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni. *p<0.05

4.1.2.2- Efecto de Stx2 sobre el número de Leucocitos de sangre periférica.

Ha sido demostrado, en el modelo murino de SUH, que Stx2 induce una disminución en el número de leucocitos totales, así como una marcada neutrofilia, que correlaciona con el daño renal y es indicativo de una activación del sistema inmune. Entonces, decidimos determinar el número absoluto de leucocitos y el porcentaje de PMN en sangre periférica, como otro parámetro de daño sistémico causado por Stx2.

Se encontró, como se muestra en la **figura 3**, una disminución en el número de leucocitos totales a partir de las 48 horas p.i. Así como un aumento en el porcentaje de PMN a partir de las 24 horas, respecto a los ratones que no recibieron la Stx2. De esta manera, confirmamos que la dosis elegida de Stx2 es la apropiada para observar sus efectos, tanto a nivel renal, como inflamatorio.

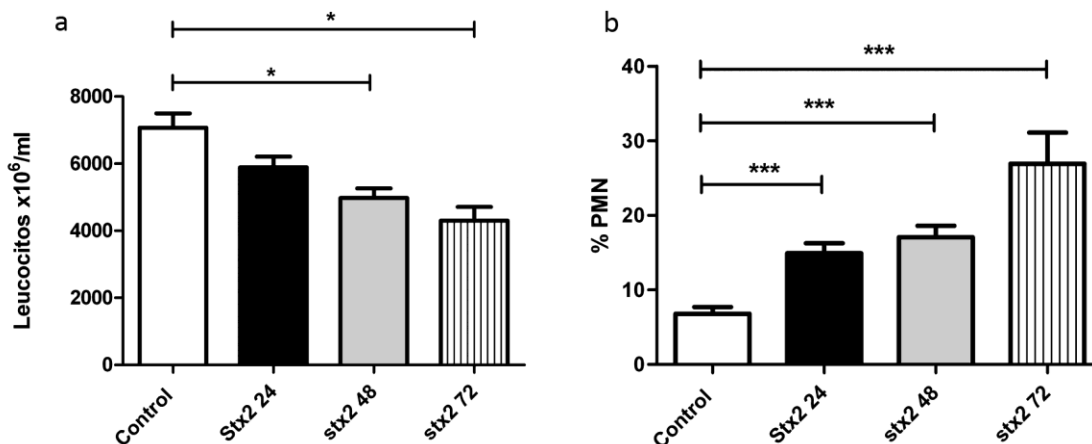


Figura 3. Recuento de Leucocitos circulantes de sangre periférica: Los ratones fueron inoculados con la dosis letal de Stx2 y sangrados a los tiempos que aparecen en la figura (24, 48 y 72 horas). El número absoluto de leucocitos y de PMN fue determinado con un contador hematológico veterinario. Cada barra representa la Media \pm ESM de 6-10 ratones/grupo. Los datos fueron analizados con ANOVA, seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni. * $p < 0,05$ *** $p < 0.01$

4.1.3- Efecto de Stx2 sobre la Respuesta Trombotica

4.1.3.1- Efecto de Stx2 sobre el número de plaquetas circulantes

Con el objetivo de evaluar si nuestro modelo murino de SUH, es capaz de reproducir la trombocitopenia observada en humanos, ratones inoculados con Stx2 o PBS, fueron sangrados a 24, 48 y 72 horas p.i. y se determinó el número de plaquetas circulantes. Como se observa en la **figura 4**, los ratones inoculados con Stx2 mostraron una disminución en el número de plaquetas circulantes, a partir de las 24 horas p.i.

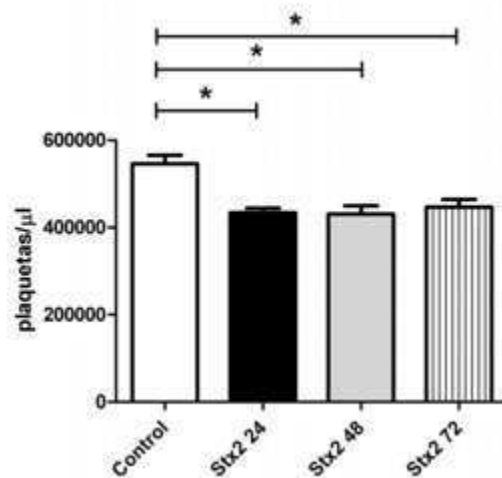


Figura 4. Número de plaquetas circulantes en sangre periférica. Los ratones fueron inoculados con la dosis letal de Stx2 y sangrados a los tiempos que aparecen en la figura (24, 48 y 72 horas). El número absoluto de plaquetas fue determinado con un contador hematológico veterinario. Cada barra representa la Media±ESM de 6-10 ratones/grupo. Los datos fueron analizados con ANOVA, seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni. * $p < 0.05$

4.1.3.2- Efecto de Stx2 sobre la activación plaquetaria

Una vez comprobada la trombocitopenia, decidimos evaluar el estado de activación de las plaquetas circulantes, a través del estudio de la capacidad de unir fibrinógeno y la expresión de P-selectina. Para ello ratones inoculados con Stx2 o PBS, fueron sangrados a 24, 48 y 72 horas p.i. y se determinaron la unión de fibrinógeno en el PRP y la expresión de P-selectina en plaquetas purificadas, ambos por citometría de flujo. En un gráfico de

puntos (dotplot) que diferencia poblaciones según tamaño (FSC-H) y complejidad (SSC-H), se tomó la región correspondiente a la población plaquetaria y luego se analizaron los marcadores de activación mencionados. La **figura 5** muestra un dotplot representativo, donde se observa la población de plaquetas en un PRP, proveniente de un ratón control y de un ratón tratado con Stx2 luego de 48 horas p.i.. En este último se puede apreciar la deformación de la nube plaquetaria, así como también la presencia de agregados. Sugiriendo que las plaquetas de estos ratones presentan un alto grado de activación.

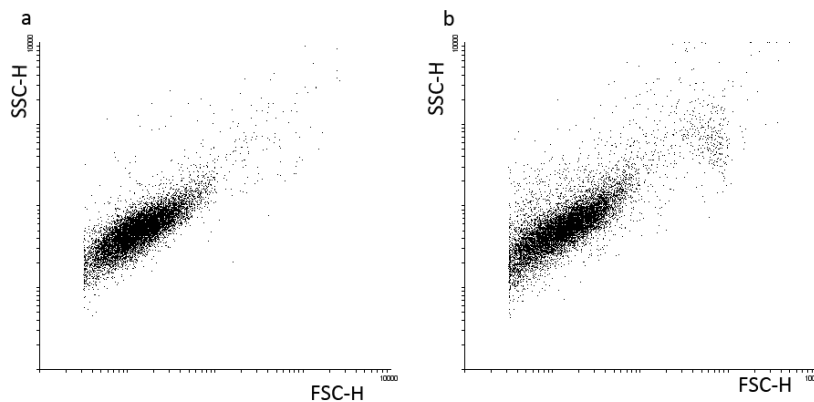


Figura 5. Gráfico de puntos (dotplot) de PRP. Se muestra un gráfico representativo, en el cual se diferencian poblaciones según tamaño (FSC-H) y complejidad (SSC-H). Se observa la población de plaquetas en un PRP proveniente de: **a.** Un ratón control y **b.** un ratón tratado con Stx2 48 horas p.i.

En la **figura 6**, se observa que las plaquetas de ratones que habían recibido la Stx2, tenían una mayor cantidad de fibrinógeno unido basalmente. Paralelamente se analizó la respuesta a un estímulo *in vitro* y se observó que las plaquetas de ratones con Stx2 tenían una capacidad de respuesta reducida respecto a los controles, tanto a las 48 como a las 72 horas p.i.

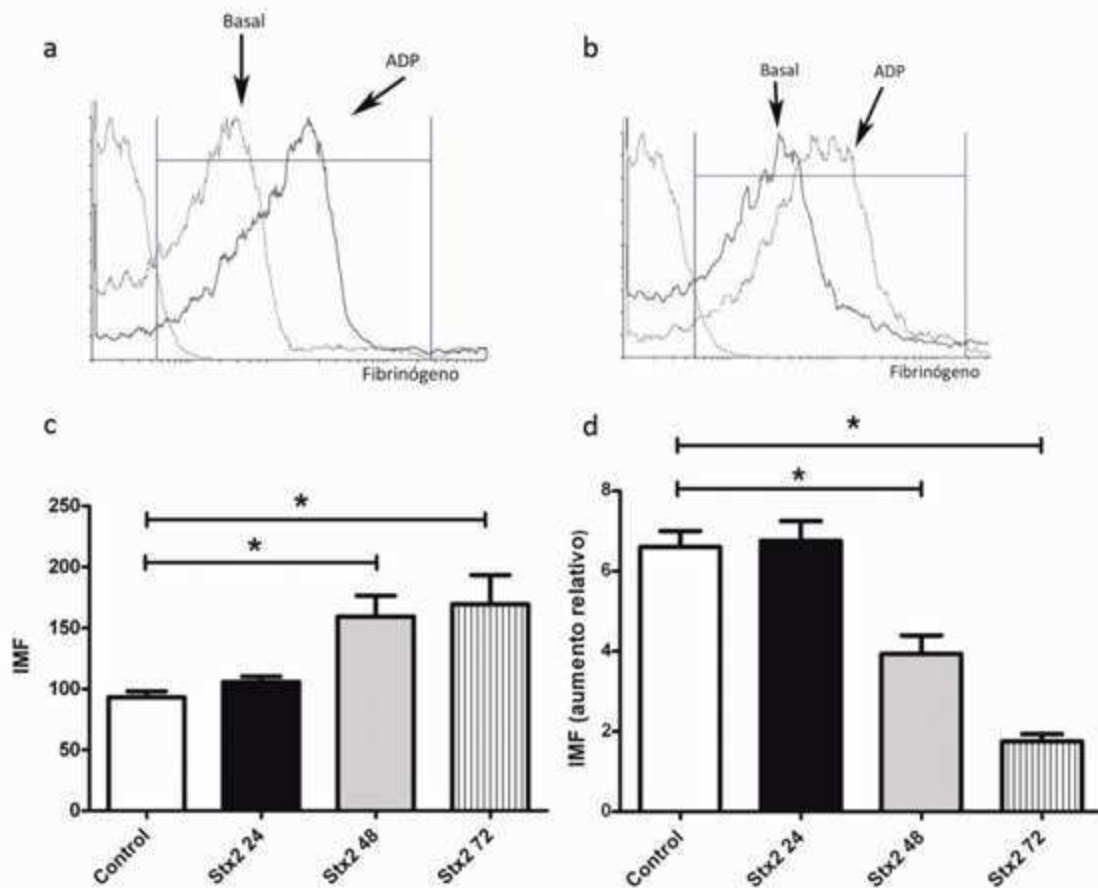


Figura 6. Activación de plaquetas circulantes. Unión de fibrinógeno. Los ratones fueron inoculados con una dosis letal de Stx2 y sangrados a los tiempos que se muestran en las figuras (24,48 y 72 horas). Se obtuvo el PRP por centrifugación y se determinó el fibrinógeno unido, pre (basal) y post estimulación *in vitro* con ADP 20uM, por citometría de flujo, marcando con un anticuerpo anti fibrinógeno acoplado a FITC. Se muestra un histograma representativo correspondiente al fibrinógeno unido a plaquetas basalmente y estimuladas con ADP de un ratón control (a) y un ratón tratado con Stx2 48 horas p.i. (b). Los gráficos representan la IMF del fibrinógeno unido basalmente (c) y el aumento relativo que corresponde al cociente entre fibrinógeno unido post estimulación *in vitro* y fibrinógeno unido basalmente (d). Cada barra representa la Media±ESM de 6-10 ratones/grupo. Los datos fueron analizados con ANOVA, seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni. *p<0.05

La **figura 7** muestra que las plaquetas pertenecientes a ratones con Stx2, si bien basalmente no presentaron un aumento en la expresión de P-selectina, si tenían disminuida la respuesta al estímulo *in vitro*.

Estos resultados sugieren que Stx2 es capaz de producir una activación plaquetaria *in vivo*, que se refleja en un número reducido de plaquetas circulantes, un aumento en el

fibrinógeno unido y una menor capacidad de respuesta frente a un estímulo *in vitro*, tanto para la unión de fibrinógeno como para la expresión de P-Selectina.

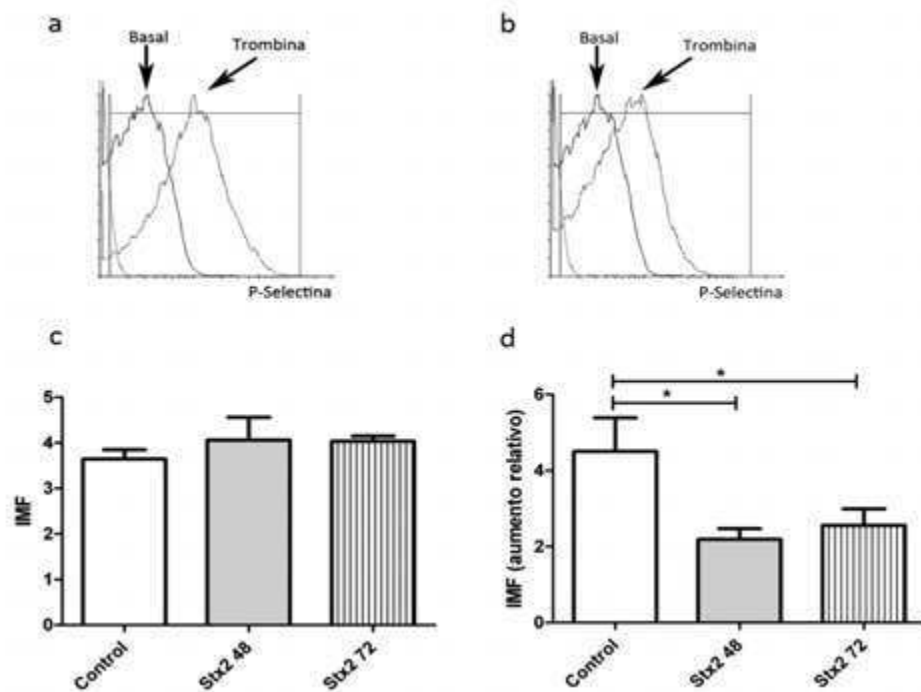


Figura 7. Activación de plaquetas circulantes. Expresión de P-selectina. Los ratones fueron inoculados con una dosis letal de Stx2 y sangrados a los tiempos que se muestran en las figuras (24,48 y 72 horas). Se obtuvo el PRP por centrifugación, luego se purificaron las plaquetas y se determinó la expresión de P-selectina, pre (basal) y post estimulación *in vitro*, con trombina 0.5U/ml, por citometría de flujo, marcando con un anticuerpo anti P-selectina acoplado a FITC. Se muestra un histograma representativo correspondiente a la P-selectina expresada en plaquetas sin estimular y estimuladas con trombina, de un ratón control (**a**) y un ratón tratado con Stx2 48 horas p.i. (**b**). Los gráficos representan la IMF de la P-selectina expresada en plaquetas sin estimular (**c**) y el aumento relativo que corresponde al cociente entre la P-selectina expresada post estimulación *in vitro* y sin estimular (**d**). Cada barra representa la Media \pm ESM de 6-9 ratones/grupo. Los datos fueron analizados con ANOVA, seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni. * $p < 0.05$

4.1.4- Efecto de Stx2 en la formación de complejos plaqueta-PMN

La formación de agregados entre plaquetas y leucocitos juega un rol fundamental en el inicio de la trombogénesis y la inflamación.

Entonces, decidimos estudiar la presencia de complejos plaqueta-PMN, en sangre periférica de ratones inoculados o no con Stx2. Para esto, se sangraron los ratones 48 y 72 horas p.i. y se evaluó la presencia de complejos, mediante citometría de flujo, marcando con un anticuerpo anti CD41, marcador de la población plaquetaria y con un

anticuerpo anti CD11b, marcador de PMN. En un dotplot que permite diferenciar poblaciones según tamaño y complejidad, se tomó la región de los PMN y se analizó el porcentaje de eventos dobles positivos, considerando que eran los PMN unidos a plaquetas.

Como se observa en la **figura 8**, se detectó un incremento significativo en la formación de complejos en los ratones que recibieron Stx2 a partir de las 48 horas p.i. En la **figura 8a-d** se pueden ver los dotplots representativos correspondientes a cada tratamiento.

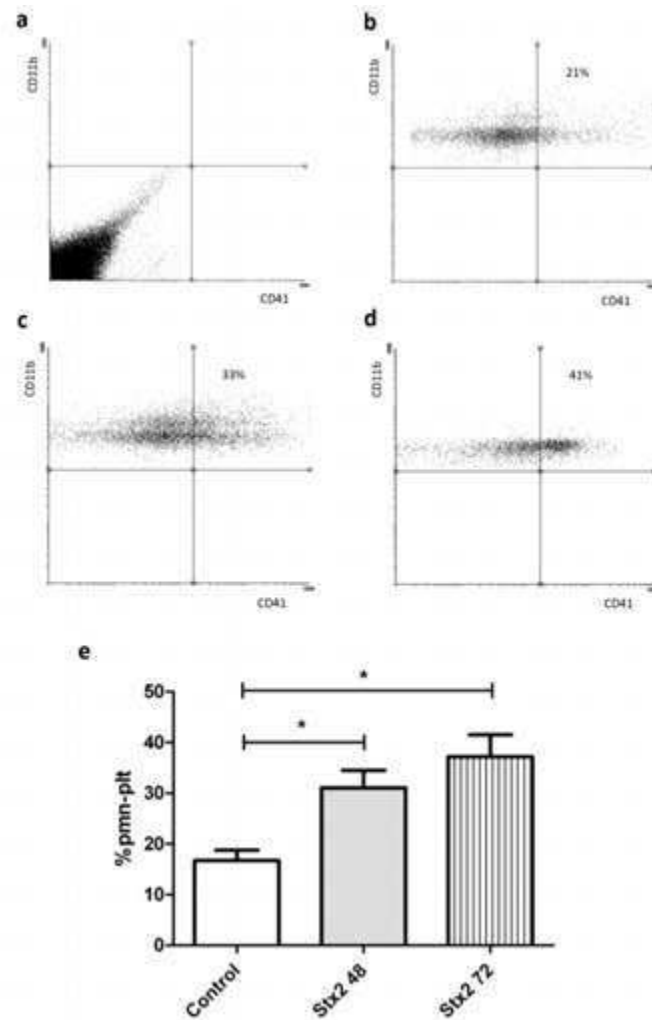


Figura 8. Formación de complejos Plaquetas-PMN. Los ratones fueron inoculados con la dosis letal de Stx2 y sangrados a diferentes tiempos (48 y 72 horas). Se realizó la doble marcación con anti CD41 acoplado a PE y anti CD11b acoplado a FITC, en sangre entera. La presencia de complejos fue evaluada por citometría de flujo. Se muestran un dotplot representativo para cada tratamiento **a.** Control sin marca, **b.** Ratón control **c.** Ratón con Stx2 48 horas. y **d.** Ratón con Stx2 72 horas. **e.** Cada barra representa los porcentajes de eventos dobles positivos (Media \pm ESM para 9 ratones por grupo). Los datos fueron analizados con ANOVA, seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni. * $p < 0.05$

4.1.5- Efecto de Stx2 sobre la interacción entre plaquetas y sistema de complemento

Con el objetivo de analizar si la activación plaquetaria secundaria a la inoculación de Stx2, produce una activación del sistema del complemento, se midió el depósito de C3b sobre las plaquetas, por citometría de flujo. Para esto ratones inoculados con Stx2, fueron sangrados a 24, 48 y 72 horas p.i. Se obtuvo el PRP, se marcó con un anticuerpo anti C3b y se determinó el porcentaje de plaquetas positivas y la IMF relativa al control, por citometría de flujo. Se encontró que los ratones tratados con Stx2 tenían mayor depósito de C3b sobre sus plaquetas, que los ratones tratados con PBS. Esto corresponde a un mayor porcentaje de plaquetas positivas para C3b y a su vez, a una mayor IMF. Si bien el efecto se observa a todos los tiempos post inoculación las diferencias son significativas al tiempo de 48 horas (**figura 9**).

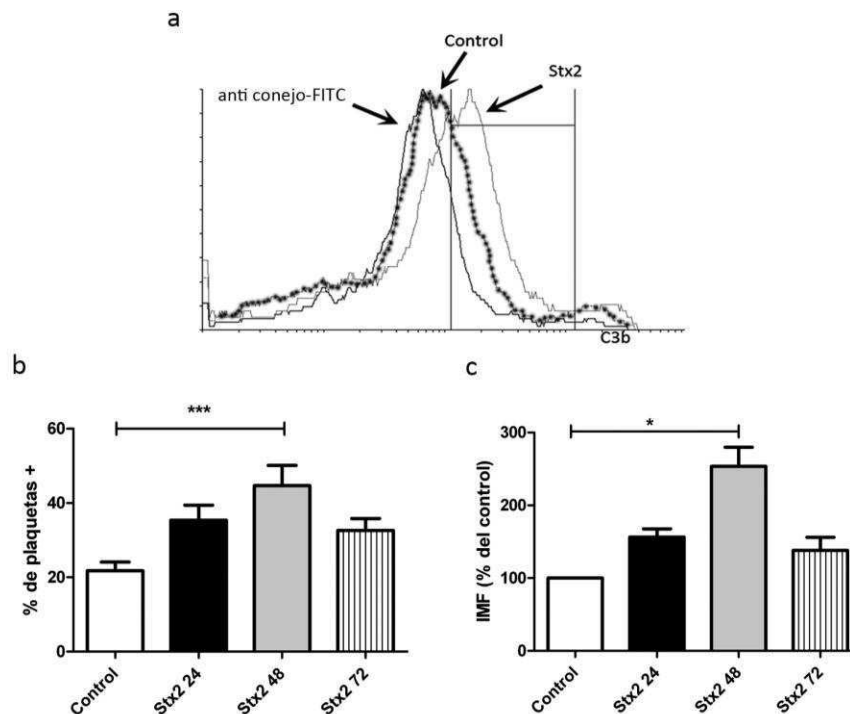


Figura 9. Depósito de C3b en la membrana plaquetaria. Los ratones fueron inoculados con una dosis letal de Stx2 y sangrados a diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas). El depósito de C3b en la membrana plaquetaria fue evaluado por citometría de flujo. Se muestra un histograma representativo de un experimento correspondiente al tiempo 48 horas (**a**). Los resultados se expresan como porcentaje de plaquetas positivas (**b**) e IMF relativa (**c**), donde el 100% corresponde a la IMF de las plaquetas provenientes de ratones tratados con PBS. Cada barra representa la Media±ESM de 6-10 ratones/grupo. Los datos fueron analizados con ANOVA, seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni. Para los datos relativizados se utilizó el one-sample t-test *** $p < 0.01$.

4.1.6.- Efecto de antioxidantes sobre el daño causado por Stx2

El estrés oxidativo es el desbalance que existe entre el estado pro-oxidante y el antioxidante, a favor del primero. Recientemente demostramos en el modelo murino, que Stx2 es capaz de inducir un desbalance oxidativo, ya que aumenta los niveles de malondialdehído (MDA) renales, principal producto de peroxidación lipídica y disminuye el contenido de GSH, el más importante antioxidante endógeno [262].

Por lo tanto, decidimos estudiar el efecto de dos drogas antioxidantes, NAC y SEC sobre los efectos deletéreos causados por Stx2.

4.1.6.1- Efecto de NAC y SEC sobre el índice de sobrevida

En primer lugar se evaluó el efecto protector de los dos antioxidantes NAC y SEC sobre la mortalidad causada por Stx2. Para esto, se realizaron dos protocolos de administración de las drogas antioxidantes: vía oral, en el agua de bebida, 48 horas previas a la inoculación con Stx2 y vía i.p.. Por esta vía se probaron, a su vez dos tiempos: simultaneo con Stx2 (T0) ó 48 horas previo a la inoculación con Stx2 (T-48).

Como se observa en la **figura 10a**, no hubo protección de parte de ningún antioxidante con el protocolo de administración por vía oral, a través del agua de bebida.

En la **figura 10 b**, se representa la curva de sobrevida con los protocolos de administración de antioxidantes vía i.p., mostrando que solo el tratamiento con NAC fue capaz de retrasar la muerte y proteger a un 40 % de los animales.

No se obtuvo protección con ninguno de los dos antioxidantes utilizando el protocolo de administración por vía i.p. y en simultaneo con Stx2.

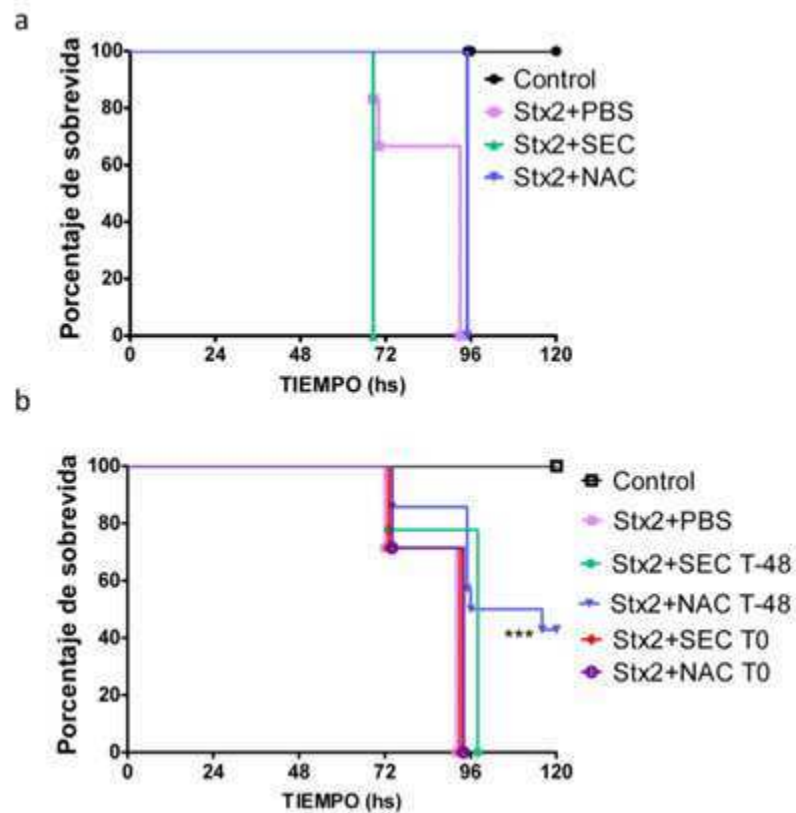


Figura 10. Curva de sobrevida. Los ratones fueron tratados con NAC y SEC, por dos vías: a. vía oral, en el agua de bebida y b. vía i.p. La sobrevida fue determinada por observaciones frecuentes de los animales. Los gráficos muestran el porcentaje de sobrevivientes de 6-9 ratones por grupo. Todas las comparaciones fueron realizadas por el test log-Rank ***p<0.001 vs. Stx2+PBS

4.1.6.2- Efecto de NAC sobre los parámetros de daño sistémico causado por Stx2

Con el objetivo de evaluar el efecto de los antioxidantes sobre los parámetros de daño sistémico causado por Stx2, decidimos estudiar el tratamiento más efectivo, es decir: con NAC, siguiendo el protocolo de inoculación por vía i.p. 48 horas previo a la administración de Stx2.

4.1.6.2.1- Efecto de NAC sobre el daño renal causado por Stx2: Determinación de uremia

Para evaluar si el aumento en la sobrevida se correlaciona con un efecto protector sobre el daño renal causado por Stx2, se procedió a la determinación de la urea en plasma. Para

esto, los ratones fueron tratados o no con NAC y 48 horas después se les administró o no Stx2. Luego todos los grupos fueron sangrados 48 y 72 horas p.i. obteniéndose el plasma para determinación de urea.

Se encontró que tanto a las 48 (**figura 11a**) como a las 72 horas (**figura 11b**), los ratones tratados con NAC+Stx2, presentaban una disminución parcial pero significativa en los niveles de urea plasmática, respecto de los ratones que habían recibido la Stx2, pero no habían sido tratados con NAC. Con lo cual, concluimos que el pretratamiento con NAC protege parcialmente del daño renal.

