

ACTIVACION DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA Y ESPECIFICA EN LOS PACIENTES CON SINDROME UREMICO HEMOLITICO

PAPEL DUAL A TRAVES DE LA PARTICIPACION EN LOS MECANISMOS PATOGENICOS Y PROTECTORES

**MARINA S. PALERMO, GABRIELA C. FERNANDEZ, MARIA VICTORIA RAMOS, LETICIA BENTANCOR,
ROMINA FERNANDEZ BRANDO; GRACIELA I. DRAN, MARTIN A. ISTURIZ**

*División Inmunología, Instituto de Investigaciones Hematológicas (IIHEMA),
Academia Nacional de Medicina*

Resumen La función primaria del sistema inmunológico es preservar al individuo sano frente a infinidad de agentes microbianos patógenos o injuriantes. Sin embargo, en determinadas circunstancias los mecanismos agresores normalmente montados contra un agente invasor, pueden tornarse altamente injuriantes para el propio individuo. Hay importantes evidencias tanto clínicas como experimentales, de que la reacción inflamatoria inducida por los distintos componentes de las bacterias *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (Stx) (STEC), fundamentalmente la Stx y los lipopolisacáridos (LPS), contribuye decisivamente en la evolución a la forma completa de SUH. Así los pacientes, al ser diagnosticados de SUH, presentan evidencias de haber sufrido un proceso de activación del sistema inmune innato, o reacción inflamatoria muy aguda y temprana en la evolución de la enfermedad. Algunas de estas evidencias pueden resumirse como: una neutrofilia marcada, leucocitos neutrófilos (PMN) circulantes que se encuentran "agotados o exhaustos", los monocitos diferenciados hacia un fenotipo inflamatorio (menor expresión de CD14 y aumento de CD16), y se encuentra un significativo descenso en los leucocitos que presentan el receptor (CX₃CR1) para la quimioquina Fractalquina (FKN, CX₃CL1): los monocitos clásicos y células Natural Killer (NK). Estas células tienen un alto potencial citotóxico. La FKN se expresa en endotelio y epitelio renal y ha sido involucrada en los mecanismos patogénicos en distintas nefropatías. Llamativamente, encontramos una correlación significativa entre la severidad del cuadro renal y las alteraciones mencionadas. Por último, se discute el papel protector que la respuesta inmune específica podría ejercer, fundamentalmente a través de la producción de anticuerpos neutralizantes de la Stx.

Palabras claves: respuesta innata, inflamación, anticuerpos, leucocitos, quimioquinas.

Abstract *Activation of innate and specific immune responses in hemolytic uremic syndrome (HUS)-patients.* The central role of the immune system is the preservation of the health against several pathogenic microbes and injury agents. However, on special conditions defensive mechanisms triggered towards the foreign agent can damage the host. Clinical and experimental evidence indicate that inflammatory reaction triggered by the main components of Shiga toxin (Stx)- producing *Escherichia coli* (STEC), participate in the evolution to the complete form of HUS. When children are diagnosed of HUS, they present evidence that have suffered a very strong and early inflammatory response. These features include: the presence of a marked neutrophilia, the polymorphonuclear leucocytes (PMN) are "deactivated or exhausted" and the monocytes are differentiated towards an inflammatory phenotype (CD14-reduced and CD16-enhanced membrane expression). In addition, HUS-patients show a marked reduction in the absolute and relative number of leucocytes carrying the receptor (CX₃CR1) for the chemokine "Fractalkine" (FKN, CX₃CL1), which are the classic monocytes and Natural Killer cells (NK). All these cells express a high cytotoxic potential. The chemokine FKN is expressed in endothelial and epithelial renal cells, and is involved in the pathogenic mechanism of different nephropathies. Noteworthy, we found a significant correlation between the severity of the renal damage (as days of anuria) and the alterations described above. Finally, the protective role of specific immune response, mainly through the antibody production with Stx-neutralizing capacity, is discussed.

