

# IMPACTO DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA SOBRE LA EVOLUCIÓN A SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO (SUH). IDENTIFICACIÓN DE FACTORES DE RIESGO.

Dra. Marina Palermo  
Laboratorio Inmunología  
Instituto de Investigaciones Hematológicas,  
ILEX (CONICET), Academia Nacional de Medicina,  
Buenos Aires, Argentina



# Antecedentes

- Un recuento alto de neutrófilos (PMN) en sangre periférica a la presentación indica peor pronóstico.
- Se detectan niveles elevados de IL-8 y elastasa en el suero y orina de pacientes cursando el período agudo de SUH.
- Los LPS y las citoquinas TNF, IL-1 $\beta$  aumentan la sensibilidad de células epiteliales y endoteliales a los efectos tóxicos de la Stx.

Que factores del huésped intervienen para que el 10-15% de niños con infecciones por STEC evolucionan a SUH?

## Hipótesis de trabajo:

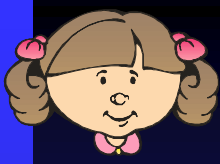
La respuesta inmune innata ó inflamatoria es capaz de modular la toxicidad de la toxina Shiga

Modelo de ratón

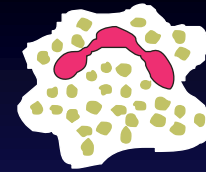


Pacientes con SUH durante el período agudo

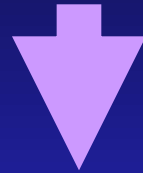




# PMN



- Función dual vigilancia y eliminación *in situ*
- Rápida transición de estado no-adherente a adherente



Expresión dinámica de Moléculas de adhesión

Enzimas que degraden matriz extracelular

Secreción de efectores en la rta inflamatoria: citoquinas  
y quimioquinas

Componentes bactericidas y bacteriostáticos

# Gránulos de los PMN humanos

*Biogénesis* →

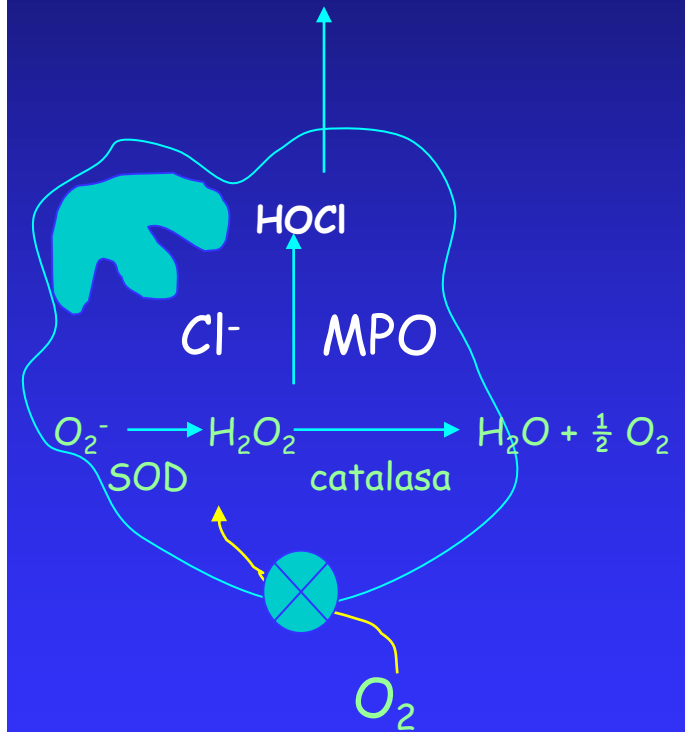
| <i>Enzimas mieloides</i>       | <b>Mieloblasto</b>   | <b>Promielocito</b>   | <b>Metamielocito</b>   | <b>PMN maduro</b>   |
|--------------------------------|--|---|--|---|
|                                | <i>Gránulos primarios (azurófilos)</i>   | <i>Gránulos secundarios (específicos)</i>   | <i>Gránulos terciarios</i>   | <i>Vesículas secretorias</i>  |
|                                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>MPO</b></li> <li>• Lisozima</li> </ul>                               | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lisozima</li> </ul>  |  |   |
| <i>Serín proteasas neutras</i> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Elastasa</b></li> <li>• Catepsina G</li> <li>• Proteinasa</li> </ul> |   |  |   |
| <i>Metaloproteinasas</i>       |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Colagenasa</li> </ul>  | <b>Gelatinasa B (MMP9)</b>   |   |
| <i>Hidrolasas Acidas</i>       | N-acetil-β glucuronidasa<br>Catepsina D<br><b>β-glucuronidasa</b><br>β-glicerofosfatasa<br>α-manosidasa          |   | N-acetil-β glucuronidasa<br>Catepsina D<br><b>β-glucuronidasa</b><br>β-glicerofosfatasa<br>α-manosidasa? |   |
| <i>otras</i>                   |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Lactoferrina</b></li> <li>• Prot unión a Vitamina B12</li> <li>• Citocromo B</li> </ul> | NADPH Oxidasa<br>N-GAL ( Neutrophil gelatinase-associated lipocalin)                                     | <b>CD11b/CD18</b><br><b>CD16</b><br>CD14,CR1,DAF<br>R-FMLP<br>:albúmina, tetranectina |

← *Orden de degranulación*

**\*\* Síntesis de citoquinas:** Inflamatorias: TNF, IL1, IL12, y IL1RA  
 quimioquinas: IL-8, GRO- $\alpha$ , MIP-1  
 GF: M-CSF, G-CSF, VEGF, GRO-b, TGF- $\alpha$