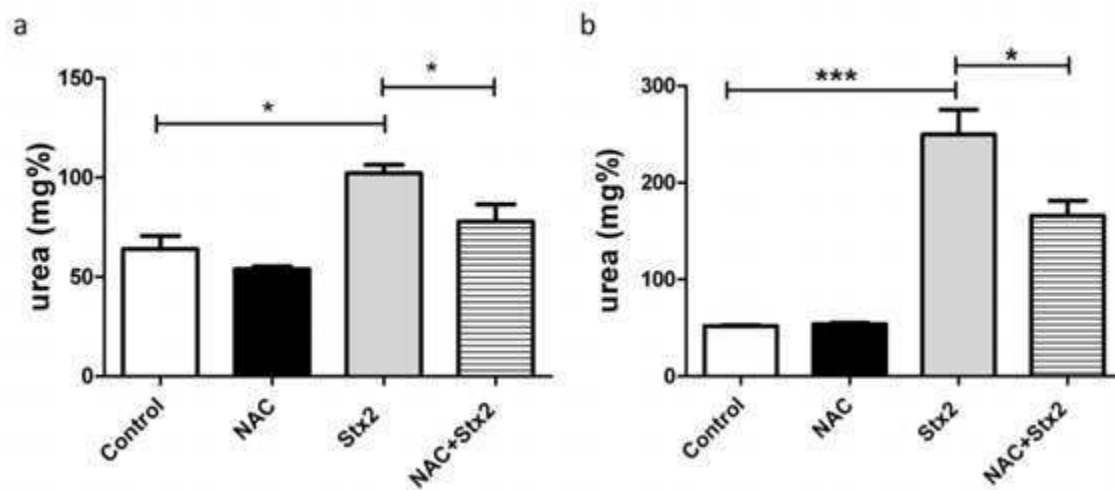


Figura 11. Determinación de Uremia. Los ratones fueron tratados con NAC e inoculados con Stx2 48 horas después. Luego fueron sangrados a las 48 y 72 horas p.i. Los niveles de urea plasmática se midieron como parámetro del daño renal. **a.** Uremia a las 48 horas p.i. y **b.** Uremia a las 72 horas p.i. Cada barra representa la Media±ESM de 6-10 ratones/grupo. Los datos fueron analizados con ANOVA, seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni.* $p<0.05$ *** $p<0.001$

4.1.6.2.2- Efecto de NAC sobre las alteraciones leucocitarias causadas por Stx2

Con el objetivo de estudiar si NAC es capaz de modular las alteraciones en la respuesta inmunológica que produce la Stx2, se procedió a realizar el recuento de leucocitos totales y el porcentaje de PMN. Para esto, los ratones fueron sangrados a las 48 horas p.i. y se determinaron ambos parámetros utilizando el contador hematológico veterinario Abacus junior Vet.

Como se muestra en la **figura 12**, se observó que el pretratamiento con NAC, induce *per se* una disminución en el número de leucocitos totales y un aumento en el porcentaje de PMN. Por lo tanto como era esperable la combinación de ambos tratamientos potenció las alteraciones leucocitarias causadas por Stx2.

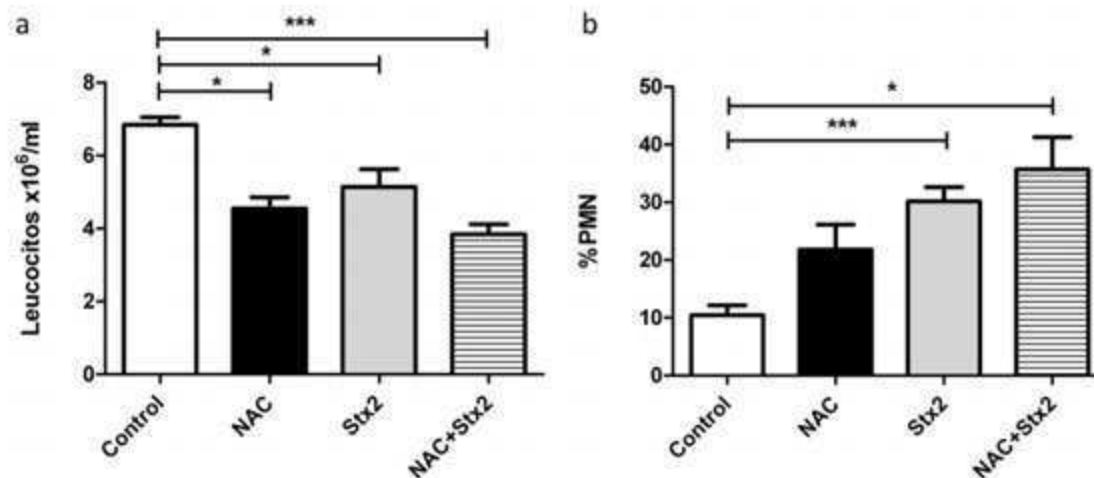


Figura 12. Recuento de Leucocitos circulantes de sangre periférica. Los ratones fueron tratados con NAC e inoculados con Stx2 48 horas después. Luego fueron sangrados a las 48 p.i. El número absoluto de leucocitos y de PMN fue determinado con un contador hematológico veterinario. **a.** Recuento de leucocitos totales y **b.** Porcentaje de PMN. Cada barra representa la Media±ESM de 6-10 ratones/grupo. Los datos fueron analizados con ANOVA, seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni. *p<0.05 *** p<0.001

4.1.6.3- Efecto de NAC sobre la activación plaquetaria inducida por Stx2

Considerando que NAC previene al menos parcialmente la muerte y el daño renal secundario a Stx2, se decidió evaluar el efecto de NAC sobre la activación plaquetaria causada por Stx2.

Para esto, ratones pretratados o no con NAC e inoculados o no con Stx2, fueron sangrados a los diferentes tiempos que se indican en las **figuras 13 y 14**. Se midió la activación plaquetaria, según el número de plaquetas circulantes y la capacidad de unir fibrinógeno, como se describió previamente.

Como se observa en la **figura 13**, los ratones tratados con Stx2 sin NAC, presentan una disminución significativa de plaquetas circulantes, respecto de los ratones control. Mientras que los ratones tratados con NAC+Stx2, presentan un número de plaquetas

circulantes similar al de los ratones controles y significativamente mayor que el de los ratones tratados solo con Stx2.

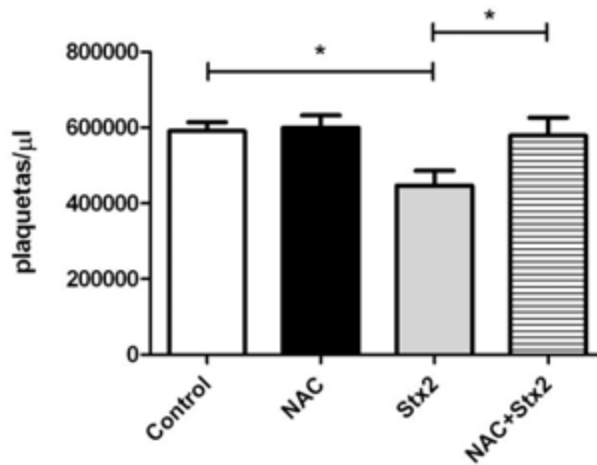


Figura 13. Número de plaquetas circulantes en sangre periférica. Los ratones fueron tratados con NAC e inoculados con Stx2 48 horas después. Luego fueron sangrados a las 48 p.i. El número absoluto de plaquetas fue determinado con un contador hematológico veterinario. Cada barra representa la Media±ESM de 6-10 ratones/grupo. Los datos fueron analizados con ANOVA, seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni. * $p < 0.05$

Por otro lado, en la **figura 14** se observa que las plaquetas provenientes de ratones tratados con NAC+Stx2 presentan menor cantidad de fibrinógeno unido basalmente y mayor capacidad de respuesta al estímulo *in vitro*, que las plaquetas provenientes de ratones tratados solo con Stx2, a partir de las 48 horas p.i. de Stx2. Sin embargo, estos parámetros no llegan a igualarse con los de los ratones controles, con lo cual concluimos que NAC es capaz de prevenir parcialmente la activación plaquetaria causada por Stx2.

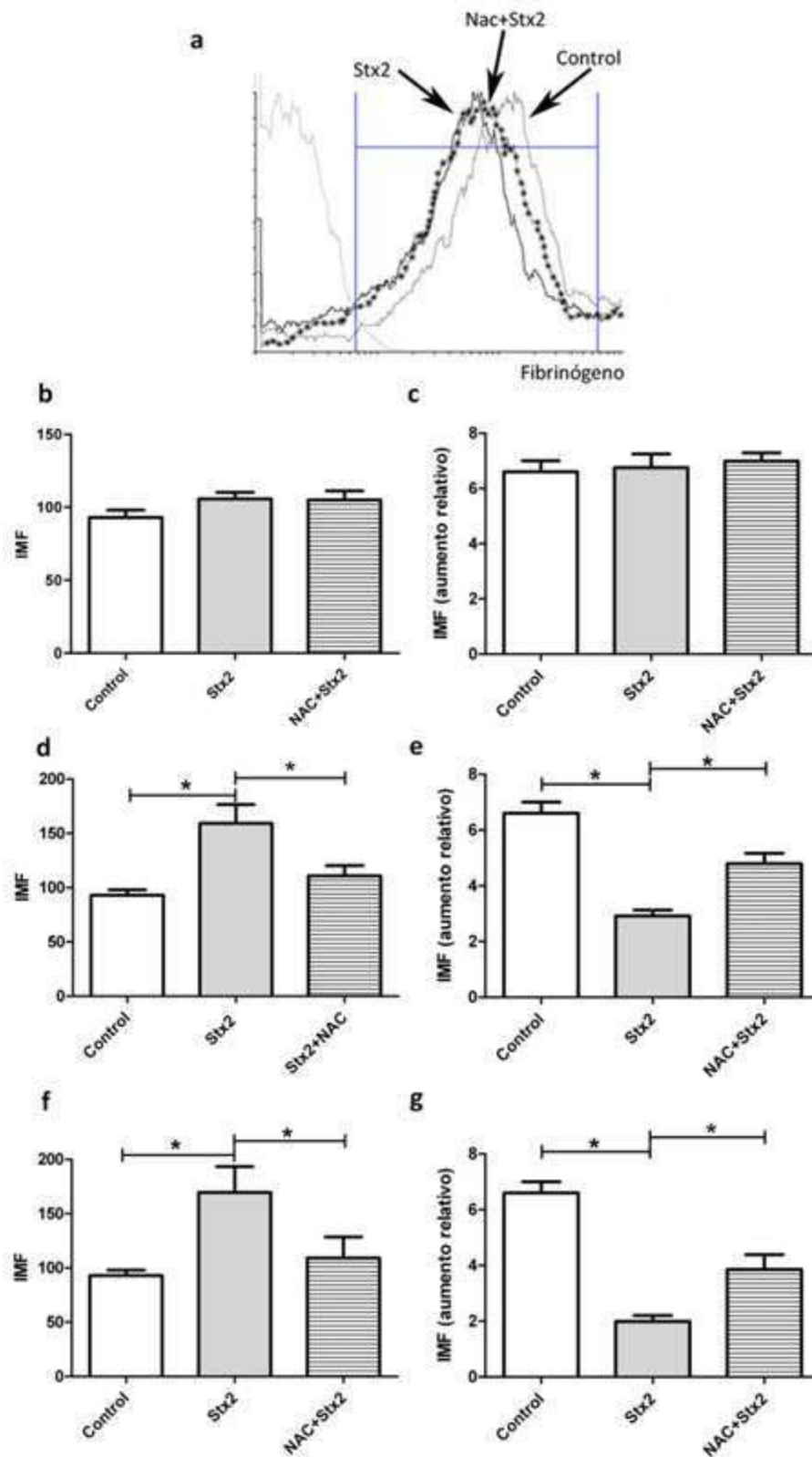


Figura 14. Activación de plaquetas circulantes. Los ratones fueron tratados con NAC e inoculados con Stx2 48 horas después. Luego fueron sangrados a las 24 (**b y c**), 48 (**d y e**) y 72 horas (**f y g**), p.i.. Se obtuvo el (PRP) y se determinó el fibrinógeno unido, pre (basal) y post estimulación *in vitro* con ADP, por citometría de flujo, marcando con un anticuerpo anti-fibrinógeno acoplado a FITC. **a**) Se muestra un histograma representativo del fibrinógeno unido a plaquetas estimuladas con ADP, en un ratón Control, en un ratón tratado con Stx2, y en un ratón tratado con Stx2+NAC, correspondiente al tiempo de 48 horas p.i.. Los resultados se muestran como fibrinógeno unido basal (**b, d y f**) y como aumento relativo, que corresponde al cociente entre la IFM obtenida post-estímulo *in vitro* y la obtenida basalmente (**c, e y g**). Cada barra representa la Media±ESM de 6-10 ratones/grupo. Los datos fueron analizados con ANOVA, seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni. *p<0.05

4.1.6.4- Efecto de NAC en la formación de complejos plaqueta-PMN

Previamente hemos demostrado como Stx2 contribuye a la formación de complejos entre PMN y plaquetas, y como NAC es capaz de prevenir parcialmente la activación plaquetaria. Teniendo en cuenta estos resultados, decidimos evaluar si el tratamiento con NAC es capaz de prevenir la formación de estos complejos. Para esto, se sangraron ratones a las 48 horas p.i. y se procedió a la determinación de los complejos como se describió anteriormente.

Se encontró, como se muestra en la **figura 15** que los ratones tratados con NAC+Stx2 presentan un porcentaje de complejos menor al de los ratones tratados solo con Stx2 e igual al de los ratones controles. El tratamiento con NAC sola no induce diferencias respecto al control.

Estos resultados permiten concluir que NAC es capaz de prevenir casi totalmente la formación de complejos causada por Stx2.

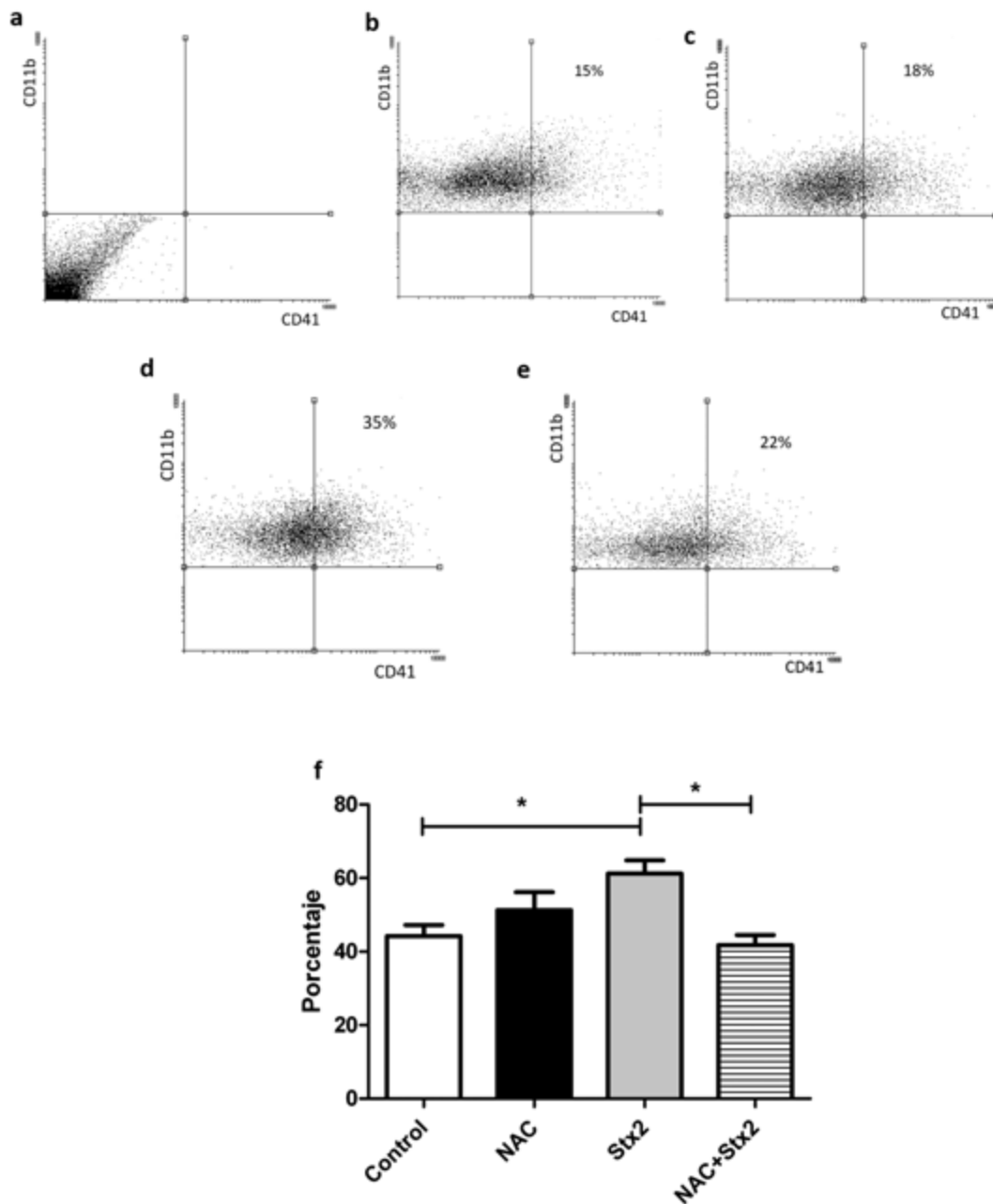


Figura 15. Formación de complejos plaqueta-PMN. Los ratones fueron tratados con NAC e inoculados con Stx2 48 horas después. Luego fueron sangrados a las 48 p.i. y se realizó la doble marcación en sangre entera. La presencia de complejos se determinó por citometría de flujo. Se muestran un dotplot representativo para cada tratamiento: **a.** Control sin marca, **b.** Ratón Control, **c.** Ratón con NAC, **d.** Ratón con Stx2, **e.** Ratón con NAC+Stx2 y **f.** Gráfico de barras en el cual cada barra representa los porcentajes de eventos doble positivos respecto del total de PMN (Media \pm ESM para 9 ratones por grupo). Los datos fueron analizados con ANOVA, seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni. * $p < 0.05$

Una vez cumplidos los objetivos en el modelo murino de SUH, se decidió evaluar el efecto de Stx2 en un sistema *in vitro* que incluye células endoteliales glomerulares y plaquetas purificadas de sangre periférica humana.

4.2- Estudios en el modelo *in vitro*

4.2.1- Efecto de las plaquetas sobre el daño endotelial causado por Stx2

Con el objetivo de evaluar la participación de las plaquetas en el efecto citotóxico de la Stx2 sobre el endotelio, se procedió a cultivar las células endoteliales glomerulares humanas (HGEC) con o sin Stx2 (0.1ng/ml o 1 ng/ml) durante 24 horas, luego se agregaron o no las plaquetas purificadas y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Se realizó una tinción con hematoxilina/eosina (H/E), para poder observar directamente el efecto de Stx2 sobre el endotelio. También, se evaluó la viabilidad por el ensayo de citotoxicidad con rojo neutro.

En la **figura 16a-f**, se muestran fotografías representativas correspondientes a cada tratamiento y se puede observar el daño endotelial causado por Stx2, evidenciado por un menor número de células adheridas en los tratamientos con Stx2.

La **figura 16g** muestra un gráfico correspondiente al porcentaje de viabilidad celular, arrojado por el ensayo con rojo neutro. Se observó una disminución significativa en la viabilidad de las HGEC cuando se las incubó con Stx2 a una concentración de 1ng/ml, con o sin el agregado de plaquetas, respecto al control de HGEC sin tratar. El tratamiento con Stx2 0.1ng/ml no presentó diferencias significativas respecto al control

Como conclusión, Stx2 ejerce un efecto citotóxico dosis dependiente sobre el endotelio y el agregado de plaquetas no tuvo ningún efecto sobre la viabilidad. En otras palabras, las plaquetas no son capaces de modular los efectos tóxicos directos de Stx2 sobre el endotelio.

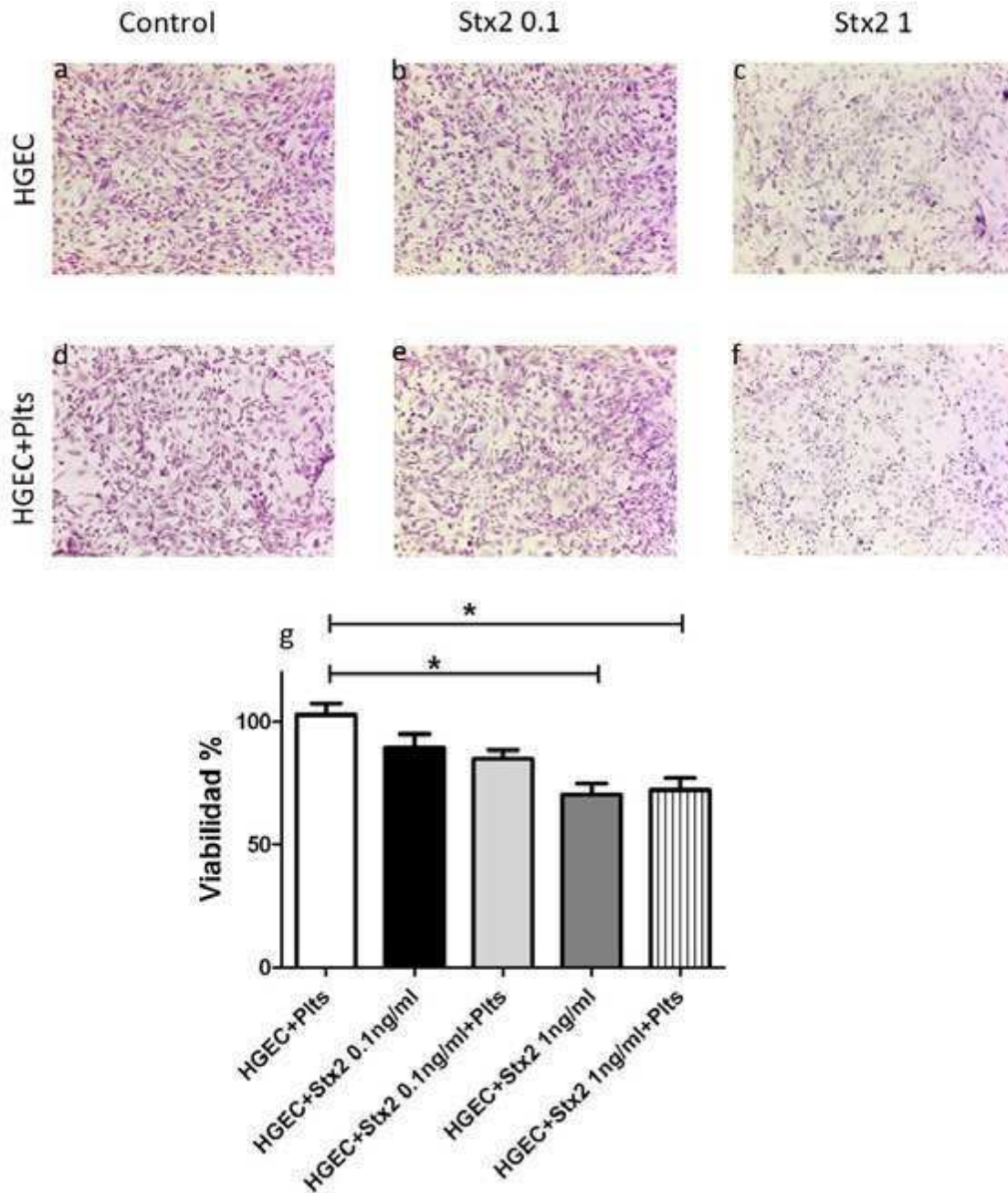


Figura 16. Citotoxicidad de Stx2 sobre el endotelio Las células fueron cultivadas con o sin Stx2 (0.1 ng/ml ó 1 ng/ml) durante 24 horas, luego se agregaron las plaquetas (Plts) y se incubaron durante 1 hora. Se realizó una tinción con H/E para observar el daño endotelial. También se midió la citotoxicidad por la tinción con rojo neutro. **a-f)** Fotografías representativas donde se observa el daño endotelial en las diferentes condiciones (10x). **g.** Gráfico que muestra la viabilidad celular determinada por el ensayo con rojo neutro. Se muestran los resultados de 3 experimentos independientes, el 100% de viabilidad corresponde a la DO registrada para el control de HGEC sin tratar. Cada barra representa la Media±ESM para cada tratamiento. Los datos fueron analizados con el test de Kruskal-Wallis y el post-test Dunns * $p < 0,05$.

4.2.2- Adhesión de las plaquetas al endotelio dañado por Stx2

Si bien las plaquetas no modulan la citotoxicidad de Stx2 sobre el endotelio, se quiso evaluar si el daño inducido por Stx2 influye sobre la actividad trombótica, evaluando la adhesión de las plaquetas sobre las HGEC. Para esto se realizaron los cultivos antes mencionados y se evaluó la adhesión plaquetaria directamente por el ensayo de fosfatasa ácida, registrando la DO como medida de plaquetas adheridas. Cabe destacar que las HGEC también contribuyen a la DO registrada, ya que al igual que las plaquetas poseen fosfatasa ácida, por eso comparamos cada tratamiento con su respectivo control sin plaquetas, atribuyendo la diferencia a las plaquetas adheridas. También medimos la adhesión indirectamente mediante el recuento de plaquetas agregadas al cultivo y luego recuperadas en el sobrenadante. El resultado se muestra como porcentaje de plaquetas recuperadas, el 100 % corresponde al número de plaquetas que se recuperaron en el control de HGEC sin Stx2.

Además se realizó la tinción con H/E, para poder observar las plaquetas adheridas a las HGEC.

En la **figura 17a-f**, se muestran fotografías representativas correspondientes a cada tratamiento y se pueden observar las plaquetas adheridas (flechas), en los tratamientos con Stx2.

Como muestra la **figura 17g**, se observó un aumento significativo en la DO correspondiente al tratamiento de las HGEC con Stx2 1 ng/ml, respecto de su control sin plaquetas. El tratamiento con Stx2 0.1ng/ml no mostró diferencias respecto de su control. Se realizó un control de plaquetas solas, para descartar una posible adhesión de las mismas al vidrio.

Con respecto al recuento de plaquetas en el sobrenadante (**figura 17 h**), se recuperaron una cantidad de plaquetas significativamente menor en el tratamiento con Stx2 1 ng/ml, respecto al control sin Stx2. El tratamiento con Stx2 0.1ng/ml no arrojó diferencias respecto al control.

En conjunto estos resultados sugieren que el daño endotelial causado por Stx2 tiene como consecuencia, no solo la destrucción del tejido, sino también la adhesión de las plaquetas al mismo.