Key words: innate response, inflammation, antibodies, leucocytes, chemokines

Si bien se ha avanzado mucho en el conocimiento del agente etiológico y los mecanismos patogénicos del Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), aún quedan aspectos que no han sido completamente elucidados¹. La bacteria coloniza el intestino, secreta la toxina Shiga (Stx) que atraviesa la barrera intestinal y alcanza la circulación sistémica. Allí se une a su receptor específico (globotriaosilceramida, Gb3) presente fundamentalmente en el endotelio de los pequeños vasos del colon, riñón y sistema nervioso central, y en el epitelio tubular renal. Luego de ser internalizada, inhibe la síntesis proteica, generando el daño endotelial y epitelial primario, patognomónico del SUH¹⁻³. Si bien la Stx es absolutamente necesaria para el desarrollo de la enfermedad, hay importantes evidencias de que la reacción inflamatoria inducida por Stx o por los lipopolisacáridos bacterianos (LPS) que acompañan a este tipo de infecciones, contribuye decisivamente en el desarrollo pleno del efecto de la Stx, y la evolución a la forma completa de SUH³. La respuesta inflamatoria o innata, se complementa e integra con la respuesta específica para cumplir eficazmente con la función primaria del sistema inmunológico: preservar al individuo sano frente a infinidad de agentes microbianos patógenos o injuriantes. Sin embargo, en determinadas circunstancias los mecanismos agresores normalmente montados contra un agente invasor, pueden tornarse altamente injuriantes.

Desde hace varios años, el grupo de Inmunología de la Academia Nacional de Medicina trabaja en conocer la participación de la respuesta inmunológica, tanto en el desarrollo como en la prevención del SUH.

Participación de la respuesta innata en el SUH

Para estudiar los distintos componentes de la respuesta inmunológica desarrollamos un modelo murino de SUH por inoculación endovenosa de Stx, a través del cual demostramos que la respuesta inflamatoria ejerce un efecto potenciador sobre la toxicidad específica de la Stx⁴, mientras que, de manera recíproca, los mecanismos anti-inflamatorios, representados fundamentalmente por los glucocorticoides^{5,6} y la enzima óxido nítrico-sintasa constitutiva o endotelial (NOSe)⁷ protegen de la toxicidad de la Stx. La toxina, los LPS y el daño endotelial inducido por el efecto de ambos, activan al sistema inmune innato desencadenando una fuerte respuesta inflamatoria. Entre los mediadores solubles de inflamación que se han descrito elevados en el suero u orina de los pacientes con SUH, y que dan cuenta de las profundas alteraciones que ha sufrido el sistema homeostático, podemos mencionar: la interleuquina (IL) 6 (IL-6), la IL-8⁸, la IL-10, el factor de necrosis tumoral (TNF)⁹, el factor de crecimiento fibroblástico (TGF)¹⁰, el sistema Fas/Fas-ligando¹¹, diversos factores de la cascada de coagulación¹². Me-