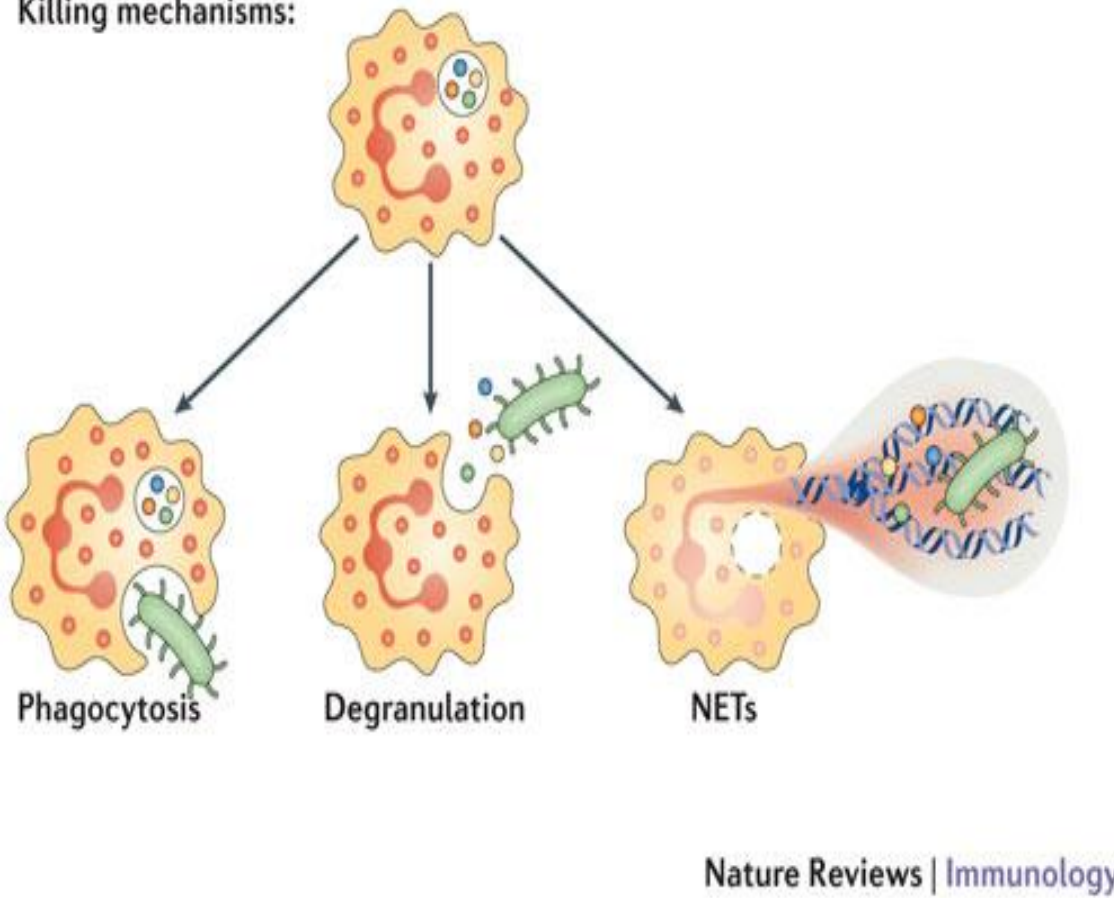
**\*\*Estallido respiratorio**

cloraminas



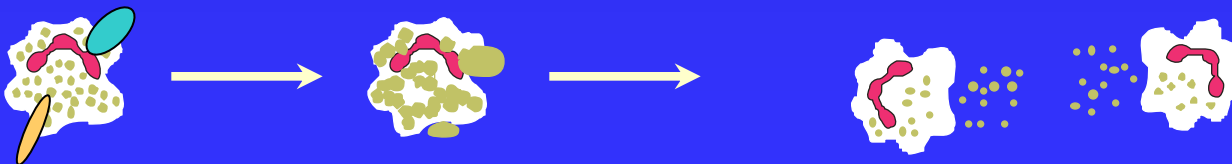
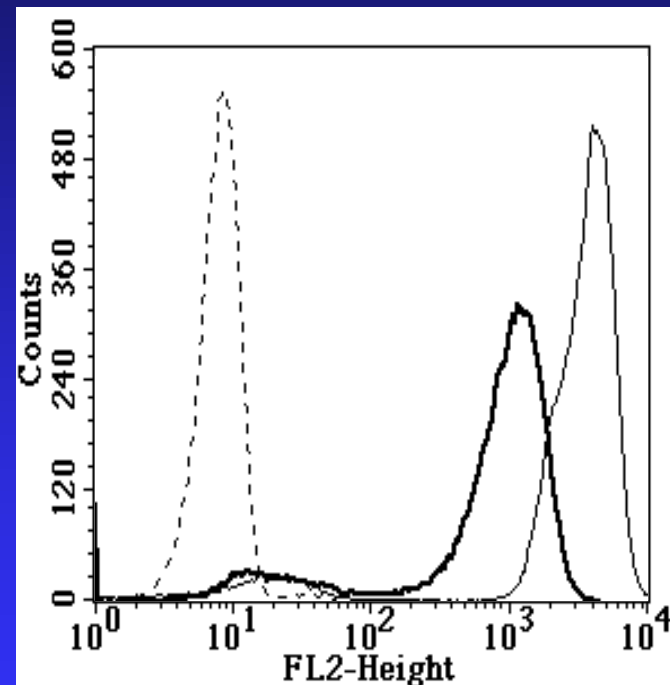
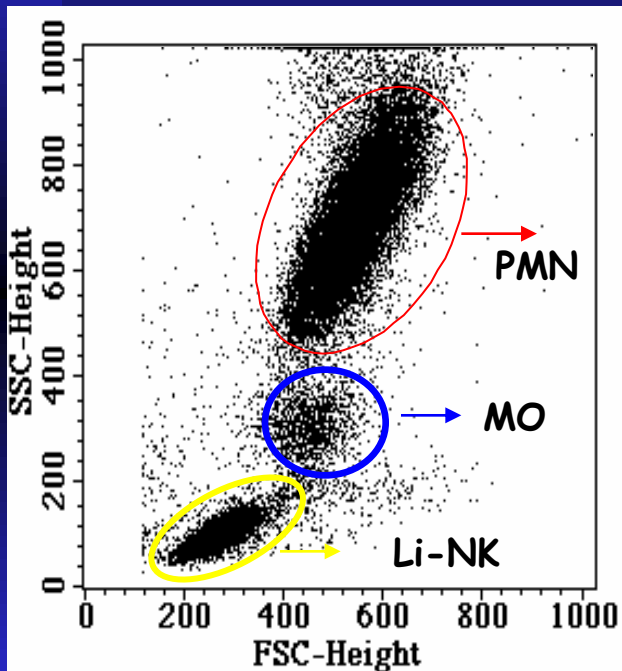
Complejo NADPH-oxidasa

Killing mechanisms:



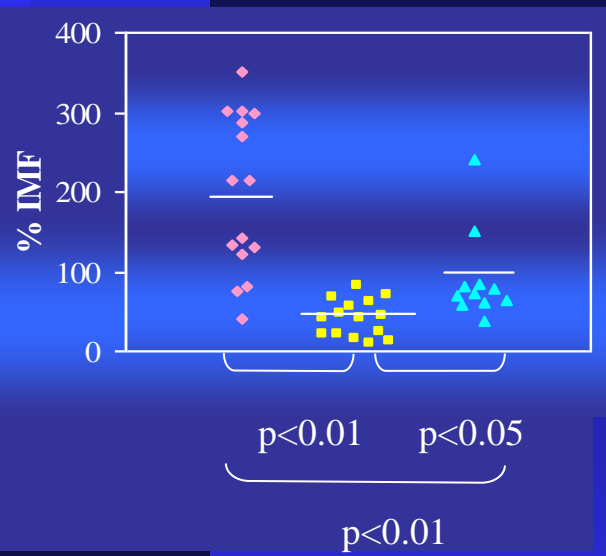
# Parámetros de activación en los PMN

- 1) Analizar marcadores moleculares expresados en membrana
- 2) Analizar contenido de gránulos intracelulares
- 3) Analizar la cinética de degranulación por distintos estímulos