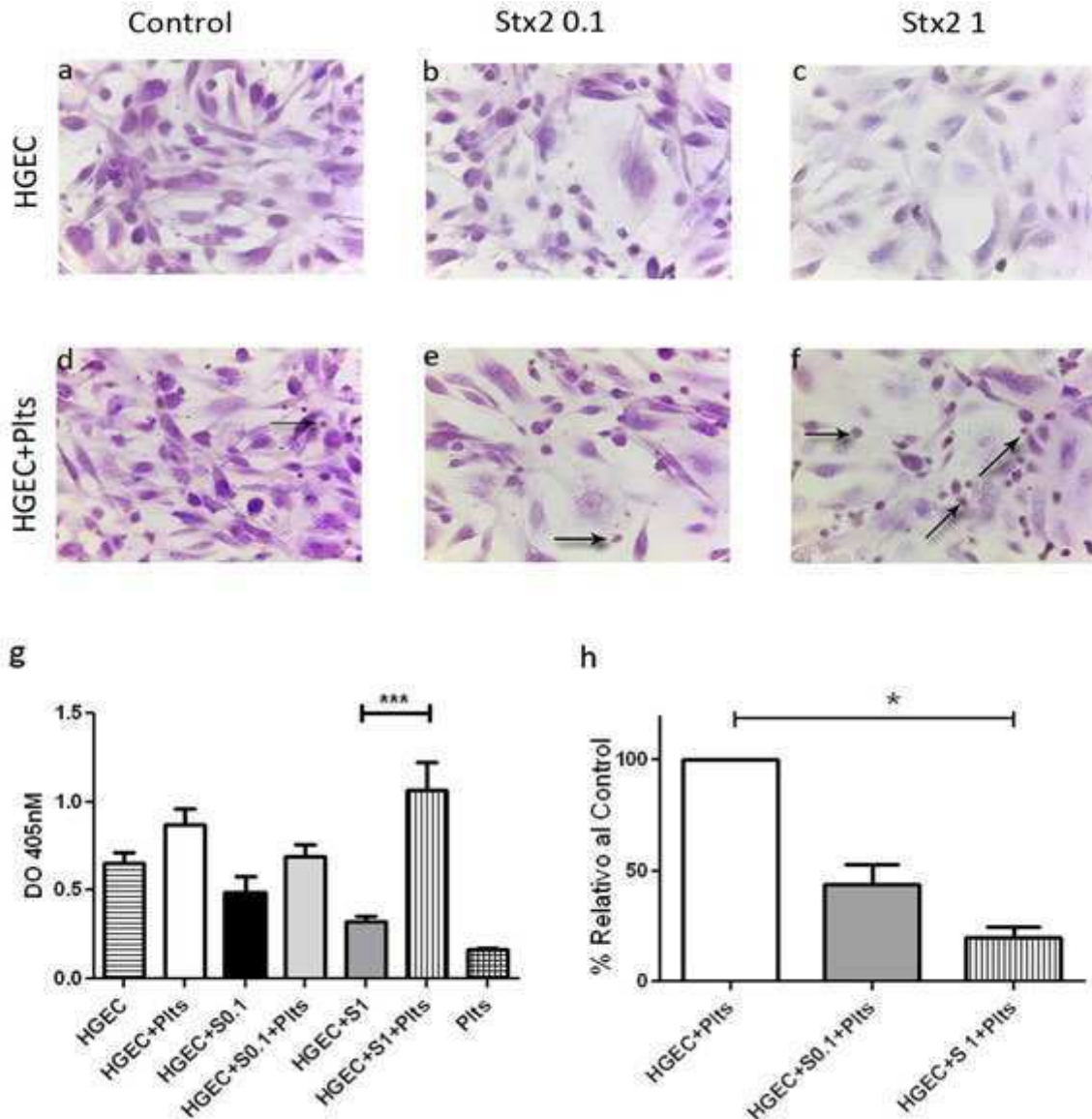


Figura 17. Adhesión de plaquetas a endotelio. Las células fueron cultivadas con o sin Stx2 (0.1 ng/ml ó 1 ng/ml) durante 24 horas, luego se agregaron las plaquetas y se incubaron durante 1 hora. Se realizó una tinción con H/E para observar las plaquetas adheridas a las HGEC. **a-f)** Fotografías representativas donde se pueden observar las plaquetas adheridas en las diferentes condiciones (40x). Las flechas señalan las plaquetas adheridas. La adhesión plaquetaria fue determinada además mediante dos métodos: **g.** Ensayo colorimétrico de fosfatasa ácida y **h.** Recuento de plaquetas recuperadas en el sobrenadante. Se muestra un gráfico de 5 experimentos independientes. Cada barra representa la Media±ESM para cada tratamiento. Los datos fueron analizados con el test de Kruskal-Wallis y el post-test Dunns. Para los datos relativizados se utilizó el test Wilcoxon signed Rank * $p < 0,05$; *** $p < 0,01$

4.2.3- Efecto del endotelio dañado por Stx2 en la liberación plaquetaria de sCD40L

A continuación, decidimos evaluar el efecto del endotelio dañado por Stx2 en la activación plaquetaria. Para esto, se decidió estudiar la liberación de sCD40L, ya que es un marcador de activación plaquetaria que además posee una función proinflamatoria. Se realizaron los cultivos antes mencionados, luego se recolectaron los sobrenadantes y se midieron los niveles de sCD40L mediante la técnica de ELISA.

Como se muestra en la **figura 18**, los sobrenadantes correspondientes a los cultivos de plaquetas con HGEC expuestas a Stx2 1 ng/ml, presentaron mayor concentración de sCD40L que los sobrenadantes provenientes de los cultivos de plaquetas con HGEC sin Stx2. Es decir solo las plaquetas que fueron expuestas a un endotelio dañado por Stx2 fueron capaces de liberar sCD40L. De acuerdo a lo esperado se confirmó que las HGEC tratadas con Stx2 no producen sCD40L, con lo cual los niveles registrados provienen únicamente de las plaquetas.

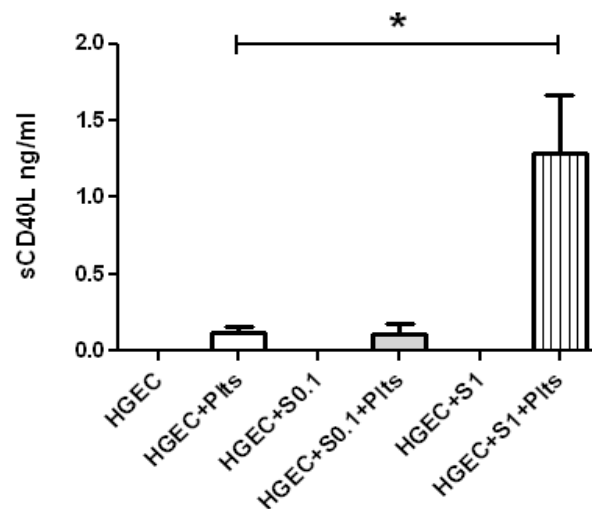


Figura 18. Liberación plaquetaria de sCD40L. Las células fueron cultivadas con o sin Stx2 durante 24 horas, luego se agregaron las plaquetas, se incubaron durante 1 hora y se recogieron los sobrenadantes. La concentración de sCD40L en los mismos fue determinada mediante la técnica de ELISA. Se muestra un gráfico de 5 experimentos independientes. Cada barra representa la Media \pm ESM para cada tratamiento. Los datos fueron analizados con el test de Kruskal-Wallis y el post-test Dunns * $p < 0,05$.

4.2.4- Efecto directo de Stx2 en la liberación plaquetaria de sCD40L

A continuación, decidimos evaluar si Stx2 tiene la capacidad de activar directamente a las plaquetas. Para esto plaquetas humanas purificadas, fueron estimuladas o no con Stx2 1ng/ml, durante 1 hora. Como control positivo se utilizó trombina (0,2 U/ml). A continuación se recolectaron los sobrenadantes y se midieron los niveles de sCD40L mediante la técnica de ELISA.

Como se observa en la **figura 19**, los sobrenadantes provenientes de plaquetas estimuladas con Stx2, no presentaron diferencias significativas en los niveles de sCD40L respecto de los sobrenadantes de plaquetas sin estimular, sugiriendo que Stx2 no ejerce un efecto directo sobre las plaquetas.

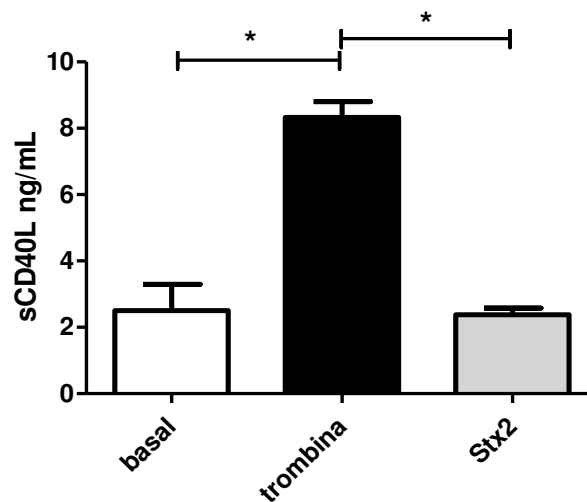


Figura 19. Producción plaquetaria de sCD40L. Las plaquetas fueron estimuladas o no con Stx2 durante 1 hora. Se recogieron los sobrenadantes y se determinó la concentración de sCD40L mediante la técnica de ELISA. Se muestra un gráfico de 3 experimentos independientes. Cada barra representa la Media±ESM para cada tratamiento. Los datos fueron analizados con el test de Kruskal-Wallis y el post-test Dunns *p<0,05.

4.2.5- Efecto de NAC sobre el daño endotelial inducido por Stx2

Teniendo en cuenta que el tratamiento *in vivo* con el agente antioxidante NAC tuvo efectos preventivos en la activación de la respuesta trombótica inducida por Stx2. Se decidió evaluar sus efectos en el modelo *in vitro*.

En primer lugar evaluamos si NAC protegía al endotelio del daño por Stx2. Para esto, se cultivaron las HGEC con o sin Stx2 utilizando solo la concentración de 1 ng/ml, debido a

que fue la dosis con la que se encontraron diferencias significativas respecto al control, tanto en la viabilidad de las HGEC, como en la adhesión y activación plaquetaria.

La NAC (1mM) fue agregada en el mismo momento que Stx2. A continuación, se realizó una tinción con H/E y se evaluó la viabilidad por el ensayo de citotoxicidad con rojo neutro.

Como se muestra en la **figura 20d**, el tratamiento con NAC y Stx2 no presenta diferencias significativas en la viabilidad celular respecto al tratamiento solo con Stx2, lo cual demuestra que NAC no tiene un efecto protector sobre el daño endotelial causado por Stx2. En la **figura 20 a-c** se muestran fotografías representativas correspondientes a cada tratamiento y se puede observar un menor número de células adheridas en ambos tratamientos con Stx2.

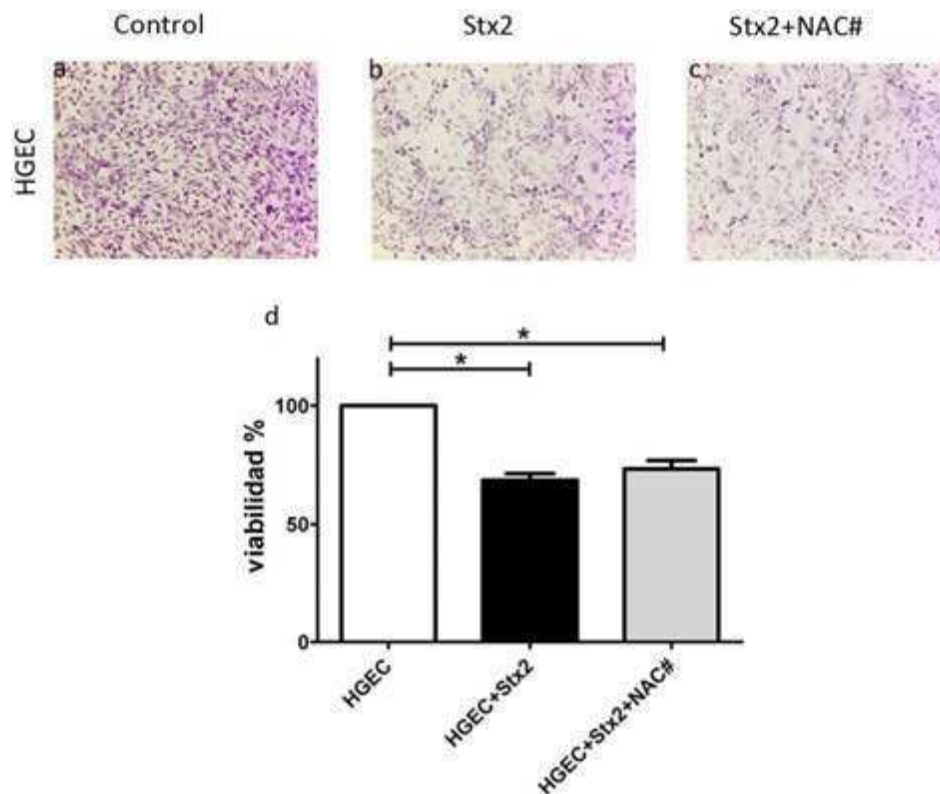


Figura 20. Citotoxicidad de Stx2 sobre el endotelio. Las células fueron cultivadas con o sin Stx2 (1 ng/ml) durante 24 horas. La NAC fue agregada en el mismo momento que Stx2 (NAC#). Se realizó una tinción con H/E para observar el daño endotelial. También se midió la citotoxicidad por la tinción con rojo neutro. **a-c)** Fotografías representativas donde se observa el daño endotelial en las diferentes condiciones (10x). **d.** Gráfico que muestra la viabilidad celular determinada por el ensayo con rojo neutro. El 100% de viabilidad corresponde a la DO registrada para el control de HGEC sin tratar. Cada barra representa la Media±ESM para cada tratamiento (n=5). Los datos fueron analizados con el test de ANOVA y el post-test Bonferroni *p<0,05.

4.2.6.- Efecto de NAC sobre la adhesión plaquetaria inducida por Stx2

Con el objetivo de estudiar el efecto de NAC sobre la adhesión de las plaquetas al endotelio dañado por Stx2, se realizaron los cultivos mencionados anteriormente. Se probaron dos tiempos de tratamiento con NAC: en el primero se agregó la NAC en el mismo momento que Stx2 y en el segundo se agregó la NAC 1 hora antes de incorporar las plaquetas. Luego se determinó la adhesión plaquetaria por el ensayo colorimétrico de la fosfatasa ácida y se realizó una tinción con H/E para poder observar directamente las plaquetas adheridas sobre las HGEC.

En la **figura 21a-f**, se muestran fotografías representativas correspondientes a cada tratamiento y se pueden observar las plaquetas adheridas (flechas) en los tratamientos con Stx2. A simple vista se observa que el tratamiento con NAC no redujo la adhesión de las plaquetas a las HGEC.

En la **figura 21g**, como ya fue mostrado en la **figura 17**, se observa que la Stx2 aumenta la adhesión plaquetaria, evidenciada por un aumento en la actividad de fosfatasa ácida, aunque ninguno de los tratamientos con NAC modifican dicho parámetro.

En conclusión, la NAC no tiene ningún efecto sobre la adhesión plaquetaria, secundaria al daño endotelial mediado por Stx2, en ninguno de los dos tiempos de tratamiento.

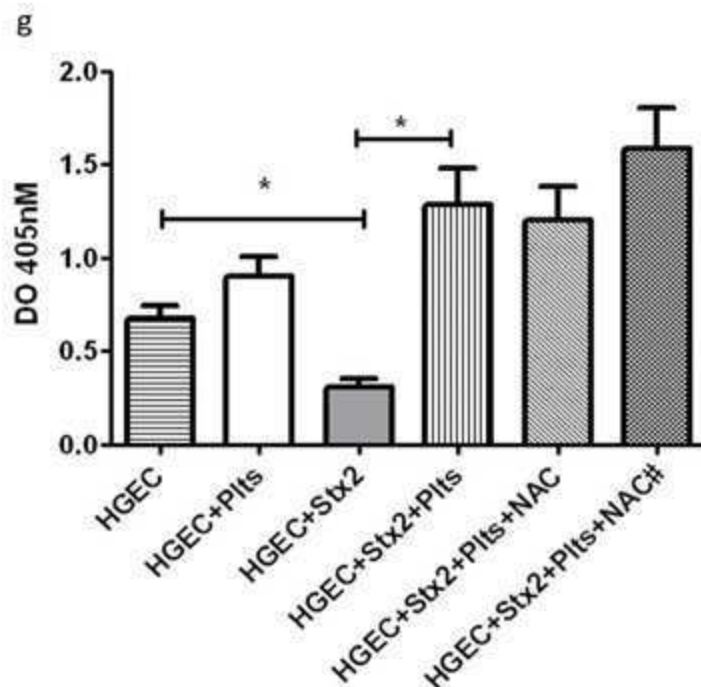
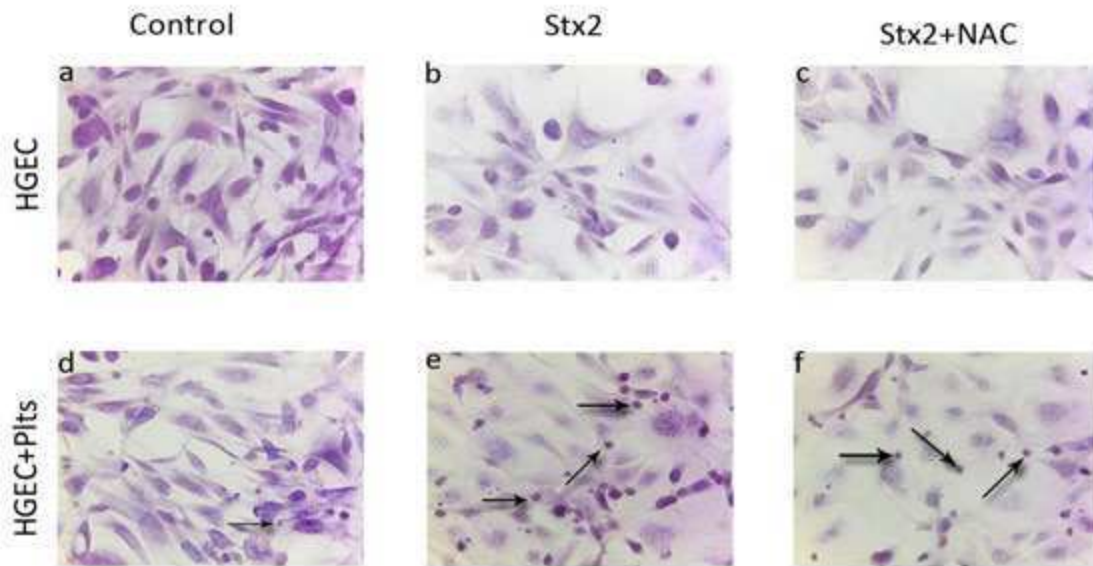


Figura 21. Adhesión de plaquetas a endotelio. Las células fueron cultivadas con o sin Stx2 (1 ng/ml) durante 24 horas, luego se agregaron las plaquetas (Plts) y se incubaron durante 1 hora. La NAC fue agregada 1 hora previa a la incorporación de las plaquetas (NAC) o 24 hs antes, en simultáneo con Stx2 (NAC#). Se realizó una tinción con H/E para observar las plaquetas adheridas a las HGEC. **a-h.** Fotografías representativas donde se pueden observar las plaquetas adheridas en las diferentes condiciones (40x). Las flechas señalan las plaquetas adheridas. **i.** La adhesión plaquetaria fue determinada mediante el ensayo colorimétrico de fosfatasa ácida. Se muestra un gráfico de 5 experimentos independientes. Cada barra representa la Media±ESM para cada tratamiento. Los datos fueron analizados con el test de Kruskal-Wallis y el post-test Dunns * $p < 0,05$.

4.2.7- Efecto de NAC sobre la liberación plaquetaria de sCD40L

Teniendo en cuenta que NAC no fue capaz de modular la adhesión de plaquetas al endotelio, dañado por Stx2, se decidió evaluar entonces si tenía algún efecto sobre la liberación plaquetaria de sCD40L. Para esto, se realizaron los cultivos antes mencionados, luego se obtuvieron los sobrenadantes y se determinó la concentración de sCD40L mediante la técnica de ELISA.

Como se observa en la **figura 22**, los sobrenadantes correspondientes al tratamiento con NAC, 1 hora antes de agregar las plaquetas, presentaron niveles de sCD40L significativamente menores que los presentes en los sobrenadantes obtenidos en las mismas condiciones pero sin NAC (plaquetas incubadas con HGEC expuestas a Stx2).

Los sobrenadantes correspondientes al tratamiento con NAC, agregada en simultáneo con Stx2, no presentaron diferencias significativas en los niveles de sCD40L con respecto a los sobrenadantes provenientes del tratamiento solo con Stx2.

En conjunto estos resultados sugieren que NAC fue capaz de prevenir la liberación de sCD40L por plaquetas expuestas a un endotelio dañado por Stx2. El hecho de que el tratamiento de las HGEC con NAC y Stx2 en simultáneo, no afectara la liberación de sCD40L, sugiere que la NAC estaría actuando sobre las plaquetas y no sobre el endotelio.

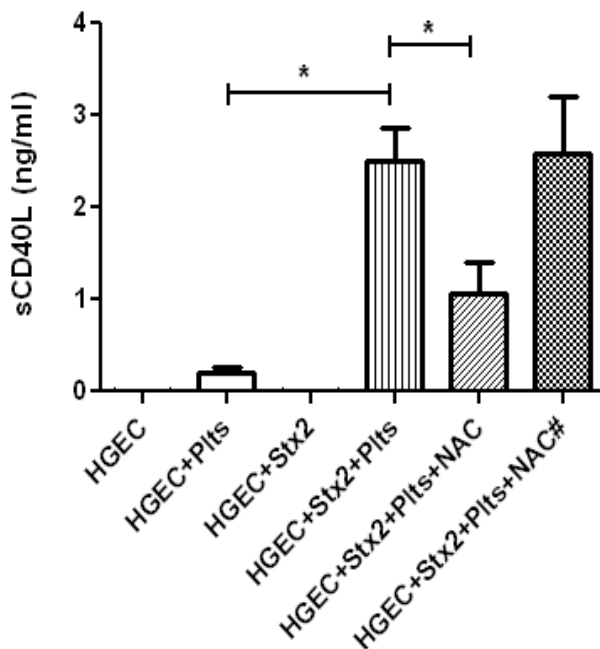


Figura 22. Liberación plaquetaria de sCD40L. Las células fueron cultivadas con o sin Stx2 (1 ng/ml) durante 24 horas, luego se agregaron las plaquetas (Plts), se incubaron durante 1 hora y se recogieron los sobrenadantes. La NAC fue agregada 1 hora previo a la incorporación de las plaquetas (NAC) o junto con Stx2 (NAC#). La concentración de sCD40L en los mismos fue determinada mediante la técnica de ELISA. Se muestra un gráfico de 5 experimentos independientes. Cada barra representa la Media±ESM para cada tratamiento. Los datos fueron analizados con el test de Kruskal-Wallis y el post-test Dunns *p<0,05.

4.3- Estudios en pacientes con SUH

4.3.1- Niveles plasmáticos de sCD40L en pacientes con SUH

Una vez que encontramos *in vitro*, que el daño endotelial mediado por la Stx2 tiene como consecuencia la liberación de sCD40L por plaquetas, decidimos estudiar los niveles plasmáticos de sCD40L en pacientes con SUH. Para cumplir este objetivo, se recolectaron plasmas de pacientes con SUH en el momento agudo de la enfermedad, los cuales se clasifican según su gravedad prospectiva de acuerdo a los días de diálisis a que fueron sometidos [1]. Cabe destacar que los pacientes de grado 1 y 2 fueron considerados como un solo grupo debido a las similitudes que presentan en la clínica y al escaso número de muestra de pacientes de grado 2 que pudimos obtener.

Los niveles de sCD40L se determinaron mediante la técnica de ELISA.

Como se puede apreciar en la **figura 23**, se encontró que los pacientes con SUH de grado 1 y 2 tienen niveles plasmáticos de sCD40L significativamente mayores que los individuos sanos, sin embargo los pacientes de grado 3 no presentan diferencias significativas con los individuos sanos.

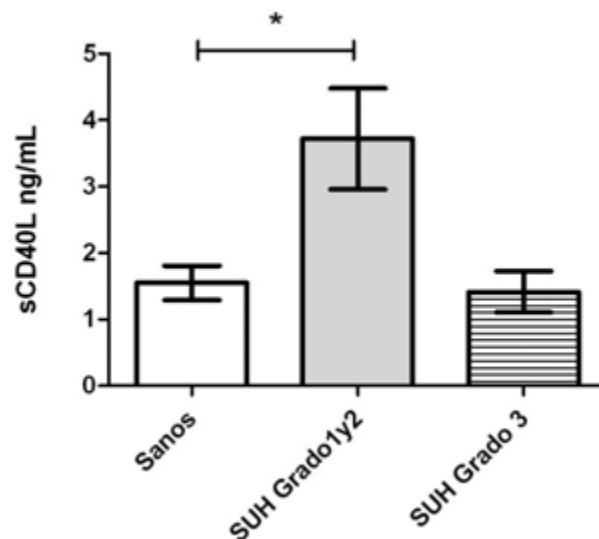


Figura 23. Niveles plasmáticos de sCD40L. El plasma perteneciente a individuos sanos y con SUH fue utilizado para determinar la concentración de sCD40L mediante ELISA. Los pacientes fueron clasificados según el criterio de Gianantonio et.al. Cada barra representa la Media±ESM de 10-15 individuos/grupo. Los datos fueron analizados con el test de Kruskal-Wallis y el post-test Dunns *p<0,05

A continuación se procedió a analizar la existencia de correlaciones entre los niveles plasmáticos de sCD40L observados en los niños con SUH y ciertos parámetros clínicos. Los datos clínicos de los pacientes analizados, categorizados según la severidad de la enfermedad, se muestran en la tabla 1.

	Severidad de la disfunción renal	
	Grado 1 y 2 (n=13)	Grado 3 (n=10)
Parámetros generales		
Edad (meses)	52,13±17,89	32,86±7,968
Días desde la diarrea *	4,7±0,8	6,5±0,5
Parámetros sanguíneos y renales		
Plaquetas (x µl)	88750±20118	54875±10807
Leucocitos (x 10 ⁹ /L)	15,1±2,4	18,7±2,7
Hematocrito	23,7±1,5	22,7±1,1
Urea (mg%)	91,3±13,7	295,3±30,7
Creatinina (mg%)	1,47±0,33	5,23±0,89

Tabla 1. Datos clínicos y bioquímicos de los pacientes con SUH. Los pacientes fueron clasificados en casos leves-moderados (Grado 1 y 2: entre 0 y 7 días de anuria) y casos severos (Grado 3: más de 7 días de anuria). Los datos representan la Media±ESM. * Se refiere al número de días entre el inicio de la diarrea y la recolección de la muestra de sangre.

4.3.2- Correlación entre niveles plasmáticos de sCD40L y el número de plaquetas circulantes.

Teniendo en cuenta que el 95 % del sCD40L proviene de plaquetas, se analizó la existencia de una correlación entre los niveles plasmáticos de sCD40L y el recuento plaquetario, en los pacientes con SUH. Si bien la correlación no resultó significativa, en la **figura 24** se observa que los pacientes presentan niveles de sCD40L aumentados respecto a los individuos sanos, incluso teniendo un reducido recuento de plaquetas circulantes. Lo cual refleja que las plaquetas pertenecientes a los niños con SUH sufren un proceso de activación *in vivo*, durante el cual liberan el contenido de sus gránulos y son reclutadas en los sitios de injuria (endotelio), abandonando así la circulación.

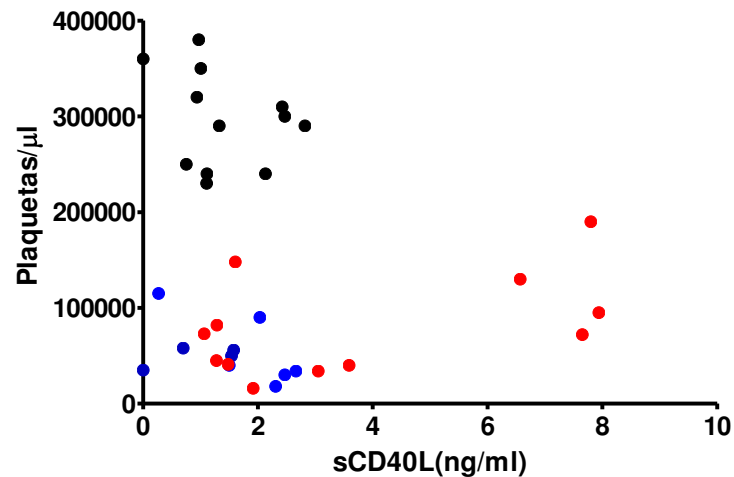


Figura 24. Correlación entre número de plaquetas circulantes y niveles plasmáticos de sCD40L. Cada punto representa un individuo independiente: SUH grado 1-2 (rojo), SUH grado 3 (azul), Sanos (negro). Los datos fueron analizados con el test no paramétrico Spearman.

4.3.3- Correlación entre niveles de sCD40L y niveles de urea y creatinina en plasma

Como se ha mencionado anteriormente, los niveles plasmáticos de urea y creatinina, se utilizan como un parámetro de daño renal. A continuación se estudió una posible correlación entre ambos parámetros y los niveles plasmáticos de sCD40L, en los pacientes con SUH.

Como se observa en la **figura 25**, se halló la existencia de una correlación negativa entre sCD40L y ambos parámetros de daño renal: urea y creatinina. Estos resultados sugieren que el pico de liberación de sCD40L sería un evento temprano en la infección con STEC, antes de que se produzcan las lesiones renales y luego podría desaparecer de la circulación, debido a la unión con su receptor, para ejercer sus efectos trombóticos e inflamatorios conocidos.

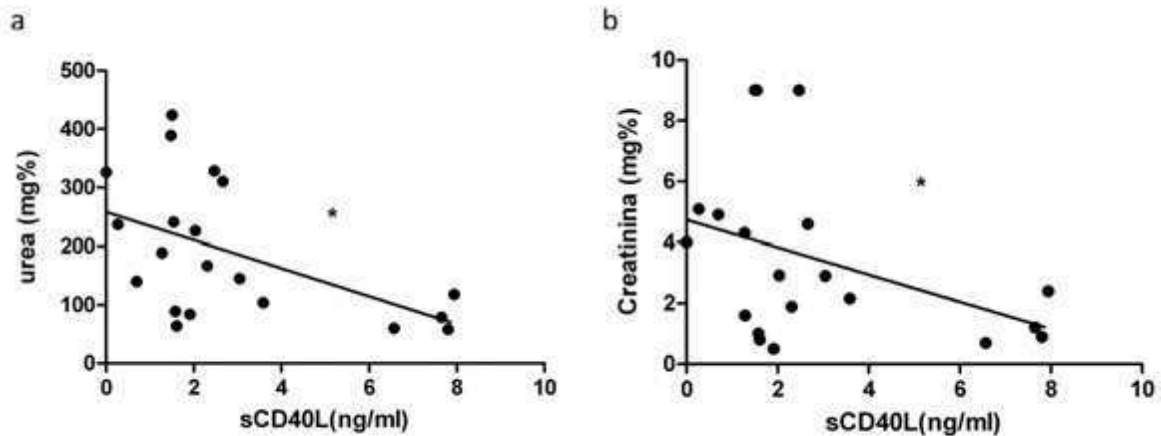


Figura 25. Correlación entre niveles de sCD40L y parámetros de daño renal. a. Correlación entre niveles de sCD40L y urea en plasma. b. Correlación entre niveles de sCD40L y creatinina en plasma. Cada punto representa un individuo independiente. Los datos fueron analizados con el test no paramétrico Spearman. * $p < 0,05$

4.3.4- Efectos de el plasma de pacientes con SUH sobre monocitos

A continuación se procedió a estudiar el efecto del plasma de pacientes con SUH, sobre monocitos obtenidos a partir de sangre periférica de dadores sanos. Se seleccionaron los plasmas que contenían altos niveles de sCD40L (mayor a 3 ng/ml), para luego evaluar su rol en tales efectos.