nos abundantes son los estudios sobre las alteraciones de los componentes celulares de la respuesta inmune innata o inflamatoria. Estos comprenden fundamentalmente a los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos (PMN), los monocitos (Mo) y la células Natural Killer (NK). Cada uno de estos tipos celulares cumple una función específica durante una infección. Los PMN son la primera población en responder a una señal de daño; son células terminales, con una vida media entre 6-7 horas. Los monocitos y células NK son células de vida media más larga, acuden como segunda línea en respuesta a quimioquinas específicas liberadas por el endotelio, los PMN u otros tipos leucocitarios. Pueden sufrir procesos de maduración y diferenciación según los estímulos, son células altamente secretoras y participan en la inducción de la respuesta inmune específica. Los PMN expresan una importante capacidad microbicida y citotóxica, fundamentalmente a través del contenido de sus gránulos intracitoplasmáticos, reservorios de enzimas y proteínas de membrana. Frente a un estímulo activador fusionan su membrana con la membrana plasmática y vuelcan su contenido intragranular al exterior, en un proceso denominado "degranulación"¹³. Estos gránulos pueden clasificarse en vesículas secretoras, gránulos de almacenamiento o terciarios, gránulos específicos o secundarios, y gránulos azurófilos o primarios. Las vesículas secretoras son las primeras en ser degranuladas, contienen fundamentalmente receptores y moléculas de adhesión que le permiten a los PMN responder a las alteraciones que presenta el endotelio activado o dañado. Contienen fundamentalmente la molécula de adhesión CD11b/CD18 (perteneciente a la familia de las integrinas), receptores para el Fc de IgG (CD16), receptores para fragmentos del complemento (CR1), receptores para productos bacterianos (como el péptido prototípico FMLP), y en su interior solo contienen proteínas plasmáticas, como la albúmina. Los gránulos terciarios, secundarios y primarios son liberados de manera gradual y secuencial, de acuerdo a la persistencia y/o intensidad del estímulo activador. Así los gránulos terciarios y secundarios contienen gran cantidad de enzimas degradadoras de la matriz extracelular (colagenasa, gelatinasa), que le permiten al PMN atravesar los tejidos en respuesta a agentes quimioattractantes provenientes de un foco inflamatorio o infeccioso. Además de otros receptores como el receptor para fibronectina, trombospondina, vitronectina y el CD66. Los gránulos primarios poseen un alto contenido en enzimas bacteriostáticas y bactericidas (mileoperoxidasa (MPO), elastasa, catepsina, N-acetil B glucosaminidasa, β -glucuronidasa)¹³. Esta clasificación en los distintos tipos de gránulos tiene un significado fisiológico, pero además es de utilidad en la clínica hematológica y sirve para evaluar el estado de activación de los PMN, ya que el nivel de expresión *en la membrana plasmática* de las moléculas de cada tipo de gránulo, sugiere cuál/es de ellos han sido movilizados.

Diferentes autores han postulado la participación de los PMN en la patogénesis del SUH a partir de evidencias clínicas y experimentales. Una neutrofilia marcada es un parámetro de mal pronóstico en la evolución del SUH¹⁴. En distintas autopsias de niños con SUH se han encontrado infiltrados de PMN en tejido renal¹⁵ y los PMN de los pacientes en el momento agudo muestran mayor adhesividad a los endotelios. Paralelamente, en el suero de los mismos se encuentran niveles aumentados de elastasa, (proveniente de la degranulación de los PMN), e IL-8, principal quimioquina activadora de los PMN^{16, 17}. Nosotros demostramos en el modelo murino de SUH, que la Stx induce una marcada neutrofilia, y que los PMN de sangre periférica presentan marcadores de activación y poseen mayor capacidad citotóxica y mayor adhesión a la vasculatura¹⁸.

A lo largo de 5 años estudiamos el estado de activación de los PMN provenientes de más de 30 pacientes con SUH en la etapa aguda, previo a cualquier intervención como diálisis o transfusión. Como controles analizamos en paralelo niños de la misma edad de los siguientes grupos clínicos: 1) sanos, 2) con una infección bacteriana no asociada al SUH, y 3) urémicos agudos. Estudiamos por citometría de flujo la expresión de la integrina CD11b (marcador de vesículas secretorias), de CD66b (marcador de gránulos secundarios), y la MPO (marcador de gránulos primarios). Analizamos su expresión basal, es decir el nivel de expresión con que se encuentran en los PMN en circulación, y en respuesta a un estímulo activador *in vitro*, (TNF, GM-CSF, IL-8) que nos permite evaluar el contenido intracelular que se moviliza frente al estímulo degranulador¹⁸. Estos estudios demostraron que los PMN de los pacientes con SUH presentan un estado de degranulación y desactivación, característico y diferencial de los otros grupos clínicos controles^{19, 20}. De manera muy interesante, el nivel de degranulación se correlaciona con el grado de severidad del paciente, clasificados retrospectivamente según los criterios de Gianantonio (Tabla1)²¹. Es decir que los pacientes que registraron mayor compromiso renal, reflejado por los días de anuria y el requerimiento de diálisis, presentan un mayor grado de "desactivación y degranulación", alcanzando la misma a los gránulos primarios, que son los más tardíos y difíciles de movilizar²¹. Si estos hallazgos son causa o consecuencia de un mayor daño endotelial, es difícil de demostrar, pero es similar a lo referido para las plaquetas, descritas también como "agotadas" o "exhaustas"²², y sugiere que han sufrido un proceso agudo y masivo de activación intravascular, muy temprano.