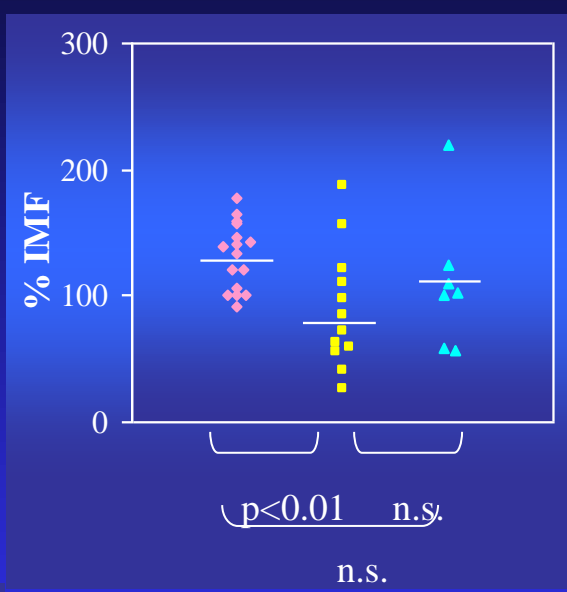


# Parámetros de activación de PMN en los pacientes

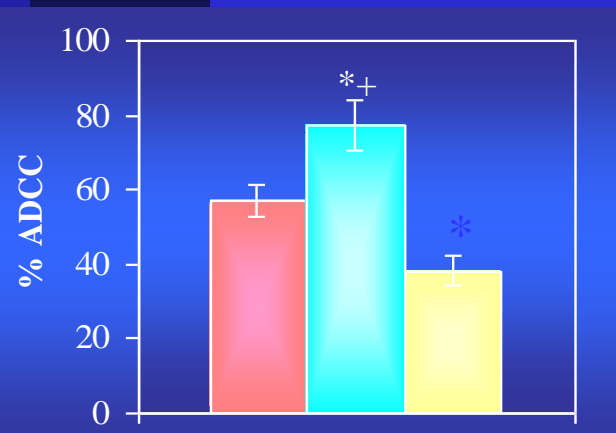
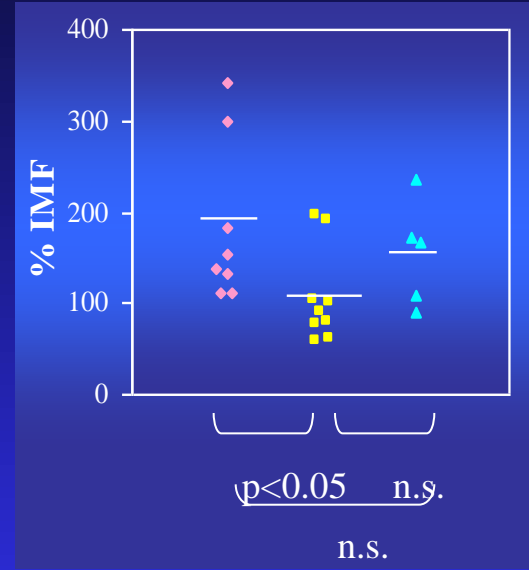
CD16 (FcγRIII)



CD11b



MPO



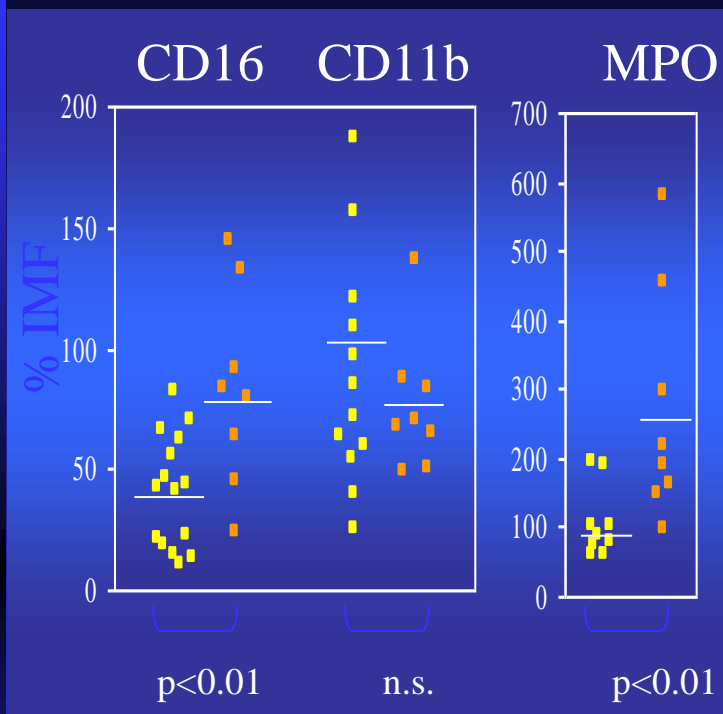
\* p < 0.05 vs. sanos  
+ p < 0.05 vs. SUH

Disminución de marcadores de activación y degranulación en la membrana de PMN

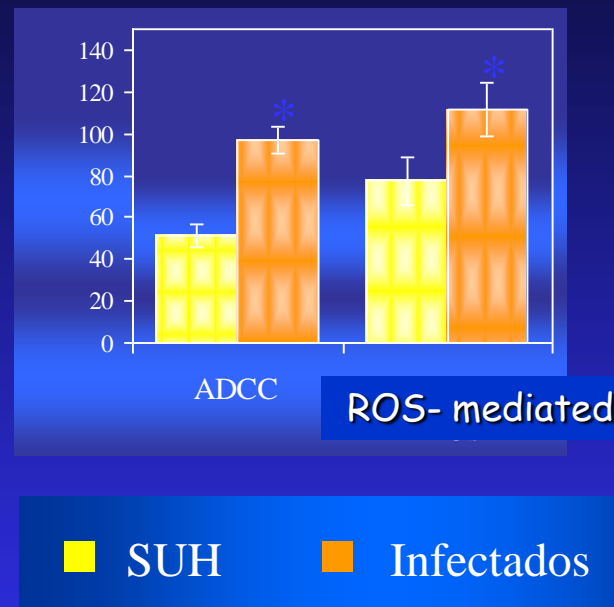
■ Sanos   
 ■ Urémicos   
 ■ SUH



# Comparación entre niños con SUH y con infecciones bacterianas no asociadas a STEC



## Capacidad Citotóxica



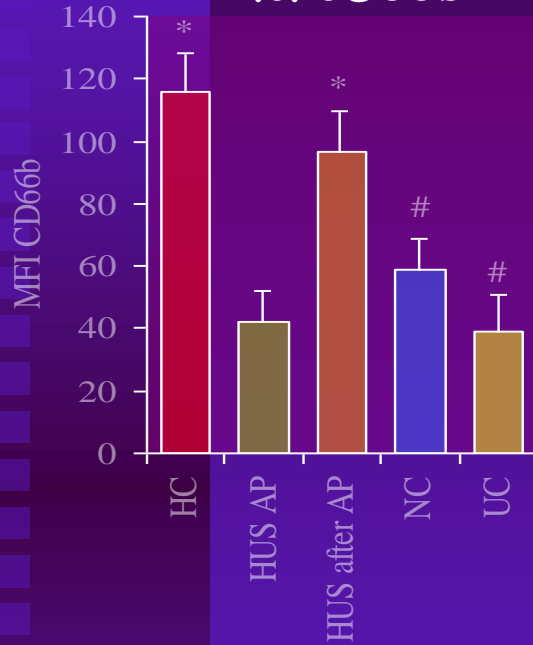
➤ Estas diferencias aún persisten

Fernández et al. Phenotype markers and function of peripheral neutrophils in children with HUS. *Pediatric Nephrology*. 17:337-344, 2002.