Para esto se purificaron leucocitos mononucleares de sangre periférica y se los incubó con plasmas de individuos sanos y con SUH. A continuación se determinó la expresión de FT y la producción de ROS. También se estudió la secreción de TNF- α e IL1- β .

4.3.4.1- Efecto del plasma de Pacientes con SUH en la producción de ROS (estallido respiratorio) por monocitos

Para determinar si el plasma de pacientes con SUH es capaz de inducir el estallido respiratorio en monocitos. Los mononucleares fueron incubados con plasma de pacientes con SUH, o plasma de individuos sanos durante 1 hora. Como control positivo se utilizó LPS (100ng/ml). La producción de ROS fue evaluada por citometría de flujo, mediante la marcación con DHR-123, que en presencia de H₂O₂, emite fluorescencia verde. El análisis de la producción de ROS en los monocitos (expresado como IMF) para cada tratamiento se

realizó sobre la región correspondiente a la población monocítica, determinada según tamaño y complejidad. Cabe destacar que la producción de ROS, fue determinada en respuesta directa a los tratamientos en estudio y también luego de la estimulación *in vitro* con PMA (100 ng/ml).

En la **figura 26** se muestra un dotplot representativo de leucocitos mononucleares, en donde se identificaron las diferentes poblaciones.

En la **figura 27** se puede observar que los monocitos incubados con plasma de pacientes con SUH tienen mayor producción de ROS que los incubados con plasma de individuos sanos. A su vez se observa que estos últimos no difieren significativamente de los monocitos incubados con RPMI. También se aprecia que la respuesta a la estimulación *in vitro* con PMA, se ve reducida en los monocitos tratados con plasma de pacientes con SUH, respecto de los incubados con plasma de individuos sanos, sugiriendo que estos se encontraban preactivados.

Teniendo en cuenta estos resultados podemos concluir que el plasma de paciente con SUH es capaz de inducir el estallido respiratorio en monocitos.

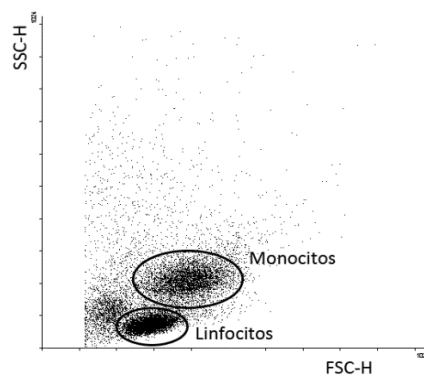


Figura 26. Dotplot correspondiente a leucocitos mononucleares. Se muestra un gráfico representativo, en el cual se diferencian poblaciones según tamaño (FSC-H) y complejidad (SSC-H). Se observan las poblaciones monocíticas y linfocíticas.

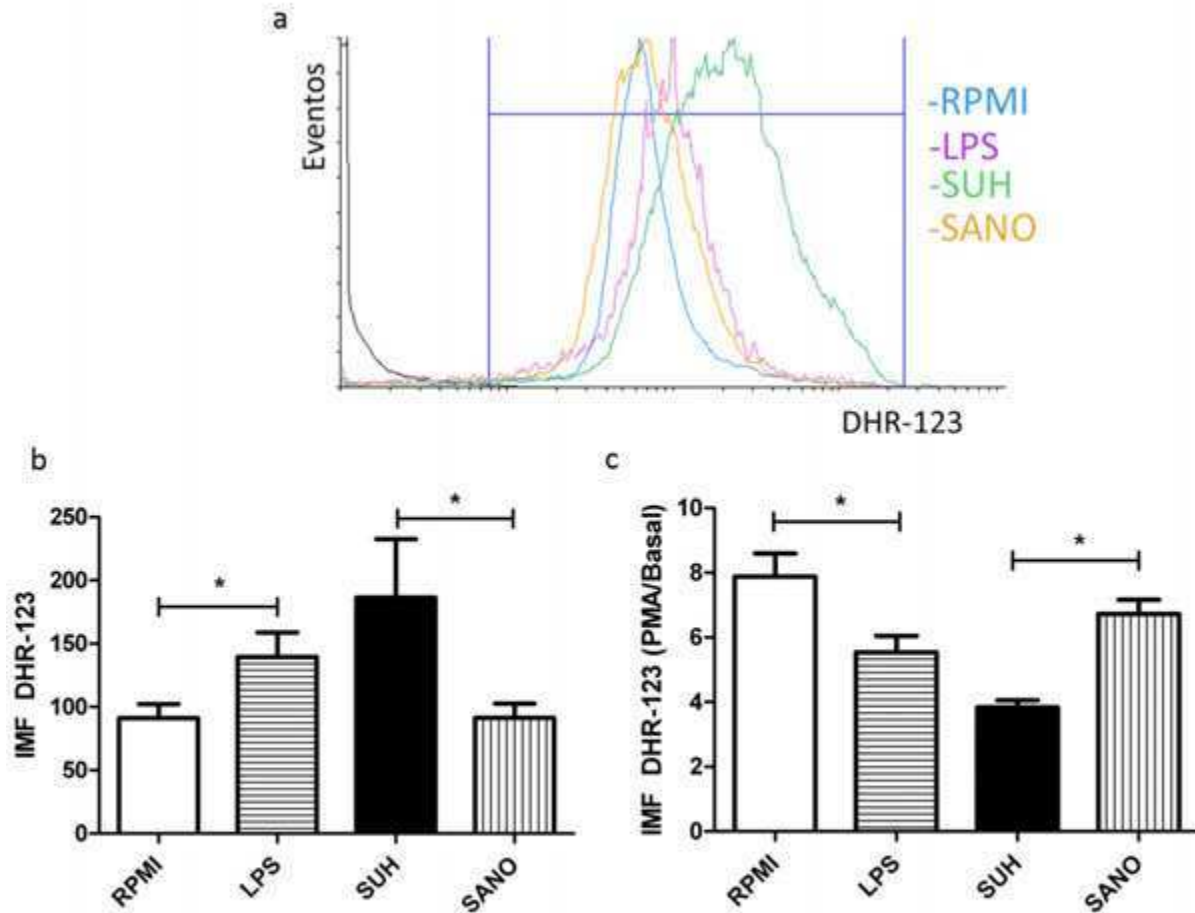


Figura 27. Producción de ROS por monocitos. Los leucocitos mononucleares fueron incubados con plasmas de pacientes con SUH o individuos sanos. El tratamiento con LPS (100ng/ml) fue realizado como control positivo. La producción de ROS se determinó por citometría de flujo marcando con DHR-123. **a.** Se muestra un histograma representativo correspondiente a la producción de ROS por monocitos sometidos a los distintos tratamientos. **b.** Gráfico que ilustra la IMF correspondiente a la producción de ROS por los monocitos incubados en las distintas condiciones. Cada barra representa la Media \pm ESM (n=6). **c.** Gráfico que muestra la respuesta oxidativa de los monocitos incubados en las distintas condiciones frente al estímulo *in vitro* (PMA 200 ng/ml). Cada barra representa la Media \pm ESM (n=6). Los datos fueron analizados por el test de Kruskal-Wallis seguido del post-test Dunns *p<0,05

4.3.4.2- Efecto del plasma de pacientes con SUH en la expresión de FT por monocitos

Con el objetivo de evaluar si el plasma de pacientes con SUH tiene algún efecto sobre la expresión del FT en monocitos, se incubaron mononucleares con plasmas de pacientes SUH y Sanos, durante toda la noche, luego se determinó la expresión de FT mediante citometría de flujo, marcando con un anticuerpo anti FT acoplado al fluoróforo PE. Se utilizó como control positivo LPS (100ng/ml).

Al igual que en el experimento anterior, la población monocítica fue identificada por tamaño y complejidad.

Como se observa en la **Figura 28 a y b**, los monocitos incubados con plasma de paciente con SUH, presentan mayor expresión de FT que los incubados con plasma de individuos sanos.

También, se evaluó la actividad del FT, registrando el tiempo que tardan los monocitos, sometidos a los distintos tratamientos, en inducir la coagulación de un plasma control (utilizado como fuente de los factores de coagulación). A menor tiempo registrado mayor actividad procoagulante. La coagulación fue determinada mediante turbidez, registrada en un espectrofotómetro a 450 nm.

De manera similar a lo encontrado midiendo la expresión de FT por citometría, la actividad procoagulante de los monocitos incubados con plasma de pacientes también fue mayor (**figura 28c y d**), comparado con aquellos incubados con plasma de individuos sanos, ya que se registró un tiempo de coagulación menor. Cabe mencionar que el plasma de individuos sanos no ejerce un efecto diferente del observado para el tratamiento control con RPMI.

Estos resultados permiten concluir que el plasma de paciente con SUH es capaz de inducir en monocitos, la expresión de FT y que este se encuentra funcionalmente activo.

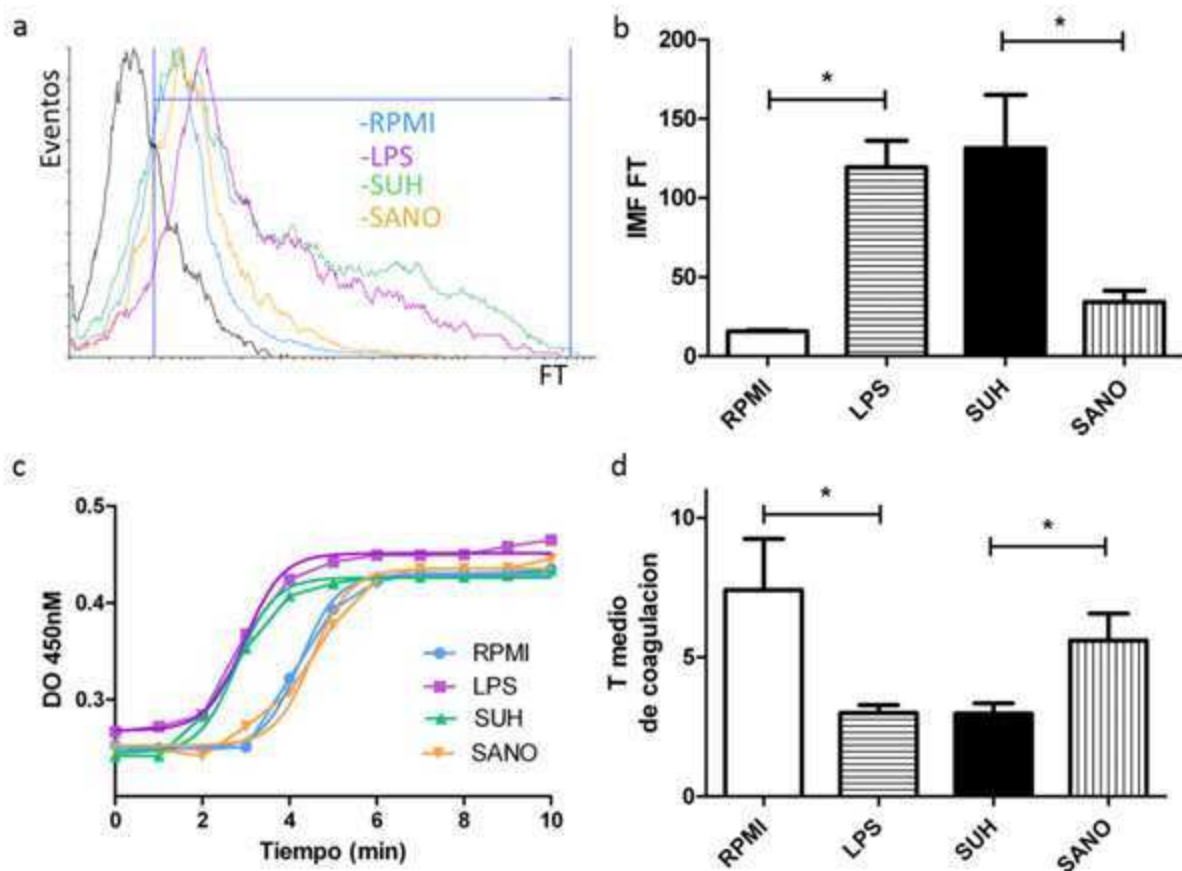


Figura 28. Expresión de FT en monocitos. Los leucocitos mononucleares fueron incubados con plasmas de pacientes con SUH o individuos sanos. El tratamiento con LPS (100ng/ml) fue realizado como control positivo. La expresión de FT se determinó por citometría de flujo marcando con un anticuerpo acoplado a PE dirigido contra FT. **a.** Se muestra un histograma representativo correspondiente a la expresión de FT en monocitos sometidos a los distintos tratamientos. **b.** Gráfico que ilustra la IMF correspondiente al FT expresado por los monocitos. Cada barra representa la Media±ESM (n=8). La actividad se determinó por el tiempo necesario para promover la coagulación de un plasma control. **c.** Se muestra un gráfico representativo en el cual se observan las curvas de coagulación obtenidas para los monocitos con distintos tratamientos. **d.** Gráfico que muestra los tiempos medios de coagulación registrados para cada tratamiento. Cada barra representa la Media±ESM (n=8). Los datos fueron analizados por el test de Kruskal-Wallis seguido del post-test Dunns *p<0,05. El tiempo medio de coagulación fue calculado a partir de dichas curvas.

4.3.5- Participación de sCD40L presente en plasma de pacientes con SUH en los efectos observados sobre monocitos

4.3.5.1-Depleción de sCD40L en plasmas de pacientes con SUH e individuos sanos

Como se mencionó anteriormente, el segundo objetivo de este trabajo fue estudiar la participación de sCD40L presente en el plasma de paciente con SUH, en los efectos observados sobre los monocitos.

Para esto, los plasmas, tanto de pacientes como de individuos sanos, fueron depletados de sCD40L, incubándolos durante 2 horas en placas sensibilizadas con un anticuerpo anti CD40L. Para corroborar que la depleción fue correcta, la concentración de sCD40L en los plasmas depletados y sin depletar fue determinada mediante la técnica de ELISA.

En la **figura 29** se aprecian los niveles de sCD40L en ambos grupos de plasmas depletados o no de sCD40L, confirmando dicha depleción.

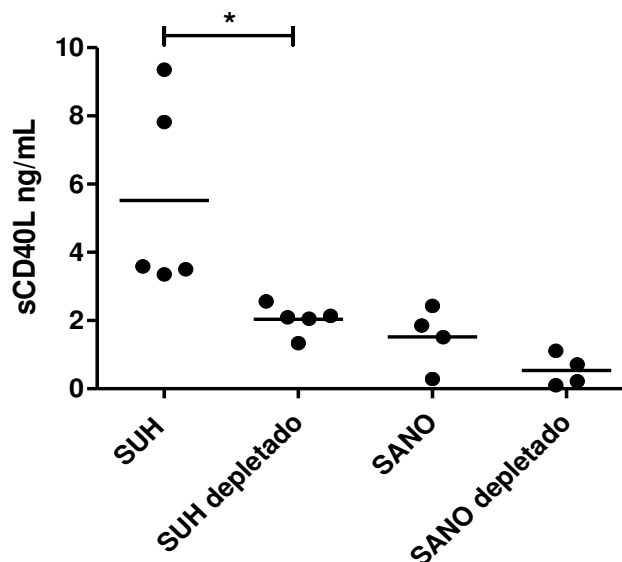


Figura 29. Depleción de sCD40L. El plasma perteneciente a individuos sanos y con SUH fue depletado o no de sCD40L, utilizando placas sensibilizadas con un anticuerpo anti CD40L. Luego fueron testeados por ELISA. Cada punto representa un plasma individual y la línea horizontal representa la Media (n=4-5 plasmas/grupo). Los datos fueron analizados con el test apareado Wilcoxon signed Rank *p<0,05

4.3.5.2- Rol de sCD40L presente en el plasma de pacientes con SUH sobre la producción de ROS (estallido respiratorio) en monocitos

A continuación se quiso estudiar la participación del sCD40L, en el estallido respiratorio inducido en monocitos, por el plasma de pacientes con SUH. Para esto, se incubaron mononucleares con plasmas de pacientes con SUH ó individuos sanos, depletados o no para sCD40L, durante 1 hora. La producción de ROS fue evaluada por citometría de flujo, mediante la marcación con DHR-123.

Como se puede apreciar en la **figura 30**, los monocitos tratados con plasmas de pacientes con SUH, depletados para sCD40L, tuvieron una producción de ROS significativamente reducida, que los incubados con plasma de paciente sin depletar (**figura 30b**). Paralelamente, no se observan diferencias significativas entre los tratamientos con plasma de sanos depletados y sin depletar.

También se ve que la respuesta a la estimulación *in vitro* con PMA, esta aumentada en los monocitos tratados con plasma SUH depletados de sCD40L (**figura 30c**), respecto de los tratados con plasma SUH sin depletar. Esto sugiere que en ausencia de sCD40L, los monocitos se encuentran menos activados y tienen una mayor capacidad de respuesta al estímulo *in vitro*.

En conjunto estas observaciones permiten concluir que la producción de ROS por monocitos, inducida por el plasma de paciente con SUH, es mediada al menos por sCD40L, ya que en ausencia del mismo el estallido respiratorio se ve reducido. Probablemente haya otros factores, presentes en el plasma de pacientes con SUH, que también estén contribuyendo a este proceso.

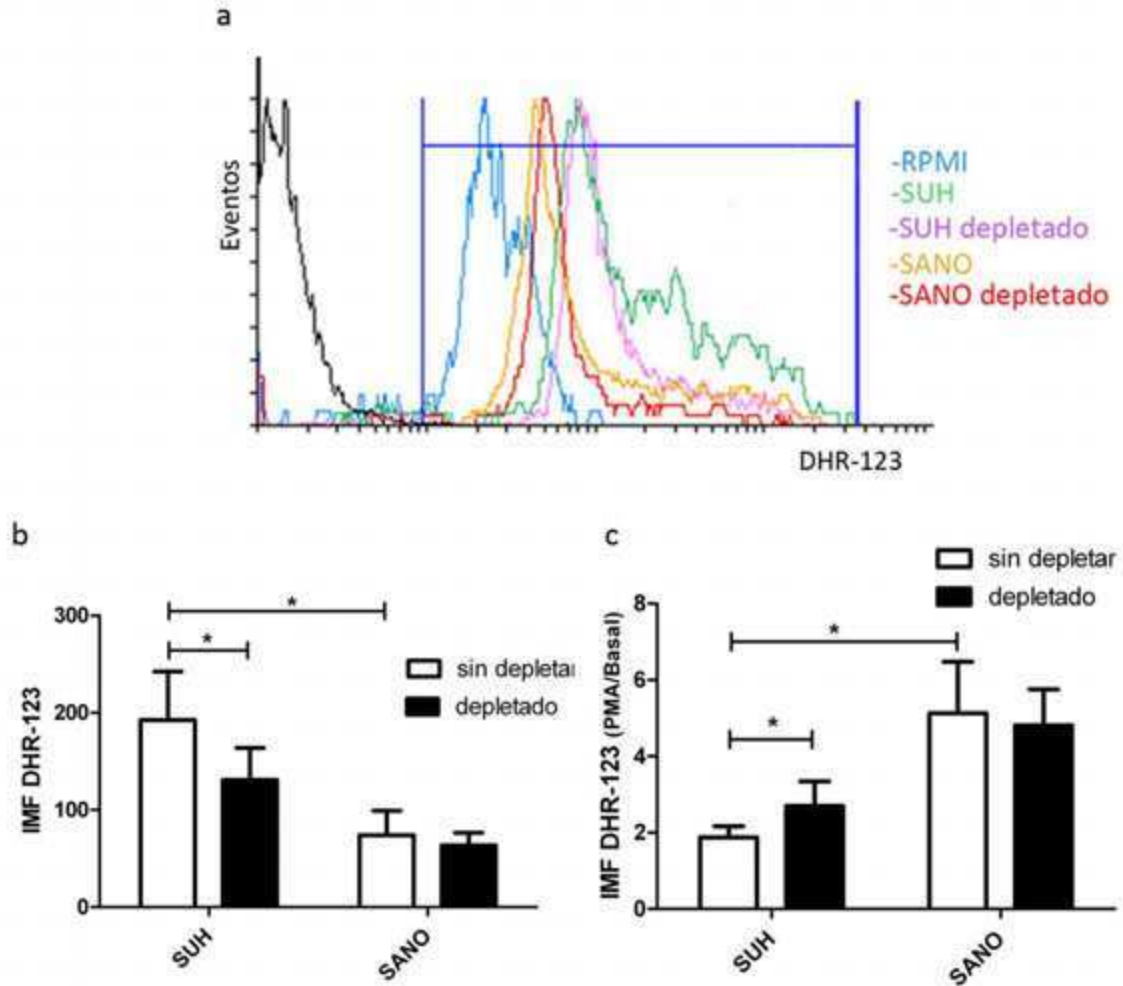


Figura 30. Producción de ROS por monocitos. Los mononucleares fueron incubados con plasmas de pacientes con SUH o individuos sanos, depletados o no para sCD40L. La producción de ROS se determinó por citometría de flujo marcando con DHR-123. **a.** Se muestra un histograma representativo correspondiente a la producción de ROS por monocitos sometidos a los distintos tratamientos. **b.** Gráfico que ilustra la IMF correspondiente a la producción de ROS por los monocitos. Cada barra representa la Media \pm ESM (n=6). **c.** Gráfico que muestra la respuesta oxidativa de los monocitos al estímulo *in vitro* (PMA 200 ng/ml). Cada barra representa la Media \pm ESM (n=6). Los datos fueron analizados con el test apareado Wilcoxon signed Rank* $p < 0,05$

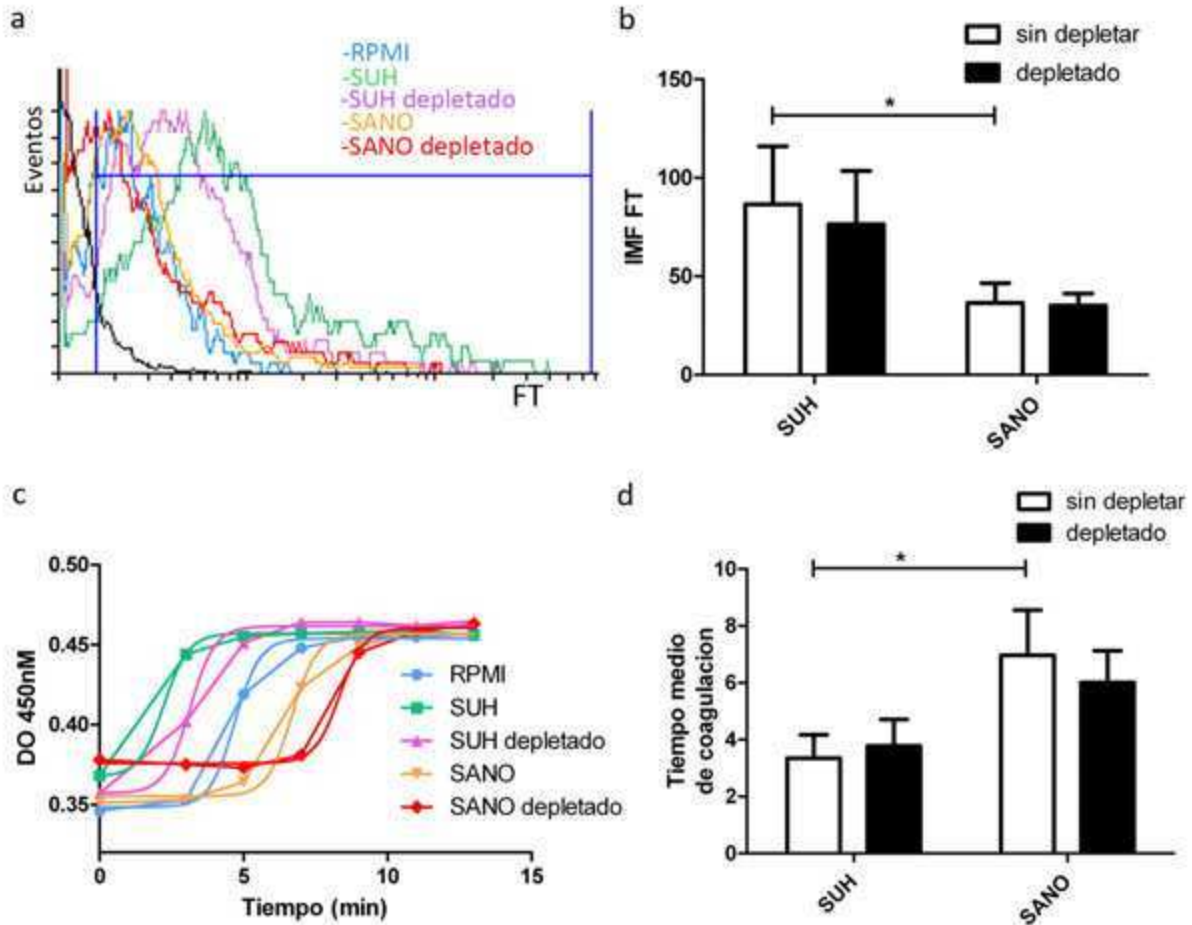
4.3.5.3- Rol de sCD40L presente en el plasma de pacientes con SUH sobre la expresión de FT en monocitos

Con el objetivo de identificar si la expresión de FT inducida por el plasma de pacientes con SUH, está mediada por sCD40L, se incubaron mononucleares con plasmas de pacientes ó individuos sanos, depletados o no de sCD40L. A continuación se evaluó la expresión de FT, de la misma manera que se describió antes.

En la **figura 31** se puede ver que, los monocitos tratados con los plasmas de pacientes con SUH, depletados de sCD40L, no presentaron una expresión de FT significativamente menor que los incubados con plasma de pacientes sin depletar. Con respecto a la actividad del FT, tampoco se observaron diferencias significativas en el tiempo de coagulación, entre los monocitos incubados con los plasmas SUH depletados o no de sCD40L.

Los tratamientos con plasma de individuos sanos, depletados o no, no presentaron diferencias significativas ni en la expresión de FT, ni en su actividad

Estos resultados dan cuenta que sCD40L no es al menos el principal responsable de la inducción de la expresión de FT en los monocitos, ya que la ausencia del mismo no provoca que el efecto se revierta. Solo se observa una leve disminución de dicha expresión, sugiriendo que hay otros factores presentes en el plasma de pacientes con SUH que estarían ejerciendo mayoritariamente tal efecto.



4.3.5.4- Rol de sCD40L, presente en el plasma de pacientes con SUH, sobre la liberación de IL1- β y TNF- α por monocitos.

Las citoquinas proinflamatorias, IL1- β y TNF- α , tienen gran relevancia en el SUH, ya que son capaces de estimular la producción de Gb₃ y por lo tanto sensibilizar al endotelio para los efectos tóxicos de Stx2. Considerando que los monocitos son la principal fuente de producción de estas citoquinas y teniendo en cuenta nuestro hallazgo de que sCD40L induce el estallido respiratorio en los mismos, se quiso estudiar si también era capaz de inducir la liberación de dichas citoquinas proinflamatorias. Para esto, se midieron los niveles de IL1- β y TNF- α presentes en los sobrenadantes de los cultivos de mononucleares que detallamos anteriormente, mediante la técnica de ELISA.

En la **figura 32** se puede ver que los mononucleares incubados con plasma de pacientes con SUH tuvieron una mayor liberación de TNF- α que los incubados con plasma de sanos. Sin embargo, no se observan diferencias significativas al depletar a los plasmas SUH de sCD40L. Esto da cuenta que el efecto no es producido por el mismo.

Con respecto a la liberación de IL1- β , no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos con plasmas SUH y sano. Pero si respecto al control con RPMI, sugiriendo que ambos plasmas fueron capaces de estimular la producción la misma.