Esto a su vez implicaría que la activación de la respuesta inflamatoria ha sido previa al momento en que el niño es diagnosticado de SUH y hospitalizado, ocurriendo probablemente en el período que transcurre entre la diarrea sanguinolenta y los primeros signos de SUH.

TABLA 1.- Correlación entre los diferentes marcadores de activación medidos en los PMN y la severidad del daño renal en los pacientes con SUH al momento de admisión

	Pearson r	Significancia (p)
Número absoluto de PMN	r = 0.62	p=0.001
Expresión de:		
CD16	No hay correlación	
CD11b	r = -0.37	p=0.01
CD66b	r = -0.35	p=0.01
MPO	r = -0.51	p=0.01
Producción IROs	r = -0.51	p=0.01
Porcentaje de PMN en:		
Apoptosis temprana	r = -0.44	p=0.02
Apoptosis tardía	r = -0.43	p=0.02
Células vivas	r = 0.63	p<0.001
Nivel plasmático de IL-8	r = -0.74	p<0.001

Nosotros creemos que esta respuesta inflamatoria podría contribuir significativamente al daño endotelial ya que la liberación de componentes intracelulares de los PMN, como distintas proteasas o intermediarios reactivos del oxígeno, poseen un alto potencial citotóxico que podrían potenciar la injuria original provocada por los efectos directos de la toxina Shiga.

Con el objetivo de analizar si la activación de la respuesta inflamatoria abarcan también a los otros componentes celulares que integran la respuesta innata, analizamos las características fenotípicas de los Mo y las células NK. Previamente habíamos demostrado en el modelo murino que la toxicidad de la Stx2 está significativamente disminuida en ausencia de los macrófagos, sugiriendo que esta población es importante para inducir daño tisular, probablemente a través de la producción de las citoquinas proinflamatorias TNF- α e IL-1 β ²³. Recientemente, distintos autores han demostrado que en determinadas patologías con un alto componente inflamatorio, los Mo se diferencian hacia un fenotipo con menor expresión de la molécula CD14 y mayor expresión del CD16²⁴ en su superficie, funcionalmente más secretores de citoquinas inflamatorias como TNF e IL-1. Paralelamente, publicaciones recientes han informado que la quimioquina fractalquina (FKN, CX₃CL1) cumple un papel importante en las patologías renales^{25, 26}. Esta quimioquina se diferencia del resto en que es una proteína transmembrana, pudiendo por lo tanto funcionar además como molécula de adhesión, y su forma soluble como quimioattractante²⁵.

La FKN está presente en células endoteliales y epiteliales, y su receptor (CX₃CR1) se expresa en Mo y células NK. En particular, se ha descrito aumento de la expresión de FKN y presencia de Mo que expresan el

receptor para FKN en cortes histológicos de riñón en pacientes con glomerulopatías. En modelos experimentales el bloqueo de la interacción de la FKN con su receptor mejora significativamente distintos tipos de glomerulonefritis. Al analizar los Mo de los pacientes con SUH durante la etapa aguda, encontramos que los mismos presentan un perfil inflamatorio con disminución del receptor CD14 y aumento del CD16²⁷ en la membrana, de manera bastante similar a lo que ocurre en otros pacientes que cursan con infecciones severas como shock séptico o HIV. Llamativa y diferencialmente, los pacientes con SUH mostraron un significativo descenso de las células en circulación que expresan el receptor para fractalquina: tanto en la población de Mo como en las células NK (subpoblación CD56^{dim})²⁸. Más aún, se encontró una correlación negativa entre el número de leucocitos circulantes que expresan el CX₃CR1 y la severidad del cuadro de SUH. Es decir, cuantos más leucocitos periféricos expresan este receptor, la severidad es menor, sugiriendo que este tipo de células desaparecen de circulación como consecuencia de quedar adheridas a los endotelios, pudiendo potenciar la injuria por Stx. La interacción entre la FKN presente en el endotelio y epitelio renal activados o dañados y su receptor *expresado* en los Mo y células NK, podría contribuir a que estas células vuelquen su contenido enzimático a los tejidos. Apoyando esta hipótesis es interesante la publicación de un caso de SUH en adultos, secundario al tratamiento de un melanoma con IL-2²⁹. Es sabido que uno de los efectos colaterales y adversos más importante de este tratamiento es el daño endotelial sistémico secundario a la activación de células NK por la IL-2.