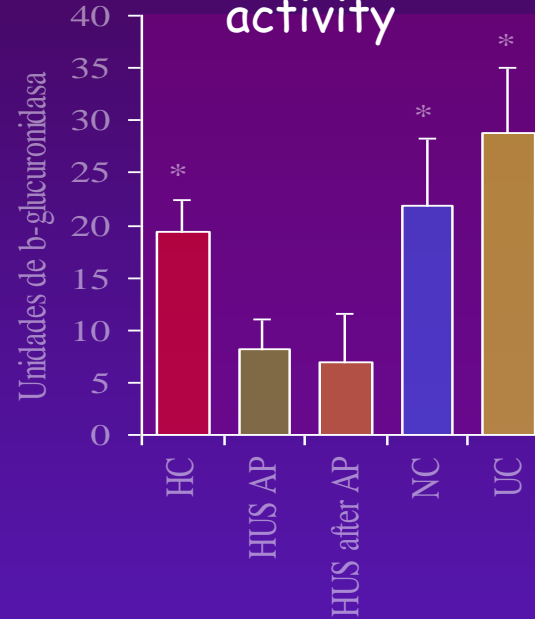
# Contenido intracelular de marcadores de degranulación evaluados en los PMN de pacientes con

SUH

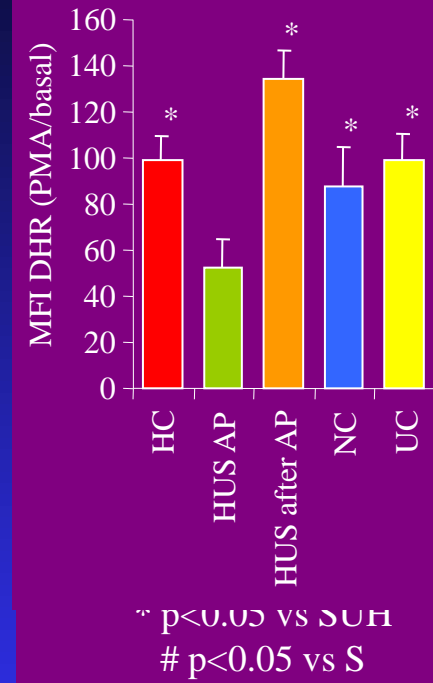
i.c. CD66b



$\beta$ -Glucuronidase activity

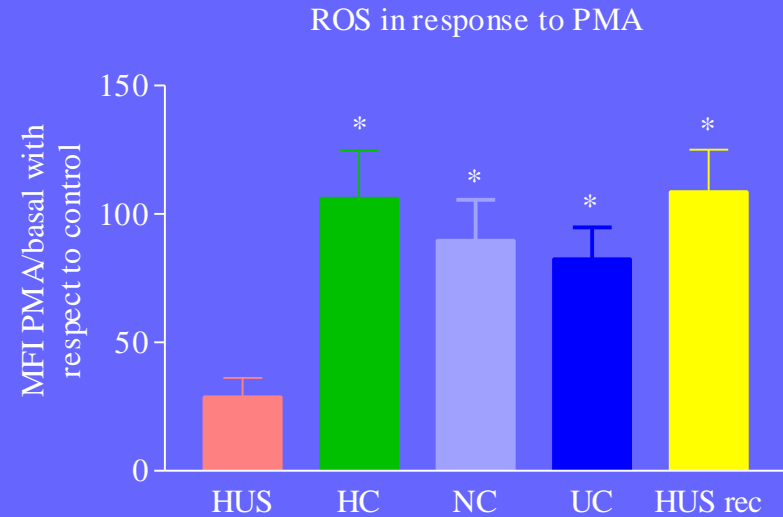
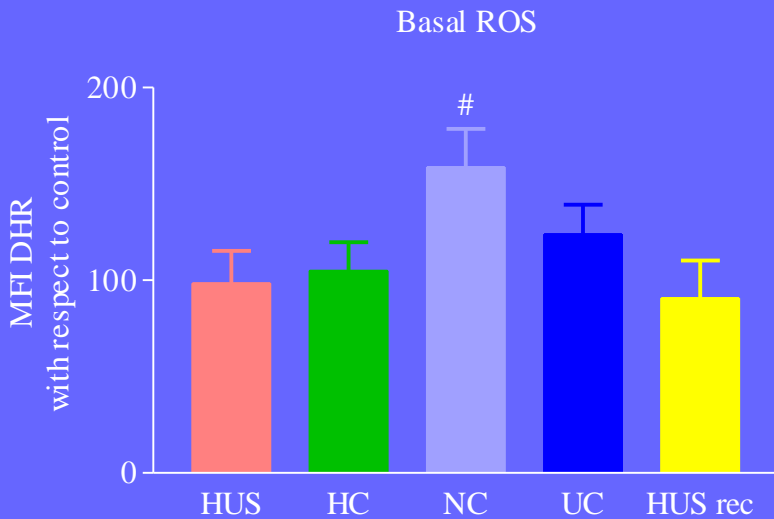
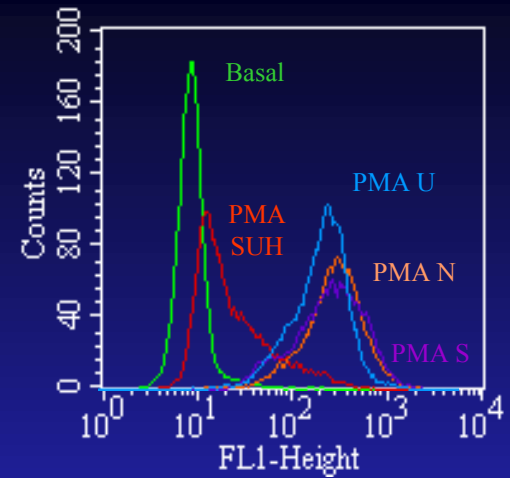