Cabe destacar que los sobrenadantes analizados pertenecen a leucocitos mononucleares, que agrupa dos poblaciones, los linfocitos y los monocitos. Consideramos que los niveles detectados para ambas citoquinas corresponden mayoritariamente a la población de monocitos, ya que la producción de estas citoquinas por los linfocitos es considerablemente menor, con lo cual su aporte a los niveles finales presentes en los sobrenadantes podría ser casi despreciable. De todas maneras podemos concluir que sCD40L no sería el responsable de la secreción de ninguna de las dos citoquinas.

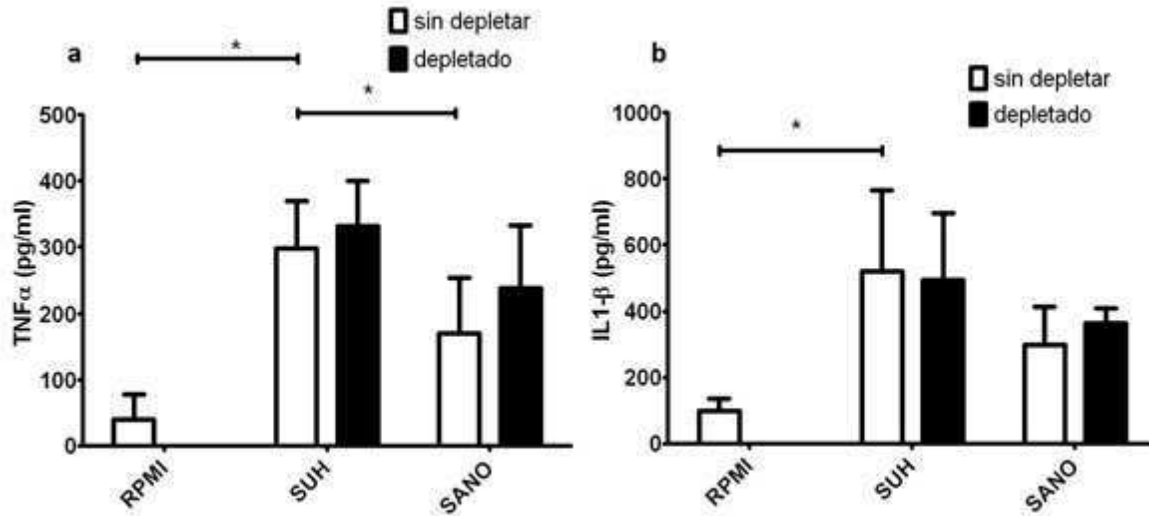


Figura 32. Liberación de citoquinas proinflamatorias IL1-β y TNF-α por monocitos. Los mononucleares fueron incubados en plasma de pacientes con SUH o individuos sanos, depletados o no para sCD40L. A las 24 horas se recolectaron los sobrenadantes y se determinó la concentración de citoquinas mediante la técnica de ELISA. **a.** Se muestra el gráfico correspondiente a la concentración de IL1-β, presente en los sobrenadantes de los mononucleares, sometidos a los distintos tratamientos. Cada barra representa la Media±ESM (n=9). **b.** Gráfico correspondiente a la concentración de TNF-α, presente en los sobrenadantes de los mononucleares, sometidos a los distintos tratamientos. Cada barra representa la Media±ESM (n=9). Las comparaciones entre RPMI, SUH y SANO (sin depletar) fueron realizadas por el test de Kruskal-Wallis seguido del post-test Dunns *p<0,05. Las comparaciones entre plasmas depletados y sin depletar fueron realizadas por el test apareado Wilcoxon signed Rank

Discusión

5- Discusión

Uno de los principales hallazgos de este trabajo fue demostrar que la activación de la respuesta trombótica, en el modelo murino de SUH por inoculación e.v. de Stx2, está estrechamente asociada con la activación de la respuesta inflamatoria.

En efecto, los principales parámetros que indican activación de la respuesta trombótica en los animales tratados con una dosis letal 100 % de Stx2 son: el aumento en la unión de fibrinógeno a la plaqueta, la reducida respuesta plaquetaria a la estimulación con dos agonistas (ADP y trombina) y la disminución en el número de plaquetas circulantes.

Además, hemos tratado de determinar si la activación de las plaquetas inducida por Stx2 contribuye a la activación de la respuesta inflamatoria a través de la formación de complejos plaqueta-PMN, la activación del sistema del complemento y la liberación plaquetaria de sCD40L.

En primer lugar, hemos encontrado que Stx2 induce, directa o indirectamente, la formación de complejos plaquetas-PMN en el modelo *in vivo*. Este hallazgo es consistente con estudios previos *in vitro* donde se reportó la formación de complejos plaquetas-leucocitos en sangre entera humana estimulada con Stx2 [99], además en pacientes con SUH se observó un mayor número de complejos plaquetas-leucocitos circulantes, durante la fase aguda de la enfermedad, en comparación con el número que presentaban después de su recuperación [169]

Bajo circunstancias normales las plaquetas y los leucocitos circulantes no interactúan entre sí. El aumento en estas interacciones ocurre *in vivo* durante los procesos de enfermedades vasculares, tales como angina inestable, infarto agudo de miocardio y accidente cerebrovascular (ACV) [264], diabetes [265], así como durante procedimientos quirúrgicos vasculares como el bypass cardiopulmonar [264] y la cirugía de la válvula aórtica [266]. El primer contacto es reversible y está mediado por selectinas, como la P-selectina, presente en la plaqueta activada [267, 268]. Este proceso es continuado por una adhesión firme, altamente selectiva mediada por integrinas [269], pero solo ocurre si hubo activación de integrinas en los PMN, por otras sustancias como el factor activador de plaquetas (PAF) [163] y ciertas quimioquinas [270]. La adhesión firme de PMN sobre

plaquetas, involucra principalmente la integrina CD11b/CD18 en PMN y la GPIIb/IIIa en plaquetas a través de su ligando en común, el fibrinógeno [163, 271]. La formación de estos agregados juega un papel importante en la iniciación de la trombogénesis y la inflamación [164].

En el SUH, la funcionalidad tanto de las plaquetas como de los PMN se encuentra alterada. Además de que hemos hallado un aumento en la formación de complejos plaqueta-PMN en el modelo murino de SUH, también hemos demostrado indirectamente la presencia de P-selectina en plaquetas de ratones tratados con Stx2. Si bien no encontramos un aumento en la expresión de P-Selectina sobre las plaquetas frescas, obtenidas a partir de ratones tratados con Stx2, a ninguno de los tiempos estudiados, las mismas tuvieron una menor expresión luego de un estímulo *in vitro*, sugiriendo que sufrieron el proceso de degranulación *in vivo*. El hecho de no haberla detectado en las plaquetas frescas de los ratones tratados con Stx2, puede explicarse según estudios previos que reportan que la expresión de P-selectina sobre las plaquetas, es seguida rápidamente por su clivaje, produciendo un fragmento de P-selectina soluble de 100 kD [272]. El aumento de los niveles de P-selectina soluble se ha descrito para varias enfermedades tales como: accidente cerebrovascular isquémico, aterosclerosis, hipertensión, púrpura trombocitopenica trombótica, eclampsia, enfermedades tromboembólicas, malaria, diabetes y también en SUH [95, 273-281]. La significancia biológica del clivaje y pérdida de la P-selectina, es volver menos adhesivas a las plaquetas activadas en circulación. Por otro lado, durante una lesión vascular severa se produce la degranulación masiva de plaquetas y se generan localmente grandes cantidades de P-selectina soluble. Esta forma soluble se une funcionalmente a los leucocitos a través de su ligando PSGL-1 [282, 283], resultando en una unión inhibitoria para el PMN. Con lo cual su papel podría ser doble: primero, podría disminuir la activación de PMN [284] e inhibir el reclutamiento excesivo de leucocitos, mediante la inhibición de la adhesión al endotelio. Paralelamente, podría inhibir el "Rolling" de plaquetas quiescentes sobre la P-selectina endotelial [285] y así prevenir el reclutamiento exacerbado de plaquetas al trombo en formación.

Teniendo en cuenta que la interacción entre el PMN y la plaqueta se produce en primer instancia por la unión de P-selectina, con su ligando PSGL-1 constitutivamente presente en PMN, planteamos que este podría ser el mecanismo inicial que da origen a los complejos plaqueta-PMN observados en circulación. Asimismo, las plaquetas con P-selectina en membrana que no se adhirieron al endotelio y tampoco formaron complejo con leucocitos, pueden haber sufrido el proceso de clivaje de P-selectina, contribuyendo a los mecanismos de compensación antes mencionados. Por lo tanto, considerando estos procesos, es que no resulta sorprendente que las plaquetas circulantes de los ratones tratados con Stx2 no muestren aumento de P-selectina, aunque presentan una menor respuesta ante un estímulo *in vitro*.

Otro parámetro de activación plaquetaria que también contribuye a la formación de complejos plaqueta-PMN, es el aumento en la unión del fibrinógeno a su receptor GPIIb-IIIa presente en la membrana de las plaquetas activadas. De acuerdo con esto, hemos demostrado que las plaquetas de ratones tratados con Stx2 presentaban una mayor cantidad de fibrinógeno unido basalmente, así como una menor respuesta frente a un estímulo *in vitro*. Como se mencionó antes, el fibrinógeno actúa también como ligando de CD11b/CD18 presente en el PMN, sirviendo de puente para la interacción entre el PMN y la plaqueta [163, 271].

El papel de GPIIb-IIIa en las interacciones de plaquetas-leucocitos ha sido reportado anteriormente. En estudios *in vitro*, se encontró que en presencia simultánea de un anticuerpo bloqueante de P-selectina y de un antagonista de GPIIb-IIIa se inhibía completamente la unión de leucocitos a plaquetas activadas, pero la inhibición era parcial en ausencia del antagonista de GPIIb-IIIa [286]. Esto sugiere que GPIIb-IIIa participa en la formación de los complejos. También, se vió una inhibición en la formación de complejos plaqueta-PMN en presencia de otros antagonistas de GPIIb-IIIa, como Equistatina, GR144053F y RGDS o anticuerpos [287]. La inhibición de complejos plaqueta-PMN ha sido también demostrada *ex vivo*, en pacientes con angina inestable luego de la administración de un antagonista de GPIIb-IIIa [288]. Nuestros resultados que demuestran la presencia de fibrinógeno en la membrana plaquetaria, junto con estos

antecedentes, sugieren que se estaría produciendo la interacción firme entre ambos tipos celulares, a través del fibrinógeno.

Por otro lado, estudios previos de nuestro grupo de investigación han demostrado la profunda activación que sufren los PMN en este modelo [124, 125]. Algunos indicadores de este proceso son el aumento en la expresión de CD11b, mayor capacidad de adhesión a los vasos pulmonares y una mayor capacidad citotóxica [125]. Las interacciones entre Plaquetas y PMN mediadas por fibrinógeno, son bidireccionales, es decir pueden ocurrir a partir de plaquetas activadas o de PMN activados [289, 290]. En conjunto estos resultados sugieren que la activación de PMN puede jugar un papel importante en la patogénesis del SUH, ya que además de ejercer su acción inflamatoria directa también pueden contribuir a la trombosis.

Por otra parte, se ha demostrado que CD11b representa un vínculo molecular crítico entre inflamación y trombosis. El reclutamiento de PMN a los sitios de daño, así como las interacciones entre PMN y plaquetas, ambos mediados por CD11b, son pasos claves en la trombosis inducida por la inflamación, dando lugar al daño de tejidos y órganos. Se ha reportado además, que CD11b estimula la acumulación de plaquetas, que inicialmente ocurre para preservar la integridad del vaso. Sin embargo, la posterior interacción de CD11b con GPIb en las plaquetas depositadas, promueve la trombosis, un aspecto importante de la lesión renal en este modelo. De esta manera, este podría ser un mecanismo alternativo que contribuye a la formación de los complejos [291].

Stx2 actúa directamente sobre las células endoteliales, a través de la unión a su receptor Gb₃, iniciando la disfunción vascular [89, 140], sin embargo los PMN contribuyen activamente a profundizar dicho daño endotelial. Los mecanismos mediados por PMN implicados en la lesión de los tejidos incluyen la producción de ROS y la capacidad proteolítica de las enzimas almacenadas en los gránulos. Si Stx2 activa a los PMN de forma directa o si la activación ocurre de manera indirecta y secundaria al daño endotelial, es un tema aun controvertido. Algunos autores han encontrado Stx unida a PMN de pacientes con SUH, varios días después de no detectarla en las heces [29, 292]. También se ha reportado que Stx es capaz de unirse a PMN *in vitro*, aun cuando estos carecen de Gb₃ u

otro receptor específico de Stx conocido [293, 294]. Además, se ha probado *in vitro* que Stx tiene efectos directos sobre la viabilidad (apoptosis y necrosis) y la funcionalidad (fagocitosis y producción de ROS) de los PMN [295, 296]. Sin embargo, otros autores han informado la falta de especificidad en la unión de Stx a PMN, tanto *in vitro* como en pacientes con SUH y atribuyen esta unión no específica a los posibles cambios en la membrana de los PMN debido a su activación [297]. Similarmente otros autores no pudieron reproducir los resultados sobre la activación o degranulación de los PMN, incluso a concentraciones altas de Stx o después de la preincubación con otros agonistas [133, 297-299]. Todos los datos expuestos anteriormente sugieren que es probable que la activación de PMN en el SUH esté mediada indirectamente por Stx, a través de su interacción con células endoteliales y otras células inflamatorias.

En este sentido y sea cual fuese el mecanismo que lo media, como la activación de los PMN y el aumento en la producción de ROS ocurren tras la administración de Stx2 [125, 262], se sugiere que estos mecanismos estarían exacerbando la toxicidad de Stx2.

Las plaquetas son cruciales para el reclutamiento de leucocitos sobre el endotelio vascular y los agregados de plaquetas-leucocitos ayudan a amplificar el reclutamiento de leucocitos a los sitios de lesión vascular o inflamación. Aunque la expresión endotelial de P-selectina por sí misma puede conducir al reclutamiento de leucocitos, este proceso es mucho más eficiente en presencia de P-selectina de plaquetas [300], en parte debido a la formación de complejos de plaquetas-leucocitos, que amplifican la capacidad de los leucocitos a ser reclutados en la superficie endotelial[301].

Los resultados obtenidos en este trabajo en conjunto con estos antecedentes, sugieren que Stx2 induce, una activación plaquetaria que conduce a la expresión de P-selectina en membrana y a la unión de fibrinógeno, dos mecanismos que contribuyen a la interacción con PMN y a la formación de complejos. Esto podría contribuir al reclutamiento de PMN sobre el endotelio potenciando el daño tisular iniciado por Stx2.

Otro hallazgo interesante, es la presencia de C3b, sobre la superficie de las plaquetas provenientes de ratones tratados con Stx2. Esto sugiere que Stx2 indujo, la activación del complemento y el subsecuente depósito de C3b sobre la superficie plaquetaria.

Estudios previos han demostrado cómo las plaquetas activadas son capaces de activar al sistema de complemento y proponen a la P-selectina como receptor de C3b [197]. Como se mencionó antes, en este trabajo demostramos indirectamente la degranulación y sobre-expresión de P-selectina en plaquetas de ratones tratados con Stx2, con lo cual, esta podría estar actuando como receptor de C3b. De esta manera, ante una ruptura espontánea de C3, el C3b generado podría depositarse en la membrana plaquetaria, permitiendo el reclutamiento del Factor B y conduciendo a la formación de la C3 convertasa de la vía alterna, la cual comenzaría a clivar activamente el C3 del medio, aumentando el depósito de C3b sobre las plaquetas. Este mecanismo ha sido bien descrito y probado *in vitro* anteriormente [197] y es el que nosotros proponemos para explicar la presencia de C3b en las plaquetas de ratones tratados con Stx2.

El depósito del complemento sobre bacterias es un fenómeno bien estudiado, mediante el cual las mismas son opsonizadas, haciendo más eficiente la fagocitosis por los fagocitos profesionales, tales como neutrófilos, monocitos, macrófagos y células dendríticas [302] [303]. En el mismo sentido, la activación del complemento sobre las plaquetas, puede ser un mecanismo de "clearance" fisiológico de las células no deseadas o apoptóticas [304] pero también puede ser un mecanismo de activación [32, 305, 306]. En efecto, la formación del complejo C5b-9 sobre una membrana celular, en altas cantidades, induce la lisis celular, pero en cantidades sublétricas, se induce una activación que resulta en la secreción de citoquinas, prostanoídes y radicales libres [307-310]. De manera similar, el ensamblado de C5b-9 sobre las plaquetas también promueve la formación del complejo protrombinasa, permitiendo la generación de trombina [311]. La trombina, junto con el complejo C5b-9, inducen la exposición de fosfolípidos cargados negativamente, que actúan como una superficie procoagulante en la membrana de las plaquetas [312], permitiendo así la formación del trombo. En este sentido, la generación de trombina

precede a la lesión renal durante el SUH [313]. Entonces este podría ser, al menos uno de los mecanismos que vinculan al sistema de complemento con el sistema trombótico.

Por otro lado estudios *in vitro* han reportado que Stx es capaz de activar al complemento por la vía alternativa en la fase fluida [203] e inducir el depósito de C3 en células endoteliales microvasculares humanas, promoviendo así la formación del trombo [140]. Apoyando estos hallazgos experimentales, se ha reportado que los pacientes con SUH presentan bajos niveles de C3 [193] y niveles elevados de FBb y sC5b-9 [195].

Es llamativo observar que el sistema de complemento se active sobre células propias, ya que existen mecanismos reguladores que suprimen cualquier activación inespecífica. Sin embargo, se cree que la unión de C3b a la P-selectina, genera un cambio conformacional que previene su inactivación por los inhibidores del complemento [196]. Otra posible explicación es que Stx2 es capaz de unirse a FH, uno de los principales inhibidores, causando una disminución en su actividad [203], con lo cual el mecanismo de activación estaría superando al de inhibición.

Nuestros resultados en el contexto de la bibliografía discutida, sugieren que la activación del complemento se produce en la circulación durante el desarrollo del SUH. Aunque la activación del complemento, no es el principal evento que ocurre durante la infección por STEC, se especula que puede contribuir a la activación de las plaquetas, a la formación de trombos y en última instancia al daño tisular.

Estos hallazgos pueden tener implicaciones para las futuras estrategias de tratamiento, ya que los inhibidores del complemento, como el anticuerpo monoclonal Eculizumab, ha demostrado ser eficaz en enfermedades mediadas por complemento como el SUH atípico [314, 315]

El Eculizumab es un anticuerpo monoclonal recombinante, humanizado. Actúa como un inhibidor del complemento por unirse con alta afinidad y especificidad a C5, evitando así la fragmentación en C5a y C5b y la formación del complejo C5b-9. Estos constituyen los componentes terminales del complemento y cumplen un rol lítico, protrombótico y proinflamatorio [316]. Actualmente existen varios estudios donde se ha testeado el uso de Eculizumab en pacientes con SUH típico. Un primer trabajo fue realizado en tres

pacientes severos con SUH asociado a STEC O157: H7, de tres años de edad que requerían hemodiálisis y demostró que después del tratamiento los tres pacientes mejoraron rápidamente tanto el estado neurológico, como ciertos marcadores de enfermedad (normalización del recuento de plaquetas y disminución en LDH) [194]. Luego de estos hallazgos, se comenzó a utilizar Eculizumab durante el brote de STEC-SUH ocurrido en Alemania en el año 2011, en particular en los pacientes con mal pronóstico y afectación cerebral [317].

Los estudios realizados en el contexto de este brote arrojaron resultados contradictorios. Muchos centros médicos en especial en los primeros días, debido en parte, a la presión pública que anunció una droga potencialmente efectiva, utilizaron Eculizimab para el tratamiento de pacientes. Este fue útil en aquellos que presentaban graves complicaciones neurológicas, y que en su mayoría eran adultos [318]. En Francia se trataron 9 pacientes pediátricos con Eculizumab el resultado fue favorable en todos los pacientes, con la rápida normalización de la hemoglobina, plaquetas, niveles de LDH, función renal y mejora neurológica [319]. El tratamiento temprano se asoció con una recuperación rápida y eficiente. No hubo muertes ni efectos adversos relacionados con Eculizumab. Sin embargo, estudios con mayor número de pacientes informaron resultados contradictorios. Por ejemplo, un estudio realizado en pacientes que comparaba el tratamiento con Eculizumab versus plasmaféresis, demostró que los pacientes tratados con Eculizumab no difirieron de manera significativa del grupo control en los marcadores de enfermedad (recuperación de plaquetas; LDH, creatinina sérica, niveles de hemoglobina) o en las complicaciones. Además un 40% de los pacientes tratados con Eculizumab requirieron la continuación del tratamiento con plasmaféresis [320]. Un registro de análisis retrospectivo realizado por otro grupo de investigación comparó las mejores terapias de apoyo (reposición de volemia, nutrición parenteral, diálisis) con plasmaféresis y plasmaféresis con Eculizumab, para el tratamiento de pacientes con SUH típico. Dicho estudio reveló que la administración de Eculizumab no estaba asociada con una mejora en los resultados clínicos. Cabe destacar que en el

último caso, el tratamiento se le administró a los pacientes más graves y con un retraso de 11 días después de la hospitalización [318].

La efectividad de Eculizumab en el tratamiento del SUH típico todavía no ha sido establecida, el hecho de que el tratamiento solo se aplique en los pacientes más severos o en los que no respondieron a la plasmaféresis [321], es un claro ejemplo de un sesgo en la selección de los grupos de tratamiento, por tal motivo cualquier evidencia sólo puede ser indirecta hasta que se lleve a cabo un ensayo clínico controlado y aleatorio.

Otro hallazgo importante de la presente tesis fue que los ratones tratados con Stx2 presentaban trombocitopenia a partir de las 24 horas p.i., reproduciendo lo observado en el humano, sugiriendo de manera indirecta, que las plaquetas se activan y se consumen en la formación de trombos. Esto nos permite validar el modelo murino por inyección e.v. de Stx2 para el estudio de la respuesta trombótica.

Un punto importante a discutir es que si bien la trombocitopenia fue observada a las 24 horas p.i., la activación de las plaquetas y la presencia de complejos plaqueta-PMN recién se detectó a las 48 horas p.i.

Estos resultados sugieren que las plaquetas sufren una activación inicial localizada, reclutándose rápidamente en el sitio de daño y desapareciendo de circulación. Posteriormente, la activación se extiende hacia plaquetas circulantes volviéndose un fenómeno sistémico.

Los efectos de las ROS sobre células y tejidos son múltiples y diversos. En particular, varios estudios independientes han demostrado que el estrés oxidativo es un fuerte estímulo que induce la disfunción y el daño endotelial [322].

La activación de la respuesta trombótica por el estrés oxidativo tiene varios orígenes: en principio resulta ser consecuencia del marcado daño endotelial generado por los agentes oxidantes. Respecto a esto, una respuesta inflamatoria en la pared del vaso induce la expresión de moléculas de adhesión y la secreción de quimioquinas por el endotelio vascular que pueden agravar el estado protrombótico y favorecer la deposición plaquetaria [39,40]. Pero también dichos agentes oxidantes poseen un efecto activador directo sobre las plaquetas. Por ejemplo, ciertos estudios documentan que las ROS

aumentan la activación del receptor de fibrinógeno, la integrina GPIIb-IIIa [323, 324] y que la oxidación del dominio externo de esta integrina también conduce a su activación [323, 325, 326].

En el contexto del SUH, recientemente hemos reportado que Stx2 *in vivo* rompe el equilibrio entre el estado de oxidación y anti oxidación, al menos en parte por inducir el estallido respiratorio en PMN. Efectivamente, encontramos que los ratones inoculados con Stx2 presentaban una menor concentración del antioxidante endógeno más importante (GSH) en riñón y un aumento del grado de peroxidación lipídica renal. Esto demuestra que el estrés oxidativo causado por Stx2 ha sobrepasado la capacidad antioxidante endógena [262].

A partir de estas observaciones, planteamos la hipótesis de que el estrés oxidativo generado por Stx2 podría contribuir a la activación de la respuesta trombótica observada en el modelo murino de SUH. Por esto consideramos interesante evaluar el efecto potencialmente protector de antioxidantes exógenos, para lo cual elegimos NAC y SEC, dos agentes ampliamente caracterizados.

Un hallazgo destacado de esta tesis, fue demostrar que el tratamiento con la droga antioxidante NAC ha sido capaz de prevenir parcialmente la activación de la respuesta trombótica, además de proteger parcialmente sobre la acción renotóxica de Stx2, mejorando la función renal y la sobrevida. Así, el pretratamiento con NAC previno totalmente la trombocitopenia aunque solo parcialmente la activación plaquetaria (unión de fibrinógeno) y la formación de complejos plaqueta-PMN.

Podemos plantear entonces que la respuesta oxidativa tiene un alto impacto sobre la respuesta trombótica y ambas, probablemente contribuyen al mecanismo patogénico del SUH.

En cuanto al mecanismo de acción, la NAC actúa restaurando los niveles intracelulares de GSH necesarios para detoxificación de los metabolitos tóxicos [237] y/o secuestrando ROS en forma directa [327]. También son bien conocidos los efectos de protección directa sobre el riñón dado que se ha visto que NAC aumenta la concentración intra-renal de GSH y mejora la injuria causada por isquemia y reperusión, por oclusión de vena cava o por

otros estímulos nefrotóxicos [327, 328]. Sus efectos sobre la microvasculatura renal también han sido documentados, por un lado revierte la vasoconstricción inducida por angiotensina II o por la inhibición de la prostaglandina renal y la producción de NO, pero también mejora la vasodilatación cortical y la filtración glomerular [327].

Otros trabajos dan cuenta del efecto directo de NAC sobre las plaquetas. En efecto, NAC inhibe la fosforilación de la subunidad β_3 , un paso fundamental en la transducción de señales del receptor de fibrinógeno [329] e inhibe la agregación de plaquetas inducida por trombina y ADP en sangre de pacientes con diabetes tipo 2. Este efecto antiagregante está asociado con el aumento de GSH intra plaquetario y por lo tanto con una mayor actividad antioxidante. Simultáneamente, la generación de ROS proveniente tanto de plaquetas activadas como quiescentes, se vió disminuida por la suplementación de NAC [330]

Uno o la combinación de algunos de estos efectos de la NAC, podrían estar actuando para frenar la activación plaquetaria exacerbada, durante el daño inducido por Stx2.

Por otro lado, si bien SEC es un compuesto con propiedades antioxidantes similares a las de NAC, no fue efectivo en la protección contra los efectos tóxicos de Stx2. Efectivamente no se vieron cambios ni en la función renal, ni en la respuesta trombótica, ni en la muerte luego de la inoculación de Stx2. Estos resultados no concuerdan con los hallados por nuestro grupo anteriormente, donde se había observado una protección similar entre SEC y NAC. Esto nos ha hecho pensar que la falta de acción puede asociarse al uso de un lote de SEC diferente al utilizado en los experimentos previos, probablemente con menor o nula actividad, por estar parcialmente oxidada. Sin embargo, nos ha sido difícil conseguir un nuevo lote.

El tratamiento preventivo con NAC mostró una protección más eficaz en comparación con el tratamiento en simultáneo con la inoculación de Stx2. Estos resultados coinciden con trabajos anteriores que indican que sólo el pretratamiento con NAC fue eficaz en reducir la incidencia y severidad de la lesión renal aguda [331].

Otro punto importante a tener en cuenta es que la protección por NAC es parcial, sugiriendo que el daño por oxidación tiene relevancia patológica en la evolución de la

enfermedad pero no es el único mecanismo involucrado. El desarrollo de la enfermedad es un proceso complejo y multifactorial, ya que Stx2 actúa a través de varios mecanismos. En efecto, daña en forma directa a las células endoteliales de la microvasculatura, provocando la expresión de moléculas de adhesión, secreción de citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL1- β . Esto resulta en una fuerte activación plaquetaria, llevando a la formación de trombos que obstruyen la microvasculatura. A su vez, esta exacerbada activación plaquetaria contribuye a la fuerte respuesta inflamatoria, a través de la activación del sistema de complemento y de la formación de agregados PMN-Plaquetas. Paralelamente Stx2 altera el equilibrio del sistema inmune, provocando la activación de los componentes inflamatorios más importantes, PMN y monocitos. El efecto conjunto de todos estos procesos resulta en un profundo desequilibrio oxidativo, imposible de frenar bloqueando un único mecanismo patogénico. Por tal motivo no es sorprendente que el antioxidante NAC fue efectivo para prevenir parcialmente el daño por Stx2.

El uso de NAC como antioxidante se encuentra extendido para el tratamiento de patologías tales como Purpura trombocitopénica trombótica (PTT) [332], diabetes tipo 2 [330], enfermedad renal crónica [333], enfermedad obstructiva crónica pulmonar [334] y durante la hemodiálisis [335], entre otras aplicaciones. Teniendo en cuenta que el SUH se desarrolla varios días después de la infección con STEC [2] y considerando que los antioxidantes se utilizan ampliamente con pocos o nulos efectos adversos documentados, proponemos que el tratamiento podría iniciarse durante el período de la diarrea, que corresponde al periodo ventana entre la ingestión del alimento contaminado y la manifestación del SUH. De esta manera se lograría prevenir o disminuir el desbalance oxidativo y en consecuencia preservar la integridad de los tejidos.