Estos resultados en conjunto permiten concluir que la respuesta inmune innata o inflamatoria tiene una partici-

pación destacada como circuito amplificador del daño endotelial inducido primariamente por la toxina Shiga. En la Fig. 1 se muestra en forma esquemática la patogénesis del SUH considerando los distintos componentes de la respuesta innata o inflamatoria.

Papel de la respuesta específica

Sin embargo, simultáneamente a los eventos relatados más arriba, se desarrolla la respuesta inmune específica, que se activa a través de la compleja interacción entre los componentes innatos (fundamentalmente Mo y células presentadoras de Ag) y los linfocitos específicos T y B. Datos clínicos, epidemiológicos y experimentales sugieren que la inmunidad específica, fundamentalmente a través de presencia de anticuerpos anti-Stx, disminuye el riesgo de SUH.

Desde el punto de vista clínico, la baja frecuencia de re-infecciones con STEC, así como la excepcionalmente rara ocurrencia de un segundo episodio de SUH post-entérico puede ser una evidencia indirecta de una eficiente respuesta inmunológica activa y con capacidad protectora contra STEC y Stx²². Desde lo epidemiológico, el hecho de que la edad pico de incidencia de SUH sean niños menores de 5 años¹⁻³, sugiere que podría desarrollarse un incremento en la inmunidad a lo largo de los años. Esta hipótesis se ve apoyada por estudios epidemiológicos recientemente realizados en Canadá y Alemania, en los cuales encontraron menor frecuencia de anticuerpos anti-Stx en niños dentro de la primer infancia (0.1 a 4.9 años)^{30,31}. Otro dato interesante es que en ambos países cerca del 60% de la población adulta urbana presentó anticuerpos anti-Stx. Estos porcentajes

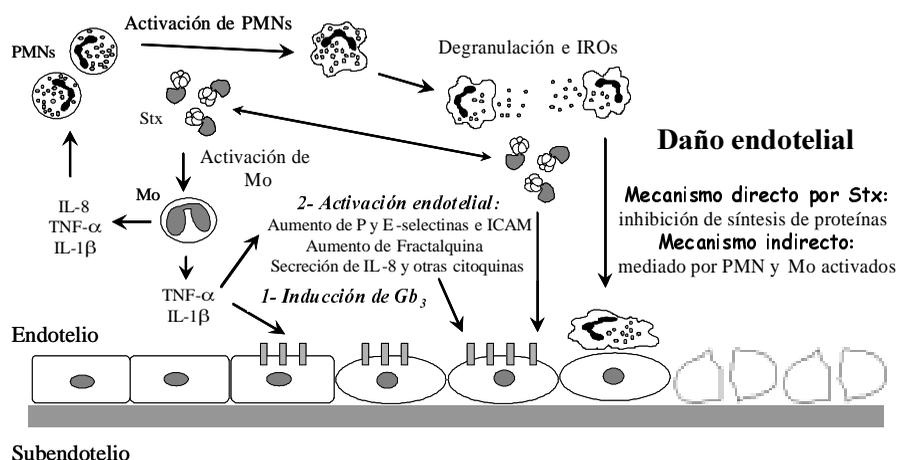


Fig. 1.- Papel central de la respuesta innata e inflamatoria sobre la modulación de la toxicidad de Stx.

PMNs: polimorfonucleares neutrófilos, Mo: monocitos, IROs, intermediarios reactivos del oxígeno, Gb3: globotriaosil ceramida; TNF: factor de necrosis tumoral, IL: interleuquina ICAM: molécula de adhesión intercelular