ROS-production

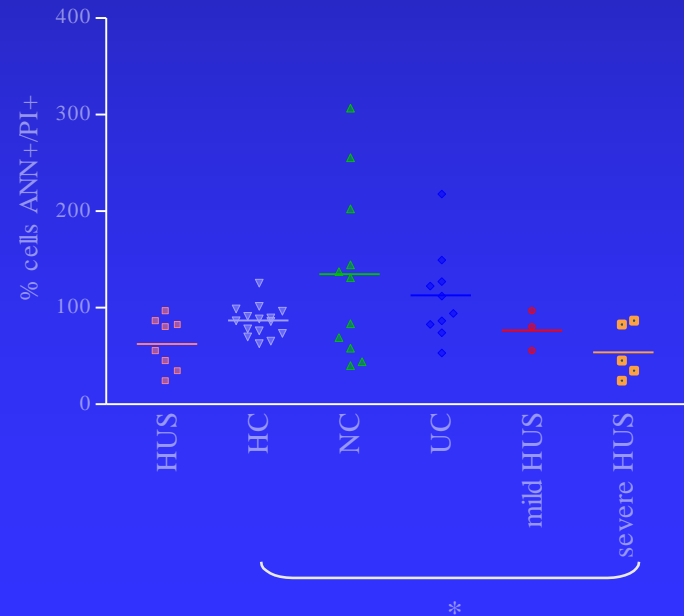
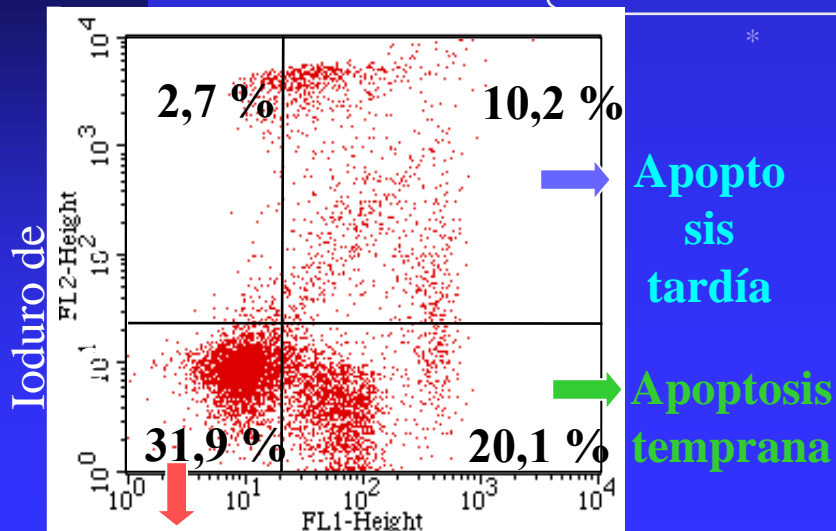
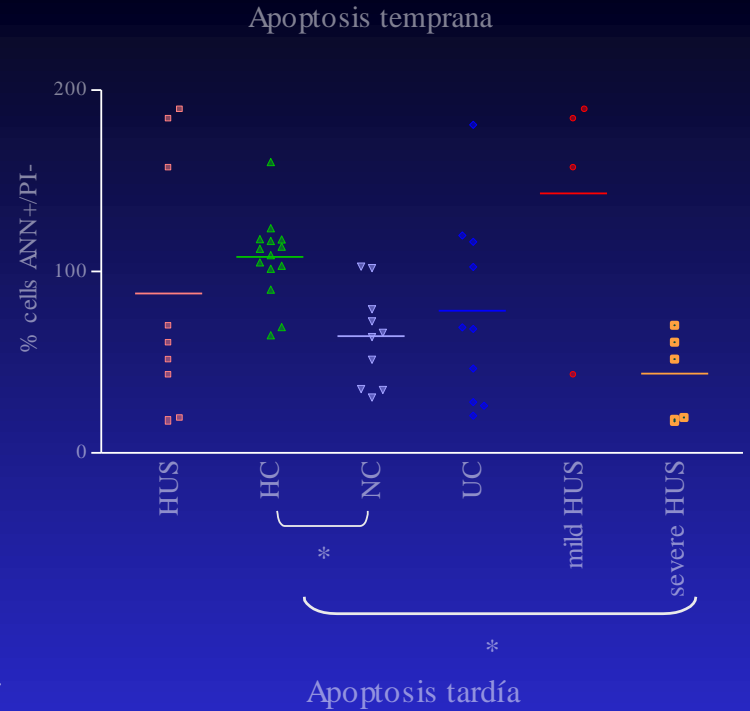
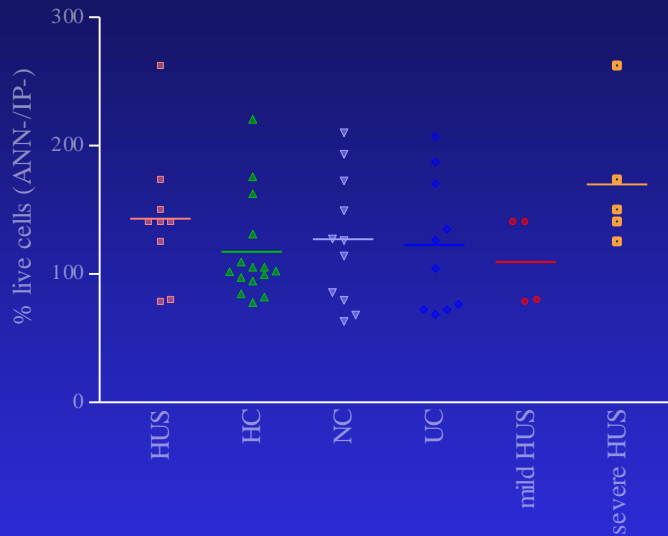


Los PMN de pacientes con SUH están "exhaustos", probablemente como consecuencia de un fuerte proceso previo de activación, el cual tendría lugar en el tiempo que transcurre entre la diarrea y el diagnóstico de SUH

# *Estallido respiratorio en PMNs de pacientes con D+SUH*



# Apoptosis en PMNs de pacientes con D+SUH (Anexina/IP) Vivas



# Correlación entre estado funcional de los PMN y la severidad

|                              | SUH         |             |             |             | Correlación       |
|------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------------|
|                              | Sanos       | Leves       | Moderados   | Graves      |                   |
| N° PMN (x10 <sup>9</sup> /L) | 3.8±0.38.   | 8.7±0.9*    | 10.4±1.2*   | 15.3±1.2*#  | *r=0.6, p=0.001   |
| CD16                         | 151.1±16.4  | 55.0±8.3*   | 60.8±10.1*  | 39.8±7.0*   | <i>No correl.</i> |
| CD11b                        | 184.0±26.1  | 124.1±19.2* | 80.1±11.2*  | 62.3±7.9*§  | -0.37,p=0.01      |
| CD66b                        | 184.6±32.31 | 156.8±16.5  | 81.2±15.9*§ | 103.3±13.8* | -0.35,p=0.01      |
| Mieloperox                   | 166.7±24.0  | 160.3±23.0  | 99.3±17.1§  | 96.0±19.3*§ | -0.51,p=0.01      |
| IROs                         | 99.0±10.1   | 113.6±21.7  | 123.3±34.0  | 37.7±17.4*§ | -0.51,p=0.01      |
| % apoptosis                  | 54.6±3.3    | 45.7±4.2    | 41.05±16.5  | 25.1±2.9*§  | -0.51,p=0.01      |