En conclusión, integrando todos estos hallazgos, en el modelo murino de SUH hemos demostrado que Stx2 causa una profunda activación de la respuesta trombótica que repercute en la respuesta inflamatoria potenciándola a través de diferentes vías: ya sea mediante la activación del sistema de complemento, o mediante la formación de complejos plaqueta-PMN en circulación. Por otro lado demostramos que el desbalance

oxidativo generado por Stx2, contribuye a dicha activación y que el tratamiento con NAC fue capaz de prevenirla parcialmente.

Para poder entender, más en detalle, el mecanismo por el cual Stx2 afecta la respuesta trombótica, se realizaron estudios *in vitro*, a través de la incubación de plaquetas humanas purificadas con células endoteliales glomerulares humanas (HGEC), previamente tratadas o no con Stx2.

En primer lugar hemos confirmado el efecto citotóxico que posee Stx2 sobre el endotelio, observando, luego del tratamiento con la misma, un menor número de células viables, tanto por la tinción con H/E, como por rojo neutro. Tal efecto ha sido ampliamente demostrado por varios autores, que reportan que Stx2 además de inhibir la síntesis de proteínas, también puede inducir apoptosis [90, 336-342]. Por ejemplo, en células endoteliales humanas, se encontró que Stx actúa directamente sobre el ADN nuclear, causando una fragmentación, que resulta en la muerte celular por apoptosis [343, 344]. También se demostró que induce el clivaje de la caspasa-3, 6, 8 y 9, así como la proteína inducible por daños en el ADN, GADD 153 [345].

En segundo lugar, hemos probado que el endotelio activado y dañado por Stx2 estimula a las plaquetas, traduciéndose en una mayor adhesión y en un aumento en la liberación de sCD40L. Otros autores apoyan nuestras observaciones, ya que en otras líneas endoteliales han observado, luego del tratamiento con Stx2, la expresión de moléculas de adhesión como la integrina $\alpha v\beta 3$, PECAM-1 y P-selectina [103], así como la liberación endotelial de varios mediadores solubles que contribuyen a la activación plaquetaria [107, 346].

Los mecanismos involucrados en la microangiopatía trombótica observada en el SUH todavía no han sido completamente elucidados. Nosotros en esta tesis hemos probado que la activación plaquetaria ocurre fundamentalmente de manera indirecta, como consecuencia de la injuria endotelial y que Stx2 no ejerce ningún efecto directo sobre las plaquetas. Sin embargo, esto último es un punto que se encuentra en discusión hasta el día de hoy. Ciertos estudios sugieren que Stx se une directamente a las plaquetas [32, 34], a través de Gb₃ [347] y de un glicosfingolípido denominado Banda 0.03 [34], mientras

que otro estudio sugiere que solo se une a las plaquetas activadas [33]. Por otro lado, varios trabajos indicaron que tanto Stx1 y Stx2 purificadas son incapaces de inducir la agregación plaquetaria [97, 98, 348]. Sin embargo, Karpman y su grupo mostraron que Stx1 y su subunidad B se unen directamente a las plaquetas, internalizándose luego de 2 horas, lo cual llevaría a la agregación, ya que observaron cambios morfológicos en las mismas y un aumento en la unión del fibrinógeno [32].

Según nuestros resultados junto con evidencias previas, podemos concluir que Stx2 activa y daña al endotelio. Como consecuencia de la lesión endotelial, se produce una activación de las plaquetas, que se adhieren al endotelio y liberan sCD40L. Este constituye uno de los mecanismos principales responsables de la activación de la respuesta trombótica observada en el SUH.

Por otra parte, en el modelo murino hemos demostrado la relevancia del estrés oxidativo en la activación plaquetaria y el efecto preventivo del antioxidante NAC. Ahora bien, al analizar el efecto del antioxidante NAC en el protocolo *in vitro*, encontramos que al agregar la NAC en simultaneo con Stx2, el endotelio no se vió protegido frente a la toxicidad de la misma y tampoco resultaron modificadas ni la adhesión ni la activación plaquetaria (liberación de sCD40L). Sin embargo el pretratamiento de las plaquetas (1 hora antes) con NAC, resultó en una menor activación, pero no modificó la adhesión.

En conjunto, estas evidencias experimentales nos llevan a concluir que NAC ejerce un efecto directo sobre las plaquetas, interfiriendo con la liberación de sCD40L. Por un lado esto podría deberse a la captura de ROS presentes en el medio por parte de NAC. De esta manera, teniendo en cuenta que las ROS extracelulares actúan como agonistas plaquetarios [322, 349], al verse reducida su concentración, las plaquetas presentarían un menor grado de activación, disminuyendo en consecuencia la liberación de sCD40L. Por otro lado, estudios previos demostraron que las plaquetas tienen la capacidad de producir ROS, que a su vez actúan como moléculas de señalización intracelulares, que pueden amplificar la respuesta plaquetaria a sus agonistas [220]. Siguiendo con esta línea, otros

autores informan que la subunidad gp91phox de la NADPH oxidasa, está implicada en la expresión de CD40L en plaquetas [350] y que la vitamina C, conocido antioxidante, la inhibe [351]. También se ha reportado que la NAC es capaz de atenuar la liberación de sCD40L, por plaquetas estimuladas con trombina [175]. Todos estos datos sugieren que las ROS intraplaquetarias también podrían estar promoviendo la expresión de CD40L. Con lo cual, el efecto de la NAC observado en este trabajo, podría ser producto de la neutralización tanto de las ROS extracelulares como intraplaquetarias.

Por otra parte, el hecho de que NAC no protegió al endotelio frente a la toxicidad de Stx2, podría explicar porque tampoco tuvo efectos sobre la adhesión plaquetaria. Esto a su vez nos permite descartar que el efecto preventivo de la NAC contra la activación de las plaquetas sea producto de un menor daño endotelial. En otras palabras, al verse afectada la integridad del endotelio por acción de Stx2 aún en presencia de NAC y frente a la expresión de ciertas moléculas de adhesión, las plaquetas se adhieren al endotelio dañado. Sin embargo, poseen menor grado de activación debido a la neutralización de ROS por parte de NAC.

En conclusión, el desequilibrio oxidativo producido por acción de Stx2 sobre el endotelio, participa en la activación de las plaquetas. Asimismo las propias plaquetas podrían amplificar este proceso mediante la liberación de ROS al activarse. De esta manera, describimos otro mecanismo involucrado en la activación de la respuesta trombótica en el SUH.

Dado que, el sCD40L es un mediador soluble, secretado por plaquetas, que ejerce diversos efectos protrombóticos y proinflamatorios, nos pareció importante evaluar si los resultados vistos *in vitro* podrían correlacionarse con estudios en pacientes con SUH. De manera interesante, hallamos que pacientes con SUH de grado 1-2 tenían elevados niveles plasmáticos de sCD40L mientras que los pacientes de grado 3 presentaban niveles similares a los controles sanos. Similarmente el sCD40L se ha reportado elevado en varias patologías, pudiendo ser considerado como un marcador de riesgo trombótico [352-354]. Con respecto a la relación entre los niveles de sCD40L y el recuento plaquetario de los

pacientes, los casos severos de SUH presentan marcada trombocitopenia y sus plaquetas son incapaces de responder a cualquier estímulo, este fenómeno es irreversible y es conocido como plaquetas exhaustas [91, 355]. Esto significa que las plaquetas de estos pacientes ya liberaron su contenido granular, incluyendo al sCD40L el cual es reclutado rápidamente por sus células blanco desapareciendo de la circulación. Por tal motivo no es sorprendente que estos pacientes posean niveles de sCD40L en plasma similares a los individuos sanos. Por el contrario, en el caso de los pacientes de grados más leves, sus plaquetas se encuentran bajo el proceso de activación, por lo que es probable que todavía liberen sCD40L, reflejándose en los altos niveles de sCD40L encontrados en circulación, aún con un número de plaquetas significativamente menor que los individuos sanos.

Por otra parte, hemos hallado una correlación negativa entre los niveles plasmáticos de sCD40L y dos parámetros de daño renal: los niveles plasmáticos de urea y creatinina. Esto sugiere que aquellos niños que al momento del diagnóstico presentan niveles elevados de sCD40L, tienen una función plaquetaria más conservada y tendrían una evolución más favorable. De alguna manera se refleja la importancia de la respuesta trombótica en la evolución hacia formas más graves.

El motivo por el cual algunos pacientes infectados desarrollan SUH y otros no, es desconocido, sobre todo considerando que las anomalías protrombóticas se producen en muchos niños infectados, independientemente de si evolucionan a SUH o no [313]. Sin embargo, se vio que los niños con mayores concentraciones de ciertos marcadores trombóticos al inicio de la diarrea, tenían un mayor riesgo de desarrollar SUH, a pesar de poseer valores normales de hematocrito, recuento plaquetario y creatinina sérica [313]. A partir de esto, Tarr y colaboradores, proponen que el desarrollo del SUH está relacionado con el grado de activación de la respuesta trombótica en el inicio de la infección y con la intensidad con la que la misma se desarrolla posteriormente [356]. De manera interesante, nuestros hallazgos estarían apoyando esta hipótesis. Asimismo, el hecho de que los pacientes de grado leve, al momento del diagnóstico, tengan elevados niveles plasmáticos de sCD40L y no hayan desarrollado aún la falla renal, nos permite pensar en el sCD40L como un marcador útil para el diagnóstico temprano de la enfermedad. Esto

tendría gran relevancia en la clínica, ya que muchos pacientes que acuden a la consulta, al no presentar la tríada característica del SUH completa, no reciben un diagnóstico prematuro y por ende, no reciben la atención necesaria pudiendo evolucionar hacia las formas más severas.

Como hemos mencionado anteriormente, uno de los efectos conocidos del sCD40L es su capacidad de inducir la producción de ROS en varios tipos celulares [175, 176, 357]. Dado la importancia que tienen las ROS en esta patología, nos interesó evaluar los plasmas de aquellos pacientes que presentaron elevados niveles de sCD40L, en su capacidad para inducir la producción de ROS por monocitos. Efectivamente, encontramos que dichos plasmas inducen una mayor producción de ROS, comparado con los plasmas controles, que es parcialmente revertido al depletar los plasmas de sCD40L. Sin embargo, no nos resulta extraña esta reversión parcial, si se tiene en cuenta que el plasma de pacientes con SUH contiene elevados niveles de diversas citoquinas, quimioquinas y otros mediadores [121, 127, 130, 144-150], que también podrían estimular el estallido respiratorio.

De estos resultados, que muestran la participación del sCD40L en la producción de ROS por monocitos, junto con lo demostrado previamente que las ROS participan en la liberación plaquetaria de sCD40L, se desprende uno de los hallazgos más interesantes de esta tesis: **ROS Y sCD40L se estimulan mutuamente generando un ciclo de retroalimentación positiva, iniciado por plaquetas activadas que mediante la liberación de sCD40L potencian la liberación de ROS por monocitos, las cuales podrían activar nuevas plaquetas. Este mecanismo podría estar amplificando el daño causado por Stx2.**

Existen estudios previos donde se reporta un mecanismo similar entre plaquetas y PMN [175] y se cree que esta interacción también podría ocurrir con otros tipos celulares que expresan CD40, como células endoteliales o incluso como una señal autócrina entre plaquetas. Este ciclo de retroalimentación positiva que involucra plaquetas, monocitos, PMN y células endoteliales, podría ser un mecanismo que sostiene los efectos tromboinflamatorios ocurridos durante el desarrollo del SUH. Algo similar ha sido reportado para otras enfermedades como diabetes, aterosclerosis y síndrome coronario agudo [353].

Continuando con los efectos de sCD40L, ha sido ampliamente reportada su capacidad de inducir la expresión de FT en varios tipos celulares, como monocitos [183, 358, 359] y células endoteliales [181, 360, 361]. En este trabajo hemos demostrado que el plasma de pacientes con SUH con altos niveles plasmáticos de sCD40L, tiene la capacidad de estimular la expresión de FT en monocitos. Sin embargo, no podemos atribuirle este efecto al sCD40L, dado que la depleción del mismo no modificó el resultado.

Varios trabajos apoyan la idea de que el sCD40L es mediador de la expresión de FT, sin embargo otros autores reportaron que la incubación de monocitos con plaquetas previamente activadas, induce la expresión de FT, pero el bloqueo de sCD40L con un anticuerpo neutralizante no fue capaz de inhibir el efecto. En este mismo estudio, el bloqueo de la P-selectina soluble sola o en simultaneo con sCD40L, resulta en un 50% de inhibición [359]. Esto sugiere que la P-selectina soluble, podría ser responsable de la capacidad procoagulante que poseen los plasmas de pacientes con SUH, sobre todo si se tiene en cuenta que otros autores también han reportado la habilidad de la P-selectina en inducir la expresión de FT en monocitos [362] y que además se encuentra incrementada en plasmas de pacientes con SUH [95, 281].

Teniendo en cuenta que el plasma de pacientes con SUH, contiene niveles elevados de varios mediadores solubles, el efecto observado podría ser mediado por uno o por la combinación de varios de ellos pero indudablemente sCD40L no parece ser relevante.

Por lo tanto, podemos concluir que el plasma de pacientes con SUH posee capacidad procoagulante, a través de la inducción de la expresión de FT en monocitos, que podrían iniciar la cascada de coagulación. De esta manera describimos un mecanismo que podría estar contribuyendo al estado protrombótico sistémico observado en el SUH. La presencia de monocitos circulantes expresando en membrana el FT, sugiere que la cascada de coagulación podría estar disparándose en toda la circulación, explicando porque el estado protrombótico en el SUH es sistémico y no localizado.

La actividad procoagulante que poseen los monocitos al expresar FT ha sido reportada en otras enfermedades tromboticas tales como hipercolesterolemia familiar [183], anemia falciforme [363] y enfermedades coronarias [364].

El sCD40L es considerado como un vínculo importante entre la hemostasia y la inflamación vascular [365]. Dado que las plaquetas pueden también a través de la liberación de sCD40L, actuar sobre los monocitos induciendo la liberación de diversas citoquinas como por ejemplo IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8 y MIP-1 α [366-368].

Notablemente, el TNF- α tiene la capacidad de estimular la expresión endotelial de Gb₃, sensibilizando al endotelio para Stx2, con lo cual es considerada como una de las citoquinas más relevantes en el desarrollo del SUH. Ahora bien, según los resultados obtenidos en este trabajo, hemos podido demostrar que el plasma de pacientes con SUH tiene la capacidad de inducir a los monocitos a secretar TNF- α . No obstante, no podemos atribuirle esta función al sCD40L ya que la liberación de TNF- α no se vio modificada al depletar los plasmas. Continuando con el razonamiento previo, existen múltiples factores en el plasma de pacientes que podrían estar mediando este mecanismo.

Integrando todos los resultados obtenidos con el plasma de pacientes sobre los monocitos, en primer lugar podemos concluir que el sCD40L es un mediador crítico de la respuesta prooxidante efectuada por los monocitos, demostrando como las plaquetas estarían contribuyendo con el desbalance oxidativo observado en el SUH, amplificando los mecanismos generados por Stx2.

En segundo lugar, demostramos que en el SUH existe una vía alternativa de inicio de la coagulación, mediada por monocitos que expresan FT en superficie. Creemos que este podría ser otro mecanismo disparado por plaquetas, a través de la liberación de mediadores solubles, que amplifica la respuesta trombótica.

Si bien no pudimos demostrar la relevancia de sCD40L en este proceso, considerando la importancia que tiene la inflamación inducida por la respuesta trombótica en otras patologías y la importancia de ambas en el SUH, pensamos que este mecanismo podría ser disparado por algún otro mediador proveniente de plaquetas.

Para concluir, en esta tesis se describe, la importancia que tiene la respuesta trombótica en la evolución del SUH y como potencia a la respuesta inflamatoria. La Stx2 a través

de su efecto citotóxico sobre el endotelio, desencadena una fuerte activación plaquetaria localizada, que resulta en la adhesión de las plaquetas para formar el trombo. Secundariamente, el fenómeno de activación se hace extensible a las plaquetas adyacentes que no fueron retenidas en el trombo. A partir de esto se desencadenan varios procesos importantes que contribuyen al daño tisular: la formación de los complejos plaqueta-PMN, la activación del Sistema de Complemento y la liberación de sCD40L. El paso crítico que da lugar a los dos primeros, es la expresión en superficie de la P-selectina. Por un lado, es la molécula que media la adhesión débil de las plaquetas a los PMN, iniciando el proceso de formación de los complejos, que finalmente facilita el reclutamiento de los PMN al endotelio. Por otro lado, se ofrece como superficie para el depósito de C3b sobre la membrana plaquetaria, iniciando la vía alterna del complemento, que a su vez potencia la trombosis.

Por otra parte, Stx2 induce un desequilibrio oxidativo, en el cual las ROS predominan sobre la capacidad antioxidante endógena. Esto contribuye a la activación plaquetaria y a la consecuente liberación de sCD40L. Notablemente, sCD40L induce el estallido respiratorio en monocitos, estimulando la liberación de ROS y estableciendo un ciclo de retroalimentación positiva entre plaquetas y monocitos.

Otro evento que ocurre durante el SUH es la coagulación iniciada por monocitos, si bien no hemos identificado como es que se inicia, especulamos que es un mecanismo de amplificación generado por la respuesta trombótica.

Finalmente, hemos demostrado los efectos atenuantes que posee la droga antioxidante NAC, frente a los efectos deletéreos de Stx2, con lo cual podría ser tomada en cuenta para el tratamiento de los pacientes afectados por SUH, sobre todo si se considera que es una droga actualmente en uso para otras patologías, que no posee efectos colaterales. Sin embargo, es importante resaltar que solo el pretratamiento con NAC fue efectivo, por lo cual debería ser aplicada dentro de la ventana de tiempo entre el comienzo de la diarrea y la declaración del SUH.

Referencias

6- Referencias

1. Gianantonio, C.A., et al., *The hemolytic-uremic syndrome*. Nephron, 1973. **11**(2): p. 174-92.
2. Levin, M. and J.M. Barratt, *Haemolytic uraemic syndrome*. Arch Dis Child, 1984. **59**(5): p. 397-400.
3. Scheiring, J., A. Rosales, and L.B. Zimmerhackl, *Clinical practice. Today's understanding of the haemolytic uraemic syndrome*. Eur J Pediatr, 2010. **169**(1): p. 7-13.
4. Repetto, H.A., [*Hemolytic uremic syndrome (HUS). An up-dated nosological classification*]. Medicina (B Aires), 2006. **66 Suppl 3**: p. 2-5.
5. Ibarra, C., et al., [*Hemolytic uremic syndrome caused by enterohaemorrhagic Escherichia coli*]. Arch Argent Pediatr, 2008. **106**(5): p. 435-42.
6. Proulx, F., E.G. Seidman, and D. Karpman, *Pathogenesis of Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome*. Pediatr Res, 2001. **50**(2): p. 163-71.
7. Ferraris, J.R., et al., *Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: absence of recurrence after renal transplantation*. Pediatr Nephrol, 2002. **17**(10): p. 809-14.
8. Rivas, M., et al., *Diarrheagenic Escherichia coli in Argentina.*, in *Pathogenic Escherichia coli in Latin America 2010*, Bentham Science Publishers Ltd. . p. 142-161.
9. Gordjani, N., et al., *Hemolytic uremic syndromes in childhood*. Semin Thromb Hemost, 1997. **23**(3): p. 281-93.
10. Griffin, P.M. and R.V. Tauxe, *The epidemiology of infections caused by Escherichia coli O157:H7, other enterohemorrhagic E. coli, and the associated hemolytic uremic syndrome*. Epidemiol Rev, 1991. **13**: p. 60-98.
11. Noris, M. and G. Remuzzi, *Hemolytic uremic syndrome*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(4): p. 1035-50.
12. Mead, P.S. and P.M. Griffin, *Escherichia coli O157:H7*. Lancet, 1998. **352**(9135): p. 1207-12.
13. Masumoto, K., et al., *Colonic stricture secondary to hemolytic uremic syndrome caused by Escherichia coli O-157*. Pediatr Nephrol, 2005. **20**(10): p. 1496-9.
14. Richardson, S.E., et al., *The histopathology of the hemolytic uremic syndrome associated with verocytotoxin-producing Escherichia coli infections*. Hum Pathol, 1988. **19**(9): p. 1102-8.
15. Siegler, R.L., *Spectrum of extrarenal involvement in postdiarrheal hemolytic-uremic syndrome*. J Pediatr, 1994. **125**(4): p. 511-8.
16. Sebbag, H., et al., *Colonic stenosis after hemolytic-uremic syndrome*. Eur J Pediatr Surg, 1999. **9**(2): p. 119-20.
17. Garg, A.X., et al., *Long-term renal prognosis of diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression*. JAMA, 2003. **290**(10): p. 1360-70.
18. Siegler, R. and R. Oakes, *Hemolytic uremic syndrome; pathogenesis, treatment, and outcome*. Curr Opin Pediatr, 2005. **17**(2): p. 200-4.
19. Siegler, R.L., et al., *Long-term outcome and prognostic indicators in the hemolytic-uremic syndrome*. J Pediatr, 1991. **118**(2): p. 195-200.
20. Orth, D. and R. Wurzner, *What makes an enterohemorrhagic Escherichia coli?* Clin Infect Dis, 2006. **43**(9): p. 1168-9.
21. Mariani-Kurkdjian, P. and E. Bingen, [*Hemolytic-uremic syndrome: microbiological aspects*]. Arch Pediatr, 2001. **8 Suppl 4**: p. 785s-791s.

22. Schuller, S., *Shiga toxin interaction with human intestinal epithelium*. Toxins (Basel). **3**(6): p. 626-39.
23. Acheson, D.W., et al., *Translocation of Shiga toxin across polarized intestinal cells in tissue culture*. Infect Immun, 1996. **64**(8): p. 3294-300.
24. MacLeod, D.L., C.L. Gyles, and B.P. Wilcock, *Reproduction of edema disease of swine with purified Shiga-like toxin-II variant*. Vet Pathol, 1991. **28**(1): p. 66-73.
25. Keir, L.S., S.D. Marks, and J.J. Kim, *Shigatoxin-associated hemolytic uremic syndrome: current molecular mechanisms and future therapies*. Drug Des Devel Ther, 2012. **6**: p. 195-208.
26. Brigotti, M., et al., *Interactions between Shiga toxins and human polymorphonuclear leukocytes*. J Leukoc Biol, 2008. **84**(4): p. 1019-27.
27. Exeni, R.A., G.C. Fernandez, and M.S. Palermo, *Role of polymorphonuclear leukocytes in the pathophysiology of typical hemolytic uremic syndrome*. ScientificWorldJournal, 2007. **7**: p. 1155-64.
28. Griener, T.P., et al., *Differential binding of Shiga toxin 2 to human and murine neutrophils*. J Med Microbiol, 2007. **56**(Pt 11): p. 1423-30.
29. te Loo, D.M., et al., *Binding and transfer of verocytotoxin by polymorphonuclear leukocytes in hemolytic uremic syndrome*. Blood, 2000. **95**(11): p. 3396-402.
30. Geelen, J.M., et al., *Interactions of Shiga-like toxin with human peripheral blood monocytes*. Pediatr Nephrol, 2007. **22**(8): p. 1181-7.
31. van Setten, P.A., et al., *Effects of verocytotoxin-1 on nonadherent human monocytes: binding characteristics, protein synthesis, and induction of cytokine release*. Blood, 1996. **88**(1): p. 174-83.
32. Karpman, D., et al., *Platelet activation by Shiga toxin and circulatory factors as a pathogenetic mechanism in the hemolytic uremic syndrome*. Blood, 2001. **97**(10): p. 3100-8.
33. Ghosh, S.A., et al., *Shiga toxin binds to activated platelets*. J Thromb Haemost, 2004. **2**(3): p. 499-506.
34. Cooling, L.L., et al., *Shiga toxin binds human platelets via globotriaosylceramide (Pk antigen) and a novel platelet glycosphingolipid*. Infect Immun, 1998. **66**(9): p. 4355-66.
35. Boyd, B. and C. Lingwood, *Verotoxin receptor glycolipid in human renal tissue*. Nephron, 1989. **51**(2): p. 207-10.
36. Robinson, L.A., et al., *Escherichia coli verotoxin binding to human paediatric glomerular mesangial cells*. Pediatr Nephrol, 1995. **9**(6): p. 700-4.
37. Takeda, T., et al., *Impairment by verotoxin of tubular function contributes to the renal damage seen in haemolytic uraemic syndrome*. J Infect, 1993. **27**(3): p. 339-41.
38. Uchida, H., et al., *The detection of Shiga toxins in the kidney of a patient with hemolytic uremic syndrome*. Pediatr Res, 1999. **45**(1): p. 133-7.
39. Bertholet-Thomas, A., et al., *[Post-diarrheal haemolytic uremic syndrome: when shall we consider it? Which follow-up?]*. Arch Pediatr, 2011. **18**(7): p. 823-30.
40. Loirat, C., J. Saland, and M. Bitzan, *Management of hemolytic uremic syndrome*. Presse Med, 2012. **41**(3 Pt 2): p. e115-35.
41. Schmidt, H., *Shiga-toxin-converting bacteriophages*. Res Microbiol, 2001. **152**(8): p. 687-95.
42. Serna, A.t. and E.C. Boedeker, *Pathogenesis and treatment of Shiga toxin-producing Escherichia coli infections*. Curr Opin Gastroenterol, 2008. **24**(1): p. 38-47.
43. Fraser, M.E., et al., *Crystal structure of the holotoxin from Shigella dysenteriae at 2.5 Å resolution*. Nat Struct Biol, 1994. **1**(1): p. 59-64.

44. Stein, P.E., et al., *Crystal structure of the cell-binding B oligomer of verotoxin-1 from E. coli*. Nature, 1992. **355**(6362): p. 748-50.
45. Fraser, M.E., et al., *Structure of shiga toxin type 2 (Stx2) from Escherichia coli O157:H7*. J Biol Chem, 2004. **279**(26): p. 27511-7.
46. Tam, P.J. and C.A. Lingwood, *Membrane cytosolic translocation of verotoxin A1 subunit in target cells*. Microbiology, 2007. **153**(Pt 8): p. 2700-10.
47. Garred, O., B. van Deurs, and K. Sandvig, *Furin-induced cleavage and activation of Shiga toxin*. J Biol Chem, 1995. **270**(18): p. 10817-21.
48. Tesh, V.L., et al., *Comparison of the relative toxicities of Shiga-like toxins type I and type II for mice*. Infect Immun, 1993. **61**(8): p. 3392-402.
49. Muthing, J., et al., *Shiga toxins, glycosphingolipid diversity, and endothelial cell injury*. Thromb Haemost, 2009. **101**(2): p. 252-64.
50. DeGrandis, S., et al., *Globotetraosylceramide is recognized by the pig edema disease toxin*. J Biol Chem, 1989. **264**(21): p. 12520-5.
51. Samuel, J.E., et al., *Comparison of the glycolipid receptor specificities of Shiga-like toxin type II and Shiga-like toxin type II variants*. Infect Immun, 1990. **58**(3): p. 611-8.
52. Jacewicz, M.S., et al., *Responses of human intestinal microvascular endothelial cells to Shiga toxins 1 and 2 and pathogenesis of hemorrhagic colitis*. Infect Immun, 1999. **67**(3): p. 1439-44.
53. Ren, J., et al., *Localization of verotoxin receptors in nervous system*. Brain Res, 1999. **825**(1-2): p. 183-8.
54. Arbus, G.S., *Association of verotoxin-producing E. coli and verotoxin with hemolytic uremic syndrome*. Kidney Int Suppl, 1997. **58**: p. S91-6.
55. Kiarash, A., B. Boyd, and C.A. Lingwood, *Glycosphingolipid receptor function is modified by fatty acid content. Verotoxin 1 and verotoxin 2c preferentially recognize different globotriaosyl ceramide fatty acid homologues*. J Biol Chem, 1994. **269**(15): p. 11138-46.
56. Sandvig, K., et al., *Importance of glycolipid synthesis for butyric acid-induced sensitization to shiga toxin and intracellular sorting of toxin in A431 cells*. Mol Biol Cell, 1996. **7**(9): p. 1391-404.
57. Paton, J.C. and A.W. Paton, *Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing Escherichia coli infections*. Clin Microbiol Rev, 1998. **11**(3): p. 450-79.
58. Sandvig, K., et al., *Endocytosis from coated pits of Shiga toxin: a glycolipid-binding protein from Shigella dysenteriae 1*. J Cell Biol, 1989. **108**(4): p. 1331-43.
59. Lauvrak, S.U., M.L. Torgersen, and K. Sandvig, *Efficient endosome-to-Golgi transport of Shiga toxin is dependent on dynamin and clathrin*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 11): p. 2321-31.
60. Nichols, B.J., et al., *Rapid cycling of lipid raft markers between the cell surface and Golgi complex*. J Cell Biol, 2001. **153**(3): p. 529-41.
61. Saint-Pol, A., et al., *Clathrin adaptor epsinR is required for retrograde sorting on early endosomal membranes*. Dev Cell, 2004. **6**(4): p. 525-38.
62. Lingwood, C.A., *Role of verotoxin receptors in pathogenesis*. Trends Microbiol, 1996. **4**(4): p. 147-53.
63. Kurmanova, A., et al., *Structural requirements for furin-induced cleavage and activation of Shiga toxin*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **357**(1): p. 144-9.
64. Lea, N., J.M. Lord, and L.M. Roberts, *Proteolytic cleavage of the A subunit is essential for maximal cytotoxicity of Escherichia coli O157:H7 Shiga-like toxin-1*. Microbiology, 1999. **145 (Pt 5)**: p. 999-1004.
65. Furie, B. and B.C. Furie, *Mechanisms of thrombus formation*. N Engl J Med, 2008. **359**(9): p. 938-49.