se ven incrementados en la población rural³¹. Diversos investigadores encontraron que los sueros obtenidos a partir de pacientes con SUH y sus convivientes o contactos directos son capaces de neutralizar la Stx. Como antecedente en nuestro país se ha demostrado presencia y/o seroconversión para anticuerpos anti-Stx en pacientes con SUH (52.6%), en convivientes (27.5%) y en niños controles (8.8%), utilizando técnicas de seroneutralización en células sensibles a la acción tóxica de la Stx o células VERO^{32, 33}. Estos estudios sólo valoraron la capacidad neutralizante de los sueros sobre células VERO, y en muestras relativamente pequeñas. A partir del uso de la técnica de *western blot* se pudo mejorar la especificidad y sensibilidad de la detección de anticuerpos anti-Stx. Mediante el uso de esta técnica, Ludwig et al demostraron que el 70% de los chicos con infección por *E. coli* asociada a Stx2 en Alemania presenta anticuerpos anti-Stx2 de tipo IgG, frecuencia significativamente alta comparada al 39% de sus familiares directos y con el 10% del grupo control según la edad^{30, 34}. Otro aspecto interesante y poco claro es la capacidad inmunogénica de las distintas subunidades de la Stx y la relevancia biológica que presentan los anticuerpos dirigidos hacia cada una de ellas. Respecto a esto se ha encontrado, llamativamente, que el 85% de los sueros de pacientes que reaccionan con la Stx2, están dirigidos hacia la subunidad A y sólo el 15% reconoce la subunidad B. Contrariamente, el 45% de los sueros positivos dentro de la población control (adultos o convivientes) interactuó con la subunidad A de la Sx2 y el 55% reconoció la subunidad B. En nuestro país, a pesar de la excepcionalmente alta incidencia de SUH hay muy pocos estudios sobre el porcentaje de controles que presentan anticuerpos anti-STE/C y/o anti-Stx.

Estos datos marcan otro punto muy importante a escala epidemiológica como es la posibilidad de contagio horizontal, que no ha sido analizada en profundidad y que tendría importantes consecuencias a nivel social. En efecto, si bien la vía primaria de infección por STEC está constituida por la ingesta de alimentos contaminados y mal cocidos, o alimentos no pasteurizados (leches, jugos de fruta), en muchos casos de SUH, no ha podido identificarse la vía de transmisión, especialmente en nuestro país donde no se registran brotes epidémicos, sino principalmente casos esporádicos y donde el SUH es una enfermedad endémica. Esto ha derivado en la creciente apreciación de que la transmisión persona a persona juega un papel importante en instituciones como hospitales³⁵, jardines maternos³⁶, y fundamentalmente entre miembros de la familia o convivientes^{34, 37}. Sin embargo, no existen en nuestro país hasta el momento estudios que establezcan la frecuencia de esta vía de contagio, ni el nivel de portadores asintomáticos, generalmente adultos, a nivel poblacional.

Por otro lado, a nivel experimental diferentes protocolos de inmunización han mostrado la posibilidad de proteger a animales contra la mortalidad inducida por la Stx con la producción de anticuerpos específicos contra Stx a través de una inmunización activa o pasiva^{38, 39}. La inmunización pasiva con anticuerpos con capacidad neutralizante de la toxina, de alta afinidad y desarrollados por ingeniería genética, constituye una interesante perspectiva futura de tratamiento.

Perspectivas en el tratamiento del SUH

La diálisis peritoneal durante la fase aguda es actualmente el único tratamiento sintomático utilizado en el SUH, el cual ha logrado disminuir la mortalidad a un 4%. Sin embargo, se carece de un tratamiento específico que bloquee los mecanismos patogénicos y por lo tanto que permita controlar el grado de daño tisular. Como consecuencia de esto el 30% de los pacientes evolucionará hacia una disfunción renal de distinto grado. Las intervenciones farmacológicas en la terapia del SUH han sido empíricas y limitadas. Así, el uso de anticoagulantes y antitrombóticos no ha dado resultado², y los antibióticos son contraindicados por la ineficacia, por generar efectos inflamatorios contraproducentes o inducir en la bacteria al fago productor de toxina³. Desde hace unos años se están ensayando distintas maneras de bloquear la unión de la Stx a las células endoteliales, ya que es éste el paso inicial de una compleja cascada de eventos que conduce al daño endotelial característico. Se han ensayado análogos de receptores por vía oral (Synsorb), para bloquear la toxina producida en el intestino. Sin embargo, no se obtuvieron los resultados esperados, aparentemente porque cuando comienza la diarrea sanguinolenta, la Stx ya ha pasado a la circulación sistémica³⁸. Actualmente se están desarrollando a nivel experimental distintos análogos sintéticos para ser suministrados por vía sistémica. Como ha sido previamente mencionado, la inmunización pasiva constituye una interesante perspectiva de tratamiento. Es importante destacar que la eficacia de estos tratamientos dependerá en gran medida de lo prematuro de su administración, que debería ser incluso anterior al diagnóstico de SUH, ya que por la experiencia clínica y los resultados mostrados a lo largo del presente trabajo los mecanismos patogénicos ya se han desencadenado. Por lo tanto, esta posibilidad futura debe desarrollarse conjuntamente con métodos de diagnóstico que permitan anticipar la evolución al SUH a partir de la infección con STEC.