\*p<0.05 vs sanos; Sp<0.05 vs leves

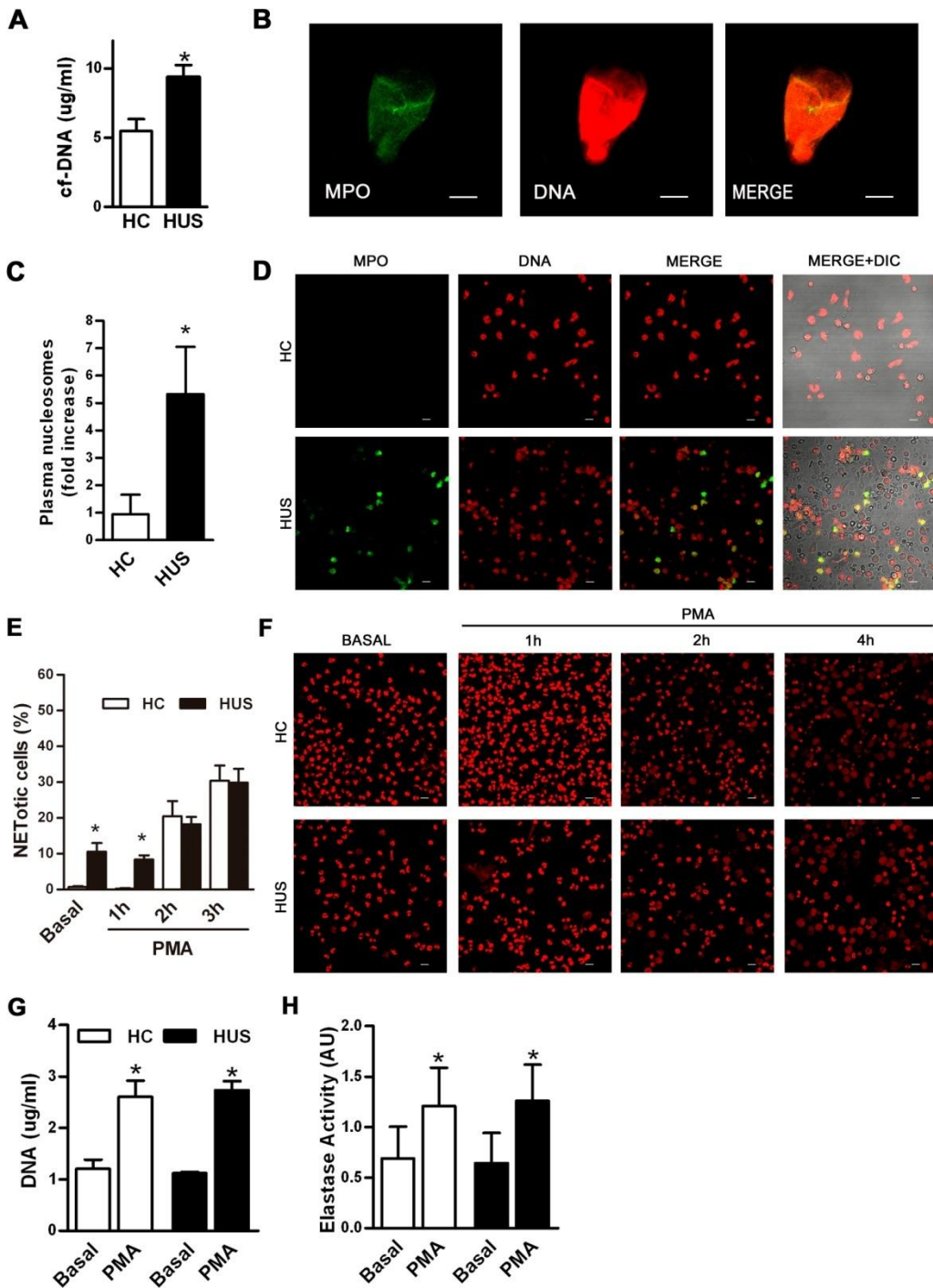
Correlation Between PMN Functional State and severity in patients with the typical form of HUS.

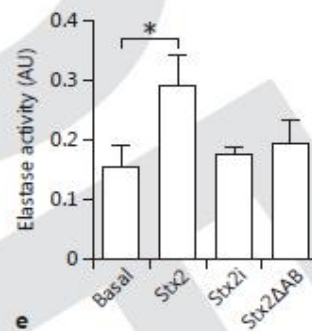
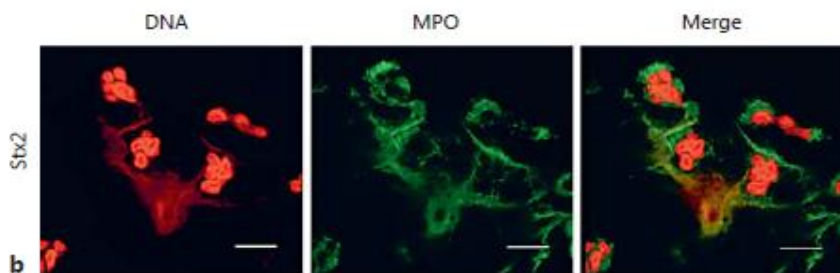
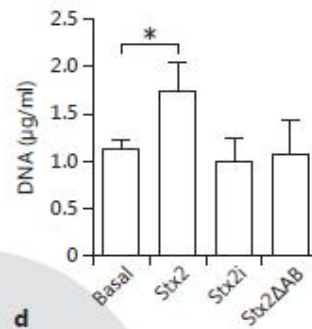
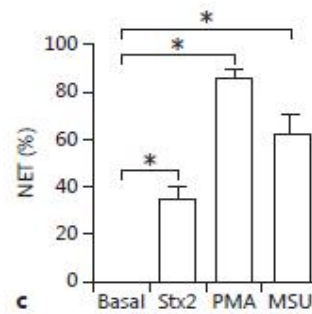
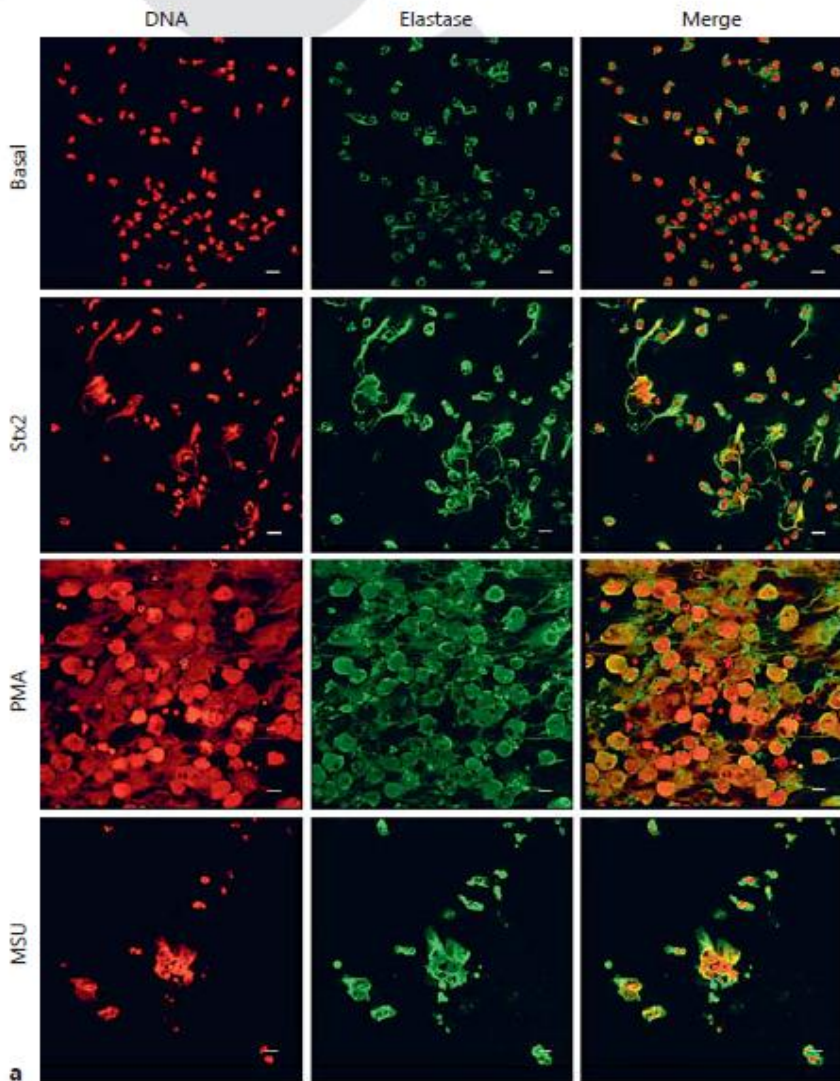
Fernández, et al. *Pediatric Res.* 61:123-8, 2007