66. Pease, D.C., *An electron microscopic study of red bone marrow*. Blood, 1956. **11**(6): p. 501-26.
67. Rendu, F. and B. Brohard-Bohn, *The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions*. Platelets, 2001. **12**(5): p. 261-73.
68. Heemskerk, J.W., E.M. Bevers, and T. Lindhout, *Platelet activation and blood coagulation*. Thromb Haemost, 2002. **88**(2): p. 186-93.
69. Kroll, M.H., et al., *Platelets and shear stress*. Blood, 1996. **88**(5): p. 1525-41.
70. Nieswandt, B. and S.P. Watson, *Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor?* Blood, 2003. **102**(2): p. 449-61.
71. Jackson, S.P., W.S. Nesbitt, and S. Kulkarni, *Signaling events underlying thrombus formation*. J Thromb Haemost, 2003. **1**(7): p. 1602-12.
72. Andrews, R.K., et al., *Platelet interactions in thrombosis*. IUBMB Life, 2004. **56**(1): p. 13-8.
73. Fox, J.E., *The platelet cytoskeleton*. Thromb Haemost, 1993. **70**(6): p. 884-93.
74. Xiong, J.P., et al., *New insights into the structural basis of integrin activation*. Blood, 2003. **102**(4): p. 1155-9.
75. Cines, D.B., et al., *Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders*. Blood, 1998. **91**(10): p. 3527-61.
76. Ashby, B., J.L. Daniel, and J.B. Smith, *Mechanisms of platelet activation and inhibition*. Hematol Oncol Clin North Am, 1990. **4**(1): p. 1-26.
77. Minors, D.S., *Haemostasis, blood platelets and coagulation*. Anaesthesia & Intensive Care Medicine, 2007. **8**(5): p. 214-216.
78. Monroe, D.M.H., M. ; Roberts, H.R., *MOLECULAR BIOLOGY AND BIOCHEMISTRY OF THE COAGULATION FACTORS AND PATHWAYS OF HEMOSTASIS*, in *Williams Hematology 2010*, McGraw-Hill Professional Publishing: New York.
79. Lasne, D., B. Jude, and S. Susen, *From normal to pathological hemostasis*. Can J Anaesth, 2006. **53**(6 Suppl): p. S2-11.
80. Mackman, N., *Tissue-specific hemostasis: role of tissue factor*. J Thromb Haemost, 2008. **6**(2): p. 303-5.
81. Mackman, N., R.E. Tilley, and N.S. Key, *Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(8): p. 1687-93.
82. Manly, D.A., J. Boles, and N. Mackman, *Role of tissue factor in venous thrombosis*. Annu Rev Physiol, 2011. **73**: p. 515-25.
83. Owens, A.P., 3rd and N. Mackman, *Tissue factor and thrombosis: The clot starts here*. Thromb Haemost, 2010. **104**(3): p. 432-9.
84. Hall, J.E., *Hemostasis and blood coagulation*, in *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology 2010*, Elsevier Health Sciences: Philadelphia. p. 457-459.
85. Kumar, V.A., A.K. ; Fausto, N. ; Aster, J.C., *Hemodynamic disorders, thromboembolic disease and shock*, in *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease 2010*, Saunders Elsevier: Philadelphia. p. 118-120.
86. Sabir, I., et al., *Oral anticoagulants for Asian patients with atrial fibrillation*. Nat Rev Cardiol, 2014. **11**(5): p. 290-303.
87. Triplett, D.A., *Coagulation and bleeding disorders: review and update*. Clin Chem, 2000. **46**(8 Pt 2): p. 1260-9.
88. Bombeli, T. and D.R. Spahn, *Updates in perioperative coagulation: physiology and management of thromboembolism and haemorrhage*. Br J Anaesth, 2004. **93**(2): p. 275-87.
89. Ruggenenti, P., M. Noris, and G. Remuzzi, *Thrombotic microangiopathy, hemolytic uremic syndrome, and thrombotic thrombocytopenic purpura*. Kidney Int, 2001. **60**(3): p. 831-46.

90. Obrig, T.G., et al., *Endothelial heterogeneity in Shiga toxin receptors and responses*. J Biol Chem, 1993. **268**(21): p. 15484-8.
91. Fong, J.S. and B.S. Kaplan, *Impairment of platelet aggregation in hemolytic uremic syndrome: evidence for platelet "exhaustion"*. Blood, 1982. **60**(3): p. 564-70.
92. Sassetti, B., et al., *Hemolytic uremic syndrome in children: platelet aggregation and membrane glycoproteins*. J Pediatr Hematol Oncol, 1999. **21**(2): p. 123-8.
93. Appiani, A.C., et al., *The relationship between plasma levels of the factor VIII complex and platelet release products (beta-thromboglobulin and platelet factor 4) in children with the hemolytic-uremic syndrome*. Clin Nephrol, 1982. **17**(4): p. 195-9.
94. Walters, M.D., et al., *Intravascular platelet activation in the hemolytic uremic syndrome*. Kidney Int, 1988. **33**(1): p. 107-15.
95. Katayama, M., et al., *Soluble P-selectin is present in normal circulation and its plasma level is elevated in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura and haemolytic uraemic syndrome*. Br J Haematol, 1993. **84**(4): p. 702-10.
96. Rose, P.E., et al., *Verotoxin and neuraminidase induced platelet aggregating activity in plasma: their possible role in the pathogenesis of the haemolytic uraemic syndrome*. J Clin Pathol, 1985. **38**(4): p. 438-41.
97. Yoshimura, K., et al., *No direct effects of Shiga toxin 1 and 2 on the aggregation of human platelets in vitro*. Thromb Haemost, 1998. **80**(3): p. 529-30.
98. Thorpe, C.M., et al., *Shiga toxins do not directly stimulate alpha-granule secretion or enhance aggregation of human platelets*. Acta Haematol, 1999. **102**(1): p. 51-5.
99. Stahl, A.L., et al., *Shiga toxin and lipopolysaccharide induce platelet-leukocyte aggregates and tissue factor release, a thrombotic mechanism in hemolytic uremic syndrome*. PLoS One, 2009. **4**(9): p. e6990.
100. Moake, J.L., *Haemolytic-uraemic syndrome: basic science*. Lancet, 1994. **343**(8894): p. 393-7.
101. Ishii, H., et al., *Verotoxin-1 induces tissue factor expression in human umbilical vein endothelial cells through activation of NF-kappaB/Rel and AP-1*. Thromb Haemost, 2000. **84**(4): p. 712-21.
102. Nestoridi, E., et al., *Shiga toxin enhances functional tissue factor on human glomerular endothelial cells: implications for the pathophysiology of hemolytic uremic syndrome*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(4): p. 752-62.
103. Morigi, M., et al., *Verotoxin-1-induced up-regulation of adhesive molecules renders microvascular endothelial cells thrombogenic at high shear stress*. Blood, 2001. **98**(6): p. 1828-35.
104. Louise, C.B. and T.G. Obrig, *Human renal microvascular endothelial cells as a potential target in the development of the hemolytic uremic syndrome as related to fibrinolysis factor expression, in vitro*. Microvasc Res, 1994. **47**(3): p. 377-87.
105. Karch, H., et al., *Purified verotoxins of Escherichia coli O157:H7 decrease prostacyclin synthesis by endothelial cells*. Microb Pathog, 1988. **5**(3): p. 215-21.
106. Adler, S. and R. Bollu, *Glomerular endothelial cell injury mediated by shiga-like toxin-1*. Kidney Blood Press Res, 1998. **21**(1): p. 13-21.
107. Guessous, F., et al., *Shiga toxin 2 and lipopolysaccharide induce human microvascular endothelial cells to release chemokines and factors that stimulate platelet function*. Infect Immun, 2005. **73**(12): p. 8306-16.
108. Robson, W.L., G.H. Fick, and P.C. Wilson, *Prognostic factors in typical postdiarrhea hemolytic-uremic syndrome*. Child Nephrol Urol, 1988. **9**(4): p. 203-7.

109. Lopez, E.L., et al., *Association between severity of gastrointestinal prodrome and long-term prognosis in classic hemolytic-uremic syndrome*. J Pediatr, 1992. **120**(2 Pt 1): p. 210-5.
110. Brandt, J.R., et al., *Cholelithiasis following Escherichia coli O157:H7-associated hemolytic uremic syndrome*. Pediatr Nephrol, 1998. **12**(3): p. 222-5.
111. Buteau, C., et al., *Leukocytosis in children with Escherichia coli O157:H7 enteritis developing the hemolytic-uremic syndrome*. Pediatr Infect Dis J, 2000. **19**(7): p. 642-7.
112. Salzman, M.B., R.B. Ettenger, and J.D. Cherry, *Leukocytosis in hemolytic-uremic syndrome*. Pediatr Infect Dis J, 1991. **10**(6): p. 470-1.
113. Bell, B.P., et al., *Predictors of hemolytic uremic syndrome in children during a large outbreak of Escherichia coli O157:H7 infections*. Pediatrics, 1997. **100**(1): p. E12.
114. Milford, D.V., et al., *Prognostic markers in diarrhoea-associated haemolytic-uraemic syndrome: initial neutrophil count, human neutrophil elastase and von Willebrand factor antigen*. Nephrol Dial Transplant, 1991. **6**(4): p. 232-7.
115. Siegler, R.L., et al., *A 20-year population-based study of postdiarrheal hemolytic uremic syndrome in Utah*. Pediatrics, 1994. **94**(1): p. 35-40.
116. Walters, M.D., et al., *The polymorphonuclear leucocyte count in childhood haemolytic uraemic syndrome*. Pediatr Nephrol, 1989. **3**(2): p. 130-4.
117. Coad, N.A., et al., *Changes in the postenteropathic form of the hemolytic uremic syndrome in children*. Clin Nephrol, 1991. **35**(1): p. 10-6.
118. Inward, C.D., et al., *Renal histopathology in fatal cases of diarrhoea-associated haemolytic uraemic syndrome*. British Association for Paediatric Nephrology. Pediatr Nephrol, 1997. **11**(5): p. 556-9.
119. van Setten, P.A., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 levels in urine and serum of patients with hemolytic uremic syndrome*. Pediatr Res, 1998. **43**(6): p. 759-67.
120. Zoja, C., et al., *Shiga toxin-2 triggers endothelial leukocyte adhesion and transmigration via NF-kappaB dependent up-regulation of IL-8 and MCP-1*. Kidney Int, 2002. **62**(3): p. 846-56.
121. Inward, C.D., et al., *Cytokines in haemolytic uraemic syndrome associated with verocytotoxin-producing Escherichia coli infection*. Arch Dis Child, 1997. **77**(2): p. 145-7.
122. Lentsch, A.B. and P.A. Ward, *Regulation of inflammatory vascular damage*. J Pathol, 2000. **190**(3): p. 343-8.
123. Weiss, S.J., *Tissue destruction by neutrophils*. N Engl J Med, 1989. **320**(6): p. 365-76.
124. Fernandez, G.C., et al., *Relevance of neutrophils in the murine model of haemolytic uraemic syndrome: mechanisms involved in Shiga toxin type 2-induced neutrophilia*. Clin Exp Immunol, 2006. **146**(1): p. 76-84.
125. Fernandez, G.C., et al., *Shiga toxin-2 induces neutrophilia and neutrophil activation in a murine model of hemolytic uremic syndrome*. Clin Immunol, 2000. **95**(3): p. 227-34.
126. Milford, D., et al., *Neutrophil elastases and haemolytic uraemic syndrome*. Lancet, 1989. **2**(8672): p. 1153.
127. Fitzpatrick, M.M., et al., *Interleukin-8 and polymorphoneutrophil leucocyte activation in hemolytic uremic syndrome of childhood*. Kidney Int, 1992. **42**(4): p. 951-6.
128. Fitzpatrick, M.M., et al., *Neutrophil activation in the haemolytic uraemic syndrome: free and complexed elastase in plasma*. Pediatr Nephrol, 1992. **6**(1): p. 50-3.
129. Ishikawa, N., et al., *Plasma levels of granulocyte elastase-alpha1-proteinase inhibitor complex in children with hemolytic uremic syndrome caused by verotoxin-producing Escherichia coli*. Pediatr Int, 2000. **42**(6): p. 637-41.

130. Vierzig, A., et al., *A 12-year-old boy with fatal hemolytic-uremic-syndrome, excessive neutrophilia and elevated endogenous granulocyte-colony-stimulating-factor serum concentrations*. Clin Nephrol, 1998. **50**(1): p. 56-9.
131. Fernandez, G.C., et al., *Phenotype markers and function of neutrophils in children with hemolytic uremic syndrome*. Pediatr Nephrol, 2002. **17**(5): p. 337-44.
132. Forsyth, K.D., et al., *Neutrophil-mediated endothelial injury in haemolytic uraemic syndrome*. Lancet, 1989. **2**(8660): p. 411-4.
133. Fernandez, G.C., et al., *Impaired neutrophils in children with the typical form of hemolytic uremic syndrome*. Pediatr Nephrol, 2005. **20**(9): p. 1306-14.
134. Brigotti, M., et al., *Endothelial damage induced by Shiga toxins delivered by neutrophils during transmigration*. J Leukoc Biol, 2010. **88**(1): p. 201-10.
135. Palermo, M.S., et al., *Depletion of liver and splenic macrophages reduces the lethality of Shiga toxin-2 in a mouse model*. Clin Exp Immunol, 1999. **116**(3): p. 462-7.
136. Fernandez, G.C., et al., *Cytokine production is altered in monocytes from children with hemolytic uremic syndrome*. J Clin Immunol, 2012. **32**(3): p. 622-31.
137. Ramos, M.V., et al., *Association of haemolytic uraemic syndrome with dysregulation of chemokine receptor expression in circulating monocytes*. Clin Sci (Lond), 2015. **129**(3): p. 235-44.
138. Proulx, F., et al., *Circulating granulocyte colony-stimulating factor, C-X-C, and C-C chemokines in children with Escherichia coli O157:H7 associated hemolytic uremic syndrome*. Pediatr Res, 2002. **52**(6): p. 928-34.
139. van de Kar, N.C., et al., *Tumor necrosis factor and interleukin-1 induce expression of the verocytotoxin receptor globotriaosylceramide on human endothelial cells: implications for the pathogenesis of the hemolytic uremic syndrome*. Blood, 1992. **80**(11): p. 2755-64.
140. Zoja, C., S. Buelli, and M. Morigi, *Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: pathophysiology of endothelial dysfunction*. Pediatr Nephrol, 2010. **25**(11): p. 2231-40.
141. Nawroth, P.P. and D.M. Stern, *Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor*. J Exp Med, 1986. **163**(3): p. 740-5.
142. Nawroth, P.P., et al., *Interleukin 1 induces endothelial cell procoagulant while suppressing cell-surface anticoagulant activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(10): p. 3460-4.
143. Herbert, J.M., et al., *IL-4 inhibits LPS-, IL-1 beta- and TNF alpha-induced expression of tissue factor in endothelial cells and monocytes*. FEBS Lett, 1992. **310**(1): p. 31-3.
144. Proulx, F., et al., *Increased circulating levels of lipopolysaccharide binding protein in children with Escherichia coli O157:H7 hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome*. Clin Diagn Lab Immunol, 1999. **6**(5): p. 773.
145. Proulx, F., et al., *Inflammatory mediators in Escherichia coli O157:H7 hemorrhagic colitis and hemolytic-uremic syndrome*. Pediatr Infect Dis J, 1998. **17**(10): p. 899-904.
146. van de Kar, N.C., et al., *Plasma cytokine levels in hemolytic uremic syndrome*. Nephron, 1995. **71**(3): p. 309-13.
147. Karpman, D., et al., *Cytokines in childhood hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura*. Pediatr Nephrol, 1995. **9**(6): p. 694-9.
148. Proulx, F., et al., *Circulating levels of transforming growth factor-beta1 and lymphokines among children with hemolytic uremic syndrome*. Am J Kidney Dis, 2000. **35**(1): p. 29-34.
149. Yamamoto, T., et al., *[Evaluation of thrombomodulin and tumor necrosis factor-alpha levels in patients with hemolytic uremic syndrome caused by enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 infection]*. Nihon Jinzo Gakkai Shi, 1999. **41**(2): p. 60-4.
150. Inward, C.D., et al., *Soluble circulating cell adhesion molecules in haemolytic uraemic syndrome*. Pediatr Nephrol, 1995. **9**(5): p. 574-8.

151. Ray, P.E., et al., *Basic fibroblast growth factor in HIV-associated hemolytic uremic syndrome*. *Pediatr Nephrol*, 1999. **13**(7): p. 586-93.
152. Benigni, A., et al., *Urinary excretion of platelet-activating factor in haemolytic uraemic syndrome*. *Lancet*, 1992. **339**(8797): p. 835-6.
153. Deuel, T.F., et al., *Platelet factor 4 is chemotactic for neutrophils and monocytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981. **78**(7): p. 4584-7.
154. Deuel, T.F., et al., *Chemotaxis of monocytes and neutrophils to platelet-derived growth factor*. *J Clin Invest*, 1982. **69**(4): p. 1046-9.
155. Aziz, K.A., J.C. Cawley, and M. Zuzel, *Platelets prime PMN via released PF4: mechanism of priming and synergy with GM-CSF*. *Br J Haematol*, 1995. **91**(4): p. 846-53.
156. Kameyoshi, Y., et al., *Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils*. *J Exp Med*, 1992. **176**(2): p. 587-92.
157. Brandt, E., et al., *The beta-thromboglobulins and platelet factor 4: blood platelet-derived CXC chemokines with divergent roles in early neutrophil regulation*. *J Leukoc Biol*, 2000. **67**(4): p. 471-8.
158. Freedman, J.E. and J. Loscalzo, *Platelet-monocyte aggregates: bridging thrombosis and inflammation*. *Circulation*, 2002. **105**(18): p. 2130-2.
159. Huo, Y., et al., *Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E*. *Nat Med*, 2003. **9**(1): p. 61-7.
160. RP, M., *P-selectin/PSGL-1 and other interactions between platelets, leukocytes and endothelium*, ed. N.Y.A.P.E. Sciences2002: Michelson AD.
161. Cambien, B. and D.D. Wagner, *A new role in hemostasis for the adhesion receptor P-selectin*. *Trends Mol Med*, 2004. **10**(4): p. 179-86.
162. Simon, D.I., et al., *Platelet glycoprotein Iba1 is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18)*. *J Exp Med*, 2000. **192**(2): p. 193-204.
163. Weber, C. and T.A. Springer, *Neutrophil accumulation on activated, surface-adherent platelets in flow is mediated by interaction of Mac-1 with fibrinogen bound to alphaIIb beta3 and stimulated by platelet-activating factor*. *J Clin Invest*, 1997. **100**(8): p. 2085-93.
164. May, A.E., et al., *Platelet-leukocyte interactions in inflammation and atherothrombosis*. *Semin Thromb Hemost*, 2007. **33**(2): p. 123-7.
165. Weyrich, A.S., et al., *Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes*. *J Clin Invest*, 1996. **97**(6): p. 1525-34.
166. Blanks, J.E., et al., *Stimulation of P-selectin glycoprotein ligand-1 on mouse neutrophils activates beta 2-integrin mediated cell attachment to ICAM-1*. *Eur J Immunol*, 1998. **28**(2): p. 433-43.
167. Hidari, K.I., et al., *Engagement of P-selectin glycoprotein ligand-1 enhances tyrosine phosphorylation and activates mitogen-activated protein kinases in human neutrophils*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(45): p. 28750-6.
168. Peters, M.J., et al., *Circulating platelet-neutrophil complexes represent a subpopulation of activated neutrophils primed for adhesion, phagocytosis and intracellular killing*. *Br J Haematol*, 1999. **106**(2): p. 391-9.
169. Stahl, A.L., L. Sartz, and D. Karpman, *Complement activation on platelet-leukocyte complexes and microparticles in enterohemorrhagic Escherichia coli-induced hemolytic uremic syndrome*. *Blood*, 2011. **117**(20): p. 5503-13.
170. Henn, V., et al., *CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells*. *Nature*, 1998. **391**(6667): p. 591-4.

171. Henn, V., et al., *The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40*. Blood, 2001. **98**(4): p. 1047-54.
172. Schonbeck, U. and P. Libby, *The CD40/CD154 receptor/ligand dyad*. Cell Mol Life Sci, 2001. **58**(1): p. 4-43.
173. Inwald, D.P., et al., *CD40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation*. Circ Res, 2003. **92**(9): p. 1041-8.
174. Andre, P., et al., *CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin--dependent mechanism*. Nat Med, 2002. **8**(3): p. 247-52.
175. Vanichakarn, P., et al., *Neutrophil CD40 enhances platelet-mediated inflammation*. Thromb Res, 2008. **122**(3): p. 346-58.
176. Chakrabarti, S., et al., *CD40 ligand influences platelet release of reactive oxygen intermediates*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(11): p. 2428-34.
177. Chen, C., et al., *Soluble CD40 ligand induces endothelial dysfunction in human and porcine coronary artery endothelial cells*. Blood, 2008. **112**(8): p. 3205-16.
178. Urbich, C., et al., *CD40 ligand inhibits endothelial cell migration by increasing production of endothelial reactive oxygen species*. Circulation, 2002. **106**(8): p. 981-6.
179. Mach, F., U. Schonbeck, and P. Libby, *CD40 signaling in vascular cells: a key role in atherosclerosis?* Atherosclerosis, 1998. **137 Suppl**: p. S89-95.
180. Bowie, A. and L.A. O'Neill, *Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries*. Biochem Pharmacol, 2000. **59**(1): p. 13-23.
181. Bavendiek, U., et al., *Induction of tissue factor expression in human endothelial cells by CD40 ligand is mediated via activator protein 1, nuclear factor kappa B, and Egr-1*. J Biol Chem, 2002. **277**(28): p. 25032-9.
182. Khechai, F., et al., *Effect of advanced glycation end product-modified albumin on tissue factor expression by monocytes. Role of oxidant stress and protein tyrosine kinase activation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. **17**(11): p. 2885-90.
183. Sanguigni, V., et al., *CD40 ligand enhances monocyte tissue factor expression and thrombin generation via oxidative stress in patients with hypercholesterolemia*. J Am Coll Cardiol, 2005. **45**(1): p. 35-42.
184. Thomas, M.R. and R.F. Storey, *The role of platelets in inflammation*. Thromb Haemost, 2015. **114**(3): p. 449-58.
185. Charles A Janeway, J., Paul Travers, Mark Walport, and Mark J Shlomchik., *The Immune System in Health and Disease, in Immunobiology*2001, Garland Science: New York.
186. Speth, C.W.r., R.; Stoiber, H.; and Dierich, M. P., *Complement In Fundamental Immunology*, ed. W.E. Paul2008, Philadelphia: Lippincott-Raven.
187. Ricklin, D. and J.D. Lambris, *Complement in immune and inflammatory disorders: pathophysiological mechanisms*. J Immunol, 2013. **190**(8): p. 3831-8.
188. Goodship, T.H., *Atypical HUS and complement dysregulation*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(7): p. 1775-6.
189. Cameron, J.S. and R. Vick, *Letter: Plasma-C3 in haemolytic-uraemic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura*. Lancet, 1973. **2**(7835): p. 975.
190. Kaplan, B.S., P.D. Thomson, and G.M. MacNab, *Letter: Serum-complement levels in haemolytic-uraemic syndrome*. Lancet, 1973. **2**(7844): p. 1505-6.
191. Monnens, L., et al., *Letter: Serum-complement levels in haemolytic-uraemic syndrome*. Lancet, 1974. **2**(7875): p. 294.
192. Monnens, L., et al., *The complement system in hemolytic-uremic syndrome in childhood*. Clin Nephrol, 1980. **13**(4): p. 168-71.

193. Robson, W.L., et al., *Hypocomplementemia and leukocytosis in diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome*. *Nephron*, 1992. **62**(3): p. 296-9.
194. Lapeyraque, A.L., et al., *Eculizumab in severe Shiga-toxin-associated HUS*. *N Engl J Med*, 2011. **364**(26): p. 2561-3.
195. Thurman, J.M., et al., *Alternative pathway of complement in children with diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome*. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2009. **4**(12): p. 1920-4.
196. Morigi, M., et al., *Alternative pathway activation of complement by Shiga toxin promotes exuberant C3a formation that triggers microvascular thrombosis*. *J Immunol*, 2011. **187**(1): p. 172-80.
197. Del Conde, I., et al., *Platelet activation leads to activation and propagation of the complement system*. *J Exp Med*, 2005. **201**(6): p. 871-9.
198. Wiedmer, T. and P.J. Sims, *Effect of complement proteins C5b-9 on blood platelets. Evidence for reversible depolarization of membrane potential*. *J Biol Chem*, 1985. **260**(13): p. 8014-9.
199. Ando, B., et al., *Complement proteins C5b-9 initiate secretion of platelet storage granules without increased binding of fibrinogen or von Willebrand factor to newly expressed cell surface GPIIb-IIIa*. *J Biol Chem*, 1988. **263**(24): p. 11907-14.
200. Wiedmer, T., C.T. Esmon, and P.J. Sims, *On the mechanism by which complement proteins C5b-9 increase platelet prothrombinase activity*. *J Biol Chem*, 1986. **261**(31): p. 14587-92.
201. Sims, P.J., et al., *Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity*. *J Biol Chem*, 1988. **263**(34): p. 18205-12.
202. Lee, B.C., et al., *Quiescent complement in nonhuman primates during E coli Shiga toxin-induced hemolytic uremic syndrome and thrombotic microangiopathy*. *Blood*, 2013. **122**(5): p. 803-6.
203. Orth, D., et al., *Shiga toxin activates complement and binds factor H: evidence for an active role of complement in hemolytic uremic syndrome*. *J Immunol*, 2009. **182**(10): p. 6394-400.
204. Chance, B., H. Sies, and A. Boveris, *Hydroperoxide metabolism in mammalian organs*. *Physiol Rev*, 1979. **59**(3): p. 527-605.
205. Kasai, H., et al., *Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in liver DNA of rats following long-term exposure to a peroxisome proliferator*. *Cancer Res*, 1989. **49**(10): p. 2603-5.
206. Park, J.Y., M.K. Shigenaga, and B.N. Ames, *Induction of cytochrome P4501A1 by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin or indolo(3,2-b)carbazole is associated with oxidative DNA damage*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(6): p. 2322-7.
207. Brown, G.E., et al., *Distinct ligand-dependent roles for p38 MAPK in priming and activation of the neutrophil NADPH oxidase*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(26): p. 27059-68.
208. Zhao, T., et al., *The molecular basis for adhesion-mediated suppression of reactive oxygen species generation by human neutrophils*. *J Clin Invest*, 2003. **112**(11): p. 1732-40.
209. Rajagopalan, S., et al., *Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone*. *J Clin Invest*, 1996. **97**(8): p. 1916-23.
210. Fleming, I., et al., *Endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase (Cytochrome P450 2C9) is a functionally significant source of reactive oxygen species in coronary arteries*. *Circ Res*, 2001. **88**(1): p. 44-51.
211. Griendling, K.K., D. Sorescu, and M. Ushio-Fukai, *NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease*. *Circ Res*, 2000. **86**(5): p. 494-501.
212. Griendling, K.K. and G.A. FitzGerald, *Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS*. *Circulation*, 2003. **108**(16): p. 1912-6.