References

1. Proulx F, Seidman EG, Karpman D. Pathogenesis of Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Res* 2001; 50:163-71.

2. Karmali MA. Infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 1989, 2: 15-37.
3. Paton JC, Paton AW. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol Rev* 1998, 11: 450-9.
4. Palermo M, Alves Rosa F, Rubel C, et al. Pretreatment of mice with LPS or IL-1b exerts opposite effects on Shiga toxin-2 lethality. *Clin Exp Immunol* 1999, 119: 77-83.
5. Gómez S, Fernández G, Dran G, Rubel C, Isturiz MA, Palermo MS. Endogenous glucocorticoids modulate neutrophil function in a murine model of Haemolytic Uraemic Syndrome. *Clin Exp Immunol* 2005, 139: 65-73.
6. Gómez S, Fernández G, Vanzulli S, et al. Endogenous glucocorticoids protects against Shiga toxin-2 toxicity in a mouse model of hemolytic uremic syndrome. *Clin Exp Immunol* 2003, 131: 217-24.
7. Dran G, Fernández GC, Rubel CJ, et al. Participation of nitric oxide pathway in the pathogenesis of hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int* 2002, 62: 1338-48.
8. Karpman D, Andreasson A, Thysell H, Kaplan BS, Svanborg C. Cytokines in childhood hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Pediatr Nephrol* 1995, 9: 694-9.
9. López EL, Contrini MM, Devoto S, et al. Tumor necrosis factor concentrations in hemolytic uremic syndrome patients and children with bloody diarrhea in Argentina. *Pediatr Infect Dis J* 1995 Jul;14 (7): 594-8.
10. Ray PE, Liu XH, Xu L, Rakusan T. Basic fibroblast growth factor in HIV-associated hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Nephrol* 1999;13: 586-93.
11. Masri C, Proulx F, Toledano B, et al. Soluble Fas and soluble Fas-ligand in children with *Escherichia coli* O157:H7-associated hemolytic uremic syndrome. *Am J Kidney Dis* 2000 Oct; 36(4): 687-94.
12. Chandler WL, Jelacic S, Boster DR, et al. Prothrombotic coagulation abnormalities preceding the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med* 2002; 346: 23-32.
13. Faurischou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect* 2003 Nov; 5(14): 1317-27.
14. Milford DV, Staten J, MacGreggor I, Dawes J, Taylor CM, Hill FG. Prognostic markers in diarrhoea-associated haemolytic-uraemic syndrome: initial neutrophil count, human neutrophil elastase and von Willebrand factor antigen. *Nephrol Dial Transplant* 1991; 6: 232-7.
15. Remuzzi G, Ruggenenti P. The hemolytic uremic syndrome. Perspectives in clinical nephrology. *Kidney Int* 1995; 147: 2-19.
16. Fitzpatrick MM, Shah V, Trompeter RS, Dillon MJ, Barratt TM. Interleukin-8 and polymorphoneutrophil leucocyte activation in hemolytic uremic syndrome of childhood. *Kidney Int* 1992; 42: 951-6.
17. van Setten PA, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 levels in urine and serum of patients with hemolytic uremic syndrome. *Pediatr Res* 1998, 43: 759-67.
18. Fernández G, Rubel C, Dran G, Gómez S, Isturiz M, Palermo MS. Shiga toxin-2 induces neutrophilia and neutrophil activation in a murine model of hemolytic. *Clin. Immunol.*, 2000, 95: 227-34.
19. Fernández GC, Rubel C, Barrionuevo P, et al. Phenotype markers and function of peripheral neutrophils in children with hemolytic uremic syndrome. *Pediatric Nephrol* 2002, 17: 337-44.
20. Fernández GC, Gómez SA, Rubel CJ, et al. Impaired neutrophils in children with the typical form of Hemolytic Uremic Syndrome. *Ped Nephrol* 2005; 120: 1306-14.