# Aumento de cfDNA en plasma de pacientes con SUH

Nucleosomas: DNA-Histonas-MPO-Elastasa

Aumento de la Netosis espontánea en pacientes con SUH



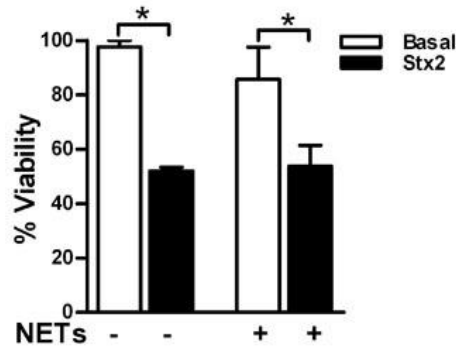


La Stx2 y cristales de urato inducen NETosis en PMN normales

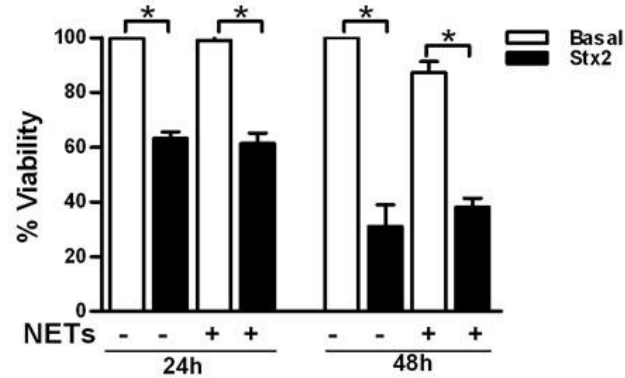
4hs incubación  
DNA: IP  
Elastasa y MPO, acs

# Efecto de las NETs sobre células epiteliales (Vero) (A) y endoteliales renales humanas (HGEC)(B-D).

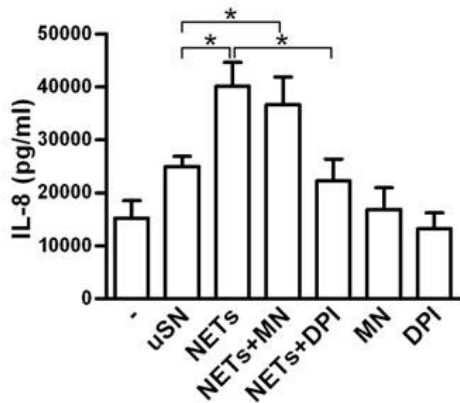
A



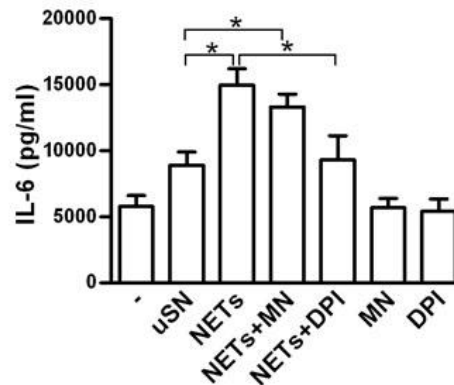
B



C



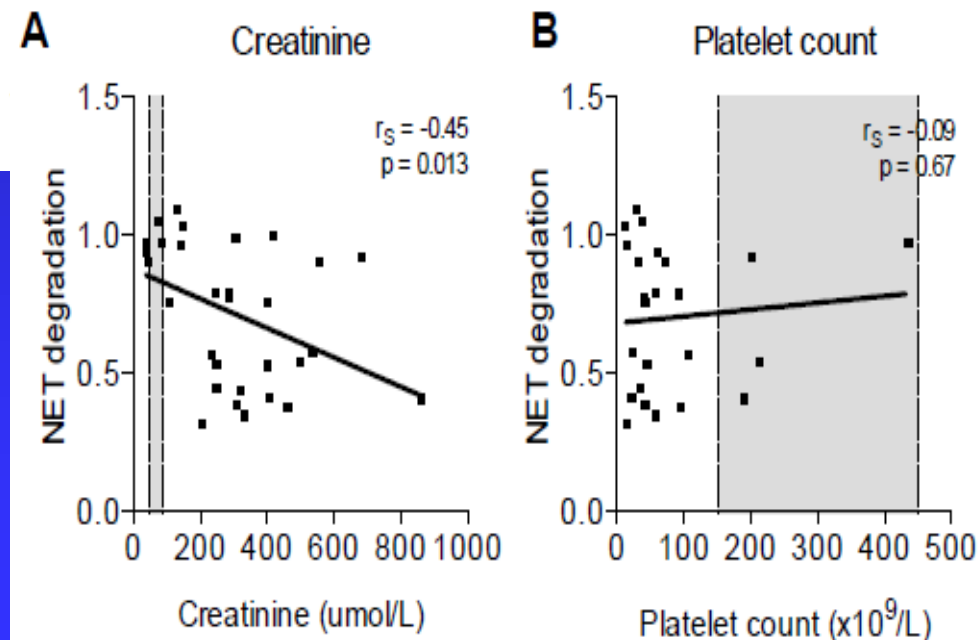
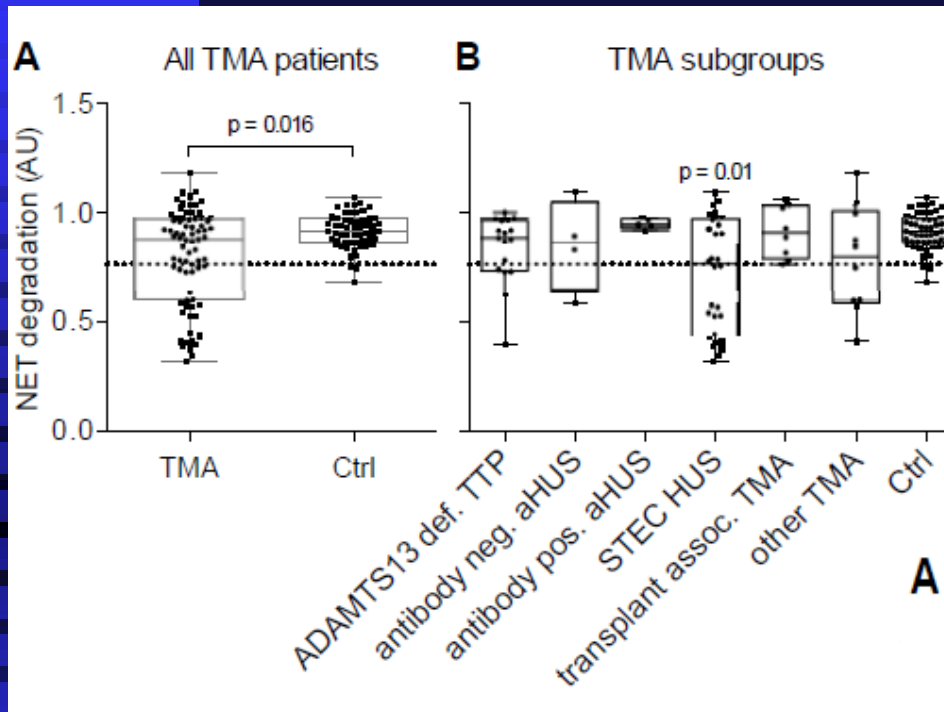
D



HGEC son cultivadas en ausencia (uSN) or presencia (NETs) generadas por cristales de urato con MNase (NETs+MN) o DPI (NETs+DPI)

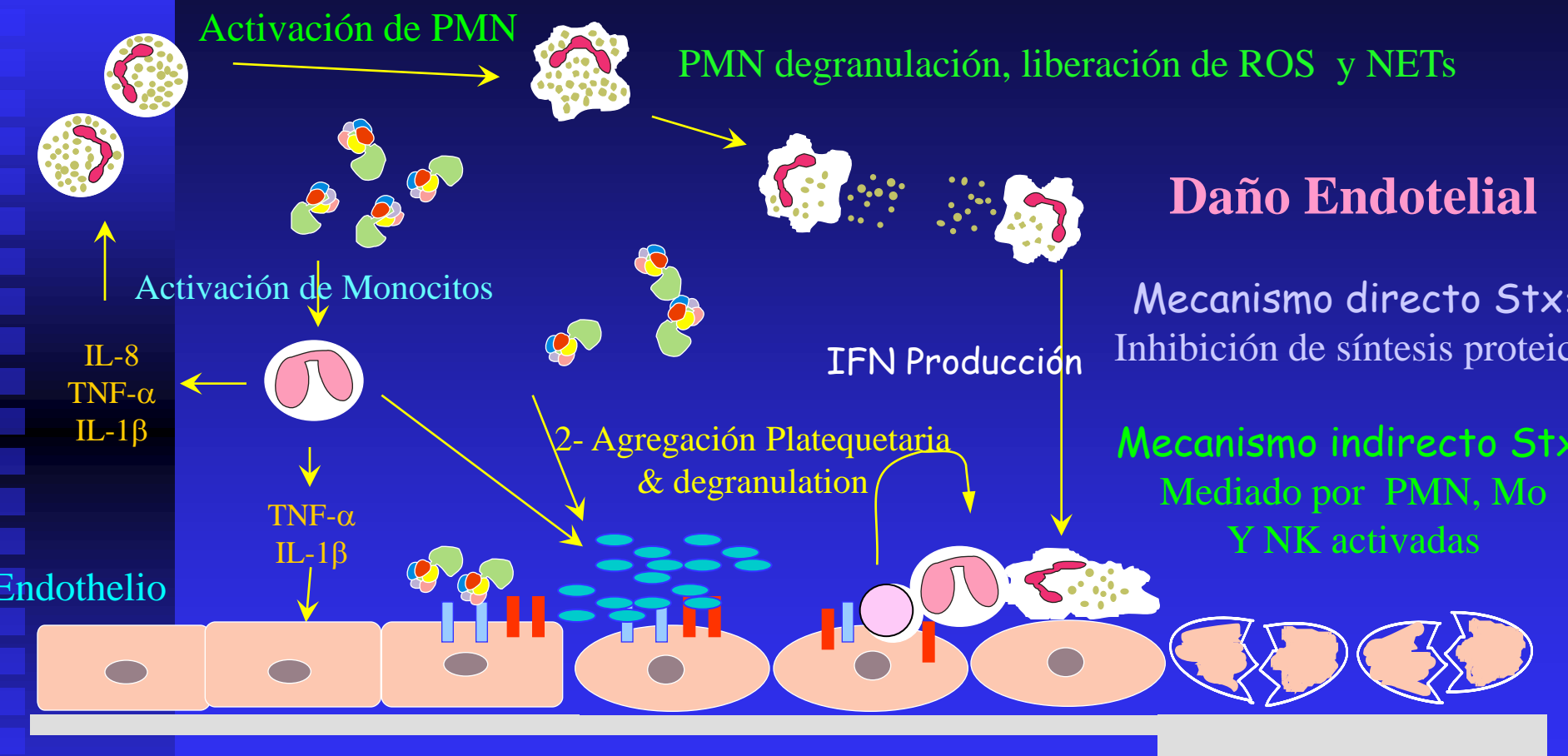


# Disminución en la degradación de NETs en MAT



Decreased neutrophil extracellular trap degradation in Shiga toxin associated haemolytic uremic syndrome. J Leffler, et al. JII 2016

# Papel de la respuesta inflamatoria en el daño inducido por la toxina Shiga

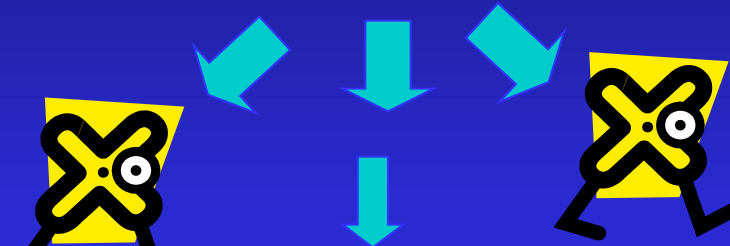


- 1- Inducción de Gb3
- 2- Activación endotelial:  $\uparrow$  P and E-selectins & ICAM, secreción de IL-8 ,
- 3.- Inducción de FKN

La intensidad o tipo de respuesta inflamatoria durante el prodromo, tendría un papel activo en la evolución de la enfermedad