213. Vasquez-Vivar, J., et al., *Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(16): p. 9220-5.
214. Wolin, M.S., S.A. Gupte, and R.A. Oeckler, *Superoxide in the vascular system*. J Vasc Res, 2002. **39**(3): p. 191-207.
215. Caccese, D., et al., *Superoxide anion and hydroxyl radical release by collagen-induced platelet aggregation--role of arachidonic acid metabolism*. Thromb Haemost, 2000. **83**(3): p. 485-90.
216. Finazzi-Agro, A., et al., *Hydrogen peroxide release from human blood platelets*. Biochim Biophys Acta, 1982. **718**(1): p. 21-5.
217. Wachowicz, B., et al., *Generation of reactive oxygen species in blood platelets*. Platelets, 2002. **13**(3): p. 175-82.
218. Krotz, F., et al., *NAD(P)H oxidase-dependent platelet superoxide anion release increases platelet recruitment*. Blood, 2002. **100**(3): p. 917-24.
219. Iuliano, L., et al., *Oxygen free radicals and platelet activation*. Free Radic Biol Med, 1997. **22**(6): p. 999-1006.
220. Pignatelli, P., et al., *Carnitine inhibits arachidonic acid turnover, platelet function, and oxidative stress*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. **284**(1): p. H41-8.
221. McVeigh, G.E., et al., *Platelet nitric oxide and superoxide release during the development of nitrate tolerance: effect of supplemental ascorbate*. Circulation, 2002. **106**(2): p. 208-13.
222. Salvemini, D., et al., *Diphenylene iodonium, an inhibitor of free radical formation, inhibits platelet aggregation*. Eur J Pharmacol, 1991. **199**(1): p. 15-8.
223. Leo, R., et al., *Platelet activation by superoxide anion and hydroxyl radicals intrinsically generated by platelets that had undergone anoxia and then reoxygenated*. Circulation, 1997. **95**(4): p. 885-91.
224. Tajima, M. and H. Sakagami, *Tetrahydrobiopterin impairs the action of endothelial nitric oxide via superoxide derived from platelets*. Br J Pharmacol, 2000. **131**(5): p. 958-64.
225. Sohn, H.Y., et al., *The small G-protein Rac mediates depolarization-induced superoxide formation in human endothelial cells*. J Biol Chem, 2000. **275**(25): p. 18745-50.
226. Lassegue, B. and R.E. Clempus, *Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2003. **285**(2): p. R277-97.
227. Freedman, J.E., et al., *alpha-Tocopherol and protein kinase C inhibition enhance platelet-derived nitric oxide release*. FASEB J, 2000. **14**(15): p. 2377-9.
228. Singh, D., et al., *Evidence for the generation of hydroxyl radical during arachidonic acid metabolism by human platelets*. Am J Hematol, 1981. **11**(3): p. 233-40.
229. Jahn, B. and G.M. Hansch, *Oxygen radical generation in human platelets: dependence on 12-lipoxygenase activity and on the glutathione cycle*. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1990. **93**(1): p. 73-9.
230. Li, H., Z.M. Marshall, and A.R. Whorton, *Stimulation of cystine uptake by nitric oxide: regulation of endothelial cell glutathione levels*. Am J Physiol, 1999. **276**(4 Pt 1): p. C803-11.
231. Foyer, C.H. and B. Halliwell, *The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism*. Planta, 1976. **133**(1): p. 21-5.
232. Noctor, G. and C.H. Foyer, *ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control*. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1998. **49**: p. 249-279.
233. Hoidal, J.R., *Reactive oxygen species and cell signaling*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001. **25**(6): p. 661-3.
234. Deneke, S.M. and B.L. Fanburg, *Regulation of cellular glutathione*. Am J Physiol, 1989. **257**(4 Pt 1): p. L163-73.

235. Ho, E., G. Chen, and T.M. Bray, *Supplementation of N-acetylcysteine inhibits NFkappaB activation and protects against alloxan-induced diabetes in CD-1 mice*. FASEB J, 1999. **13**(13): p. 1845-54.
236. Durackova, Z., *Some current insights into oxidative stress*. Physiol Res, 2010. **59**(4): p. 459-69.
237. Arfsten, D., et al., *Impact of 30-day oral dosing with N-acetyl-L-cysteine on Sprague-Dawley rat physiology*. Int J Toxicol, 2004. **23**(4): p. 239-47.
238. Millea, P.J., *N-acetylcysteine: multiple clinical applications*. Am Fam Physician, 2009. **80**(3): p. 265-9.
239. Kelly, G.S., *Clinical applications of N-acetylcysteine*. Altern Med Rev, 1998. **3**(2): p. 114-27.
240. Cotgreave, I.A., *N-acetylcysteine: pharmacological considerations and experimental and clinical applications*. Adv Pharmacol, 1997. **38**: p. 205-27.
241. Aruoma, O.I., et al., *The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid*. Free Radic Biol Med, 1989. **6**(6): p. 593-7.
242. Moldeus, P., I.A. Cotgreave, and M. Berggren, *Lung protection by a thiol-containing antioxidant: N-acetylcysteine*. Respiration, 1986. **50 Suppl 1**: p. 31-42.
243. Hsu, C.C., et al., *Five cysteine-containing compounds have antioxidative activity in Balb/cA mice*. J Nutr, 2004. **134**(1): p. 149-52.
244. Bressler, N.M., M.J. Broekman, and A.J. Marcus, *Concurrent studies of oxygen consumption and aggregation in stimulated human platelets*. Blood, 1979. **53**(2): p. 167-78.
245. Burch, J.W. and P.T. Burch, *Glutathione disulfide production during arachidonic acid oxygenation in human platelets*. Prostaglandins, 1990. **39**(2): p. 123-34.
246. Stuart, M.J. and H. Holmsen, *Hydrogen peroxide, an inhibitor of platelet function: effect on adenine nucleotide metabolism, and the release reaction*. Am J Hematol, 1977. **2**(1): p. 53-63.
247. Ambrosio, G., et al., *Modulation of platelet function by reactive oxygen metabolites*. Am J Physiol, 1994. **267**(1 Pt 2): p. H308-18.
248. Pratico, D., et al., *Hydrogen peroxide as trigger of platelet aggregation*. Haemostasis, 1991. **21**(3): p. 169-74.
249. Handin, R.I., R. Karabin, and G.J. Boxer, *Enhancement of platelet function by superoxide anion*. J Clin Invest, 1977. **59**(5): p. 959-65.
250. Salvemini, D., et al., *Superoxide anions enhance platelet adhesion and aggregation*. Br J Pharmacol, 1989. **97**(4): p. 1145-50.
251. De la Cruz, J.P., P.J. Garcia, and F. Sanchez de la Cuesta, *Dipyridamole inhibits platelet aggregation induced by oxygen-derived free radicals*. Thromb Res, 1992. **66**(4): p. 277-85.
252. Yin, K., et al., *Antithrombotic effects of peroxynitrite: inhibition and reversal of aggregation in human platelets*. Prostaglandins, 1995. **50**(3): p. 169-78.
253. Moro, M.A., et al., *Paradoxical fate and biological action of peroxynitrite on human platelets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(14): p. 6702-6.
254. Brown, A.S., et al., *Nitric oxide-dependent and independent effects on human platelets treated with peroxynitrite*. Cardiovasc Res, 1998. **40**(2): p. 380-8.
255. Balashova, T.S., et al., *[Hemolytic uremic syndrome as a clinical manifestation of oxidative stress]*. Vestn Ross Akad Med Nauk, 1996(9): p. 20-3.
256. Facorro, G., et al., *Oxidative stress and membrane fluidity in erythrocytes from patients with hemolytic uremic syndrome*. Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam, 1997. **47**(3): p. 137-46.

257. Li Volti, S., et al., *Impaired antioxidant defense mechanisms in two children with hemolytic-uremic syndrome*. Ren Fail, 1993. **15**(4): p. 523-8.
258. Turi, S., et al., *Oxidative damage of red blood cells in haemolytic uraemic syndrome*. Pediatr Nephrol, 1994. **8**(1): p. 26-9.
259. Ferraris, V., et al., *Oxidative stress status during the acute phase of haemolytic uraemic syndrome*. Nephrol Dial Transplant, 2011. **26**(3): p. 858-64.
260. Aiassa, V., et al., *Increased advanced oxidation of protein products and enhanced total antioxidant capacity in plasma by action of toxins of Escherichia coli STEC*. Toxicol In Vitro, 2011. **25**(1): p. 426-31.
261. Dubey, N.K., et al., *Free oxygen radicals in acute renal failure*. Indian Pediatr, 2000. **37**(2): p. 153-8.
262. Gomez, S.A., et al., *The oxidative stress induced in vivo by Shiga toxin-2 contributes to the pathogenicity of haemolytic uraemic syndrome*. Clin Exp Immunol, 2013. **173**(3): p. 463-72.
263. Gomez, S.A., et al., *Endogenous glucocorticoids modulate neutrophil function in a murine model of haemolytic uraemic syndrome*. Clin Exp Immunol, 2005. **139**(1): p. 65-73.
264. McEver, R.P., *P-selectin/PSGL-1 and other interactions between platelets, leukocytes and endothelium*, M. AD, Editor 2002, Academic Press/Elsevier Sciences: New York. p. 139-155.
265. Elalamy, I., et al., *Circulating platelet-leukocyte aggregates: a marker of microvascular injury in diabetic patients*. Thromb Res, 2008. **121**(6): p. 843-8.
266. Leguyader, A., et al., *Platelet activation after aortic prosthetic valve surgery*. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2006. **5**(1): p. 60-4.
267. Hsu-Lin, S., et al., *A platelet membrane protein expressed during platelet activation and secretion. Studies using a monoclonal antibody specific for thrombin-activated platelets*. J Biol Chem, 1984. **259**(14): p. 9121-6.
268. Berman, C.L., et al., *A platelet alpha granule membrane protein that is associated with the plasma membrane after activation. Characterization and subcellular localization of platelet activation-dependent granule-external membrane protein*. J Clin Invest, 1986. **78**(1): p. 130-7.
269. Ley, K., *Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process*. Cardiovasc Res, 1996. **32**(4): p. 733-42.
270. Campbell, J.J., et al., *Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions*. Science, 1998. **279**(5349): p. 381-4.
271. Wu, X., et al., *Fibrinogen mediates platelet-polymorphonuclear leukocyte cooperation during immune-complex glomerulonephritis in rats*. J Clin Invest, 1994. **94**(3): p. 928-36.
272. Berger, G., D.W. Hartwell, and D.D. Wagner, *P-Selectin and platelet clearance*. Blood, 1998. **92**(11): p. 4446-52.
273. Frijns, C.J., et al., *Soluble adhesion molecules reflect endothelial cell activation in ischemic stroke and in carotid atherosclerosis*. Stroke, 1997. **28**(11): p. 2214-8.
274. Blann, A.D., et al., *Evidence of platelet activation in hypertension*. J Hum Hypertens, 1997. **11**(9): p. 607-9.
275. Blann, A.D., et al., *Soluble P selectin in peripheral vascular disease: relationship to the location and extent of atherosclerotic disease and its risk factors*. Blood Coagul Fibrinolysis, 1996. **7**(8): p. 789-93.
276. Blann, A.D., et al., *Soluble P-selectin in atherosclerosis: a comparison with endothelial cell and platelet markers*. Thromb Haemost, 1997. **77**(6): p. 1077-80.
277. Facer, C.A. and A. Theodoridou, *Elevated plasma levels of P-selectin (GMP-140/CD62P) in patients with Plasmodium falciparum malaria*. Microbiol Immunol, 1994. **38**(9): p. 727-31.

278. Chong, B.H., et al., *Plasma P-selectin is increased in thrombotic consumptive platelet disorders*. Blood, 1994. **83**(6): p. 1535-41.
279. Halim, A., et al., *Plasma P selectin (GMP-140) and glycolalicin are elevated in preeclampsia and eclampsia: their significances*. Am J Obstet Gynecol, 1996. **174**(1 Pt 1): p. 272-7.
280. Jilma, B., et al., *Elevated circulating P-selectin in insulin dependent diabetes mellitus*. Thromb Haemost, 1996. **76**(3): p. 328-32.
281. Kamitsuji, H., K. Nonami, N. Ishikawa, T. Murakami, A. Nakayama, Y. Umeki, M. Nakajima, *PLASMA P-SELECTIN IN CHILDREN WITH HEMOLYTIC UREMIC SYN-DROME CAUSED BY ESCHERICHIA COLI O157: H7*. J. Nara Med. Assoc, 1999. **50**: p. 515-523.
282. Ushiyama, S., et al., *Structural and functional characterization of monomeric soluble P-selectin and comparison with membrane P-selectin*. J Biol Chem, 1993. **268**(20): p. 15229-37.
283. Mehta, P., et al., *Soluble monomeric P-selectin containing only the lectin and epidermal growth factor domains binds to P-selectin glycoprotein ligand-1 on leukocytes*. Blood, 1997. **90**(6): p. 2381-9.
284. Wong, C.S., et al., *Adhesion protein GMP140 inhibits superoxide anion release by human neutrophils*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(6): p. 2397-401.
285. Frenette, P.S., et al., *Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(16): p. 7450-4.
286. Kirchhofer, D., M.A. Riederer, and H.R. Baumgartner, *Specific accumulation of circulating monocytes and polymorphonuclear leukocytes on platelet thrombi in a vascular injury model*. Blood, 1997. **89**(4): p. 1270-8.
287. Spangenberg, P., et al., *The platelet glycoprotein IIb/IIIa complex is involved in the adhesion of activated platelets to leukocytes*. Thromb Haemost, 1993. **70**(3): p. 514-21.
288. Xiao, Z., P. Theroux, and M. Frojmovic, *Modulation of platelet-neutrophil interaction with pharmacological inhibition of fibrinogen binding to platelet GPIIb/IIIa receptor*. Thromb Haemost, 1999. **81**(2): p. 281-5.
289. Ruf, A., et al., *Contact-induced neutrophil activation by platelets in human cell suspensions and whole blood*. Blood, 1992. **80**(5): p. 1238-46.
290. Zhou, W., M.A. Javors, and M.S. Olson, *Platelet-activating factor as an intercellular signal in neutrophil-dependent platelet activation*. J Immunol, 1992. **149**(5): p. 1763-9.
291. Hirahashi, J., et al., *Mac-1 (CD11b/CD18) links inflammation and thrombosis after glomerular injury*. Circulation, 2009. **120**(13): p. 1255-65.
292. Brigotti, M., et al., *Shiga toxins present in the gut and in the polymorphonuclear leukocytes circulating in the blood of children with hemolytic-uremic syndrome*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(2): p. 313-7.
293. Fukuda, M.N., et al., *Structures of glycosphingolipids isolated from human granulocytes. The presence of a series of linear poly-N-acetyllactosaminylceramide and its significance in glycolipids of whole blood cells*. J Biol Chem, 1985. **260**(2): p. 1067-82.
294. Macher, B.A. and J.C. Klock, *Isolation and chemical characterization of neutral glycosphingolipids of human neutrophils*. J Biol Chem, 1980. **255**(5): p. 2092-6.
295. King, A.J., et al., *Shiga toxin induces superoxide production in polymorphonuclear cells with subsequent impairment of phagocytosis and responsiveness to phorbol esters*. J Infect Dis, 1999. **179**(2): p. 503-7.
296. Liu, J., et al., *Inhibition of neutrophil apoptosis by verotoxin 2 derived from Escherichia coli O157:H7*. Infect Immun, 1999. **67**(11): p. 6203-5.

297. Geelen, J.M., et al., *Lack of specific binding of Shiga-like toxin (verocytotoxin) and non-specific interaction of Shiga-like toxin 2 antibody with human polymorphonuclear leucocytes*. *Nephrol Dial Transplant*, 2007. **22**(3): p. 749-55.
298. Holle, J.U., et al., *Effect of verocytotoxins (Shiga-like toxins) on human neutrophils in vitro*. *Pediatr Nephrol*, 2005. **20**(9): p. 1237-44.
299. Flagler, M.J., et al., *Comparative analysis of the abilities of Shiga toxins 1 and 2 to bind to and influence neutrophil apoptosis*. *Infect Immun*, 2007. **75**(2): p. 760-5.
300. Burger, P.C. and D.D. Wagner, *Platelet P-selectin facilitates atherosclerotic lesion development*. *Blood*, 2003. **101**(7): p. 2661-6.
301. Ed Rainger, G., et al., *The role of platelets in the recruitment of leukocytes during vascular disease*. *Platelets*, 2015. **26**(6): p. 507-20.
302. Nagl, M., et al., *Phagocytosis and killing of bacteria by professional phagocytes and dendritic cells*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2002. **9**(6): p. 1165-8.
303. van Lookeren Campagne, M., C. Wiesmann, and E.J. Brown, *Macrophage complement receptors and pathogen clearance*. *Cell Microbiol*, 2007. **9**(9): p. 2095-102.
304. Mevorach, D., et al., *Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages*. *J Exp Med*, 1998. **188**(12): p. 2313-20.
305. Stahl, A.L., et al., *Factor H dysfunction in patients with atypical hemolytic uremic syndrome contributes to complement deposition on platelets and their activation*. *Blood*, 2008. **111**(11): p. 5307-15.
306. Peerschke, E.I., W. Yin, and B. Ghebrehiwet, *Platelet mediated complement activation*. *Adv Exp Med Biol*, 2008. **632**: p. 81-91.
307. Cole, D.S. and B.P. Morgan, *Beyond lysis: how complement influences cell fate*. *Clin Sci (Lond)*, 2003. **104**(5): p. 455-66.
308. Hansch, G.M., M. Seitz, and M. Betz, *Effect of the late complement components C5b-9 on human monocytes: release of prostanoids, oxygen radicals and of a factor inducing cell proliferation*. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1987. **82**(3-4): p. 317-20.
309. Seeger, W., et al., *Noncytolytic terminal complement complexes may serve as calcium gates to elicit leukotriene B4 generation in human polymorphonuclear leukocytes*. *J Immunol*, 1986. **137**(4): p. 1286-93.
310. Clancy, R.M., C.A. Dahinden, and T.E. Hugli, *Complement-mediated arachidonate metabolism*. *Prog Biochem Pharmacol*, 1985. **20**: p. 120-31.
311. Wiedmer, T., C.T. Esmon, and P.J. Sims, *Complement proteins C5b-9 stimulate procoagulant activity through platelet prothrombinase*. *Blood*, 1986. **68**(4): p. 875-80.
312. Esmon, C.T., *The impact of the inflammatory response on coagulation*. *Thromb Res*, 2004. **114**(5-6): p. 321-7.
313. Chandler, W.L., et al., *Prothrombotic coagulation abnormalities preceding the hemolytic-uremic syndrome*. *N Engl J Med*, 2002. **346**(1): p. 23-32.
314. Nurnberger, J., et al., *Eculizumab for atypical hemolytic-uremic syndrome*. *N Engl J Med*, 2009. **360**(5): p. 542-4.
315. Legendre, C.M., et al., *Terminal complement inhibitor eculizumab in atypical hemolytic-uremic syndrome*. *N Engl J Med*, 2013. **368**(23): p. 2169-81.
316. Rother, R.P., et al., *Discovery and development of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria*. *Nat Biotechnol*, 2007. **25**(11): p. 1256-64.
317. Wurzner, R., et al., *Treatment of enterohemorrhagic Escherichia coli-induced hemolytic uremic syndrome (eHUS)*. *Semin Thromb Hemost*, 2014. **40**(4): p. 508-16.

318. Kielstein JT, B.G., Fleig S, et al; Collaborators of the DGfN STECHUS registry., *Best supportive care and therapeutic plasma exchange with or without eculizumab in Shiga-toxin-producing E. coli O104:H4 induced haemolytic-uraemic syndrome: an analysis of the German STEC-HUS registry.* Nephrol Dial Transplant, 2012. **27**(10): p. 3807–3815.
319. Delmas, Y., et al., *Outbreak of Escherichia coli O104:H4 haemolytic uraemic syndrome in France: outcome with eculizumab.* Nephrol Dial Transplant, 2014. **29**(3): p. 565-72.
320. Menne, J., et al., *Validation of treatment strategies for enterohaemorrhagic Escherichia coli O104:H4 induced haemolytic uraemic syndrome: case-control study.* BMJ, 2012. **345**: p. e4565.
321. Hauswaldt, S., et al., *Lessons Learned From Outbreaks of Shiga Toxin Producing Escherichia coli.* Curr Infect Dis Rep, 2013. **15**(1): p. 4-9.
322. Freedman, J.E., *Oxidative stress and platelets.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(3): p. s11-6.
323. Walsh, G.M., et al., *Redox modulation of integrin [correction of integin] alpha IIb beta 3 involves a novel allosteric regulation of its thiol isomerase activity.* Biochemistry, 2004. **43**(2): p. 473-80.
324. Lahav, J., et al., *Sustained integrin ligation involves extracellular free sulfhydryls and enzymatically catalyzed disulfide exchange.* Blood, 2002. **100**(7): p. 2472-8.
325. Essex, D.W., *Redox control of platelet function.* Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(5): p. 1191-225.
326. Yan, B. and J.W. Smith, *A redox site involved in integrin activation.* J Biol Chem, 2000. **275**(51): p. 39964-72.
327. Heyman, S.N., et al., *N-acetylcysteine ameliorates renal microcirculation: studies in rats.* Kidney Int, 2003. **63**(2): p. 634-41.
328. Conesa, E.L., et al., *N-acetyl-L-cysteine improves renal medullary hypoperfusion in acute renal failure.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2001. **281**(3): p. R730-7.
329. Irani, K., et al., *Priming of platelet alphaIIb beta3 by oxidants is associated with tyrosine phosphorylation of beta3.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(11): p. 1698-706.
330. Gibson, K.R., et al., *Therapeutic potential of N-acetylcysteine as an antiplatelet agent in patients with type-2 diabetes.* Cardiovasc Diabetol, 2011. **10**: p. 43.
331. Wang, H.Z., et al., *N-acetylcysteine is effective for prevention but not for treatment of folic acid-induced acute kidney injury in mice.* Crit Care Med, 2011. **39**(11): p. 2487-94.
332. Li, G.W., et al., *Treatment of refractory thrombotic thrombocytopenic purpura with N-acetylcysteine: a case report.* Transfusion, 2014. **54**(5): p. 1221-4.
333. Alonso, A., et al., *Prevention of radiocontrast nephropathy with N-acetylcysteine in patients with chronic kidney disease: a meta-analysis of randomized, controlled trials.* Am J Kidney Dis, 2004. **43**(1): p. 1-9.
334. De Benedetto, F., et al., *Long-term oral n-acetylcysteine reduces exhaled hydrogen peroxide in stable COPD.* Pulm Pharmacol Ther, 2005. **18**(1): p. 41-7.
335. Soldini, D., et al., *Pharmacokinetics of N-acetylcysteine following repeated intravenous infusion in haemodialysed patients.* Eur J Clin Pharmacol, 2005. **60**(12): p. 859-64.
336. Louise, C.B. and T.G. Obrig, *Specific interaction of Escherichia coli O157:H7-derived Shiga-like toxin II with human renal endothelial cells.* J Infect Dis, 1995. **172**(5): p. 1397-401.
337. Obrig, T.G., et al., *Direct cytotoxic action of Shiga toxin on human vascular endothelial cells.* Infect Immun, 1988. **56**(9): p. 2373-8.
338. Louise, C.B. and T.G. Obrig, *Shiga toxin-associated hemolytic-uremic syndrome: combined cytotoxic effects of Shiga toxin, interleukin-1 beta, and tumor necrosis factor alpha on human vascular endothelial cells in vitro.* Infect Immun, 1991. **59**(11): p. 4173-9.

339. Louise, C.B. and T.G. Obrig, *Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: combined cytotoxic effects of shiga toxin and lipopolysaccharide (endotoxin) on human vascular endothelial cells in vitro*. Infect Immun, 1992. **60**(4): p. 1536-43.
340. Tesh, V.L., et al., *Evaluation of the role of Shiga and Shiga-like toxins in mediating direct damage to human vascular endothelial cells*. J Infect Dis, 1991. **164**(2): p. 344-52.
341. Keusch, G.T., et al., *Comparison of the effects of Shiga-like toxin 1 on cytokine- and butyrate-treated human umbilical and saphenous vein endothelial cells*. J Infect Dis, 1996. **173**(5): p. 1164-70.
342. Yoshida, T., et al., *Primary cultures of human endothelial cells are susceptible to low doses of Shiga toxins and undergo apoptosis*. J Infect Dis, 1999. **180**(6): p. 2048-52.
343. Brigotti, M., et al., *Damage to nuclear DNA induced by Shiga toxin 1 and ricin in human endothelial cells*. FASEB J, 2002. **16**(3): p. 365-72.
344. Brigotti, M., et al., *Molecular damage and induction of proinflammatory cytokines in human endothelial cells exposed to Shiga toxin 1, Shiga toxin 2, and alpha-sarcin*. Infect Immun, 2007. **75**(5): p. 2201-7.
345. Fujii, J., et al., *Shiga toxin 2 causes apoptosis in human brain microvascular endothelial cells via C/EBP homologous protein*. Infect Immun, 2008. **76**(8): p. 3679-89.
346. Bitzan, M.M., et al., *Verotoxin and ricin have novel effects on preproendothelin-1 expression but fail to modify nitric oxide synthase (eNOS) expression and NO production in vascular endothelium*. J Clin Invest, 1998. **101**(2): p. 372-82.
347. Waddell, T., et al., *Globotriosyl ceramide is specifically recognized by the Escherichia coli verocytotoxin 2*. Biochem Biophys Res Commun, 1988. **152**(2): p. 674-9.
348. Viisoreanu, D., et al., *Human platelet aggregation is not altered by Shiga toxins 1 or 2*. Thromb Res, 2000. **98**(5): p. 403-10.
349. Krotz, F., H.Y. Sohn, and U. Pohl, *Reactive oxygen species: players in the platelet game*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(11): p. 1988-96.
350. Pignatelli, P., et al., *gp91phox-dependent expression of platelet CD40 ligand*. Circulation, 2004. **110**(10): p. 1326-9.
351. Pignatelli, P., et al., *Vitamin C inhibits platelet expression of CD40 ligand*. Free Radic Biol Med, 2005. **38**(12): p. 1662-6.
352. Mason, P.J., et al., *Plasma, serum, and platelet expression of CD40 ligand in adults with cardiovascular disease*. Am J Cardiol, 2005. **96**(10): p. 1365-9.
353. Rizvi, M., et al., *CD40-CD40 ligand interactions in oxidative stress, inflammation and vascular disease*. Trends Mol Med, 2008. **14**(12): p. 530-8.
354. Ahn, E.R., et al., *Differences of soluble CD40L in sera and plasma: implications on CD40L assay as a marker of thrombotic risk*. Thromb Res, 2004. **114**(2): p. 143-8.
355. Dran, G.I., et al., *Protective role of nitric oxide in mice with Shiga toxin-induced hemolytic uremic syndrome*. Kidney Int, 2002. **62**(4): p. 1338-48.
356. Tarr, P.I., C.A. Gordon, and W.L. Chandler, *Shiga-toxin-producing Escherichia coli and haemolytic uraemic syndrome*. Lancet, 2005. **365**(9464): p. 1073-86.
357. Chakrabarti, S., P. Blair, and J.E. Freedman, *CD40-40L signaling in vascular inflammation*. J Biol Chem, 2007. **282**(25): p. 18307-17.
358. Amirkhosravi, A., et al., *Platelet-CD40 ligand interaction with melanoma cell and monocyte CD40 enhances cellular procoagulant activity*. Blood Coagul Fibrinolysis, 2002. **13**(6): p. 505-12.
359. Lindmark, E., T. Tenno, and A. Siegbahn, *Role of platelet P-selectin and CD40 ligand in the induction of monocyte tissue factor expression*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(10): p. 2322-8.

-
360. Slupsky, J.R., et al., *Activated platelets induce tissue factor expression on human umbilical vein endothelial cells by ligation of CD40*. *Thromb Haemost*, 1998. **80**(6): p. 1008-14.
361. Zhou, L., et al., *CD40 engagement on endothelial cells promotes tissue factor-dependent procoagulant activity*. *Thromb Haemost*, 1998. **79**(5): p. 1025-8.
362. Celi, A., et al., *P-selectin induces the expression of tissue factor on monocytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(19): p. 8767-71.
363. Lee, S.P., et al., *Biologically active CD40 ligand is elevated in sickle cell anemia: potential role for platelet-mediated inflammation*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(7): p. 1626-31.
364. Leatham, E.W., et al., *Increased monocyte tissue factor expression in coronary disease*. *Br Heart J*, 1995. **73**(1): p. 10-3.
365. Clark, R.A.F., *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. 2nd ed, ed. R.A.F. Clark 1996: Plenum. 3–50.
366. Alderson, M.R., et al., *CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40*. *J Exp Med*, 1993. **178**(2): p. 669-74.
367. Caux, C., et al., *Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking*. *J Exp Med*, 1994. **180**(4): p. 1263-72.
368. Kiener, P.A., et al., *Stimulation of CD40 with purified soluble gp39 induces proinflammatory responses in human monocytes*. *J Immunol*, 1995. **155**(10): p. 4917-25.