21. Fernández GC, Gómez SA, Ramos MV, et al. The functional state of neutrophils correlates with the severity of renal dysfunction in children with Hemolytic Uremic Syndrome. *Pediatric Research* (En prensa).
22. Exeni R. Síndrome urémico hemolítico (Review) *Arch Latin Nefr Ped* 2001, 1: 37-56.
23. Palermo M, Alves Rosa F, van Rooijen N, Isturiz MA. Depletion of liver and splenic macrophages reduces the lethality of Shiga toxin-2 in a mouse model. *Clin Exp Immunol.* 1999, 116: 462-7.
24. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* 2003; 19: 71-82.
25. Umehara H, Bloom ET, Okazaki T, Nagano Y, Yoshie O, Imai T. Fractalkine in vascular biology: from basic research to clinical disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: 34-40.
26. Segerer S, Hughes E, Hudkins KL, Mack M, Goodpaster T, Alpers CE. Expression of the fractalkine receptor (CX3CR1) in human kidney diseases. *Kidney Int.* 2002; 62: 488-95.
27. Fernández GC, Ramos MV, Gómez SA, et al. Differential expression of function-related antigens on blood monocytes in children with HUS. *J Leuk Biol* 2005; 78: 853-61.
28. Ramos MV, Fernández GC, Patey N, et al. Involvement of fractalkine pathway in the pathogenesis of childhood Hemolytic Uremic Syndrome. *Blood* (En prensa).
29. Alexandrescu DT, Maddukuri P, Wiernik PH, Dutcher JP. Thrombotic thrombocytopenic purpura/hemolytic uremic syndrome associated with high-dose interleukin-2 for the treatment of metastatic melanoma. *J Immunother.* 2005; 28: 144-7.
30. Ludwig K, et al. Antibody response to Shiga toxins Stx2 and Stx1 in children with enteropathic hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol* 2001, 39: 2272-9.
31. Karmali MA, et al. Age-specific frequencies of antibodies to *Escherichia coli* verocytotoxins (Shiga toxin) 1 and 2 among urban and rural populations in southern Ontario. *J. Infect. Dis.* 2003, 188: 1724-49.
32. Rivas M, et al. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infection in family members of children with Hemolytic Uremic Syndrome. *Medicina (Buenos Aires)* 1996; 53: 487-90.
33. Lopez EL, et al. Evidence of infection with organisms producing Shiga-like toxins in household contacts of children with HUS. *Pediatr Infect Dis J* 1991, 10: 20-24.
34. Ludwig K, et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections and antibodies against Stx2 and Stx1 in household contacts of children with enteropathic HUS. *J Clin Microbiol* 2002, 40: 1773-82.
35. Carter AO, et al. A severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated hemorrhagic colitis in a nursing home. *N Engl J Med* 1987, 317: 1496-500.
36. Pavia AT, et al. Hemolytic-uremic syndrome during an outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections in institutions for mentally retarded persons: clinical and epidemiologic observations. *J Pediatr* 1990, 116: 544-51.
37. Karmali MA, et al. A family outbreak of hemolytic-uremic syndrome associated with verotoxin-producing *Escherichia coli* serotype O157: H7. *Pediatr Nephrol* 1988, 2: 400-4.
38. Karmali MA. Prospects for preventing serious systemic toxic complications of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections using Shiga toxin receptor analogues. *J Infect Dis* 2004, 189: 355-9.
39. Capozzo AVE, Pistone Creydt V, Dran G, et al. Development of DNA vaccines against Hemolytic Uremic Syndrome (HUS) in a murine model. *Infect Immun* 2003; 71: 3971-8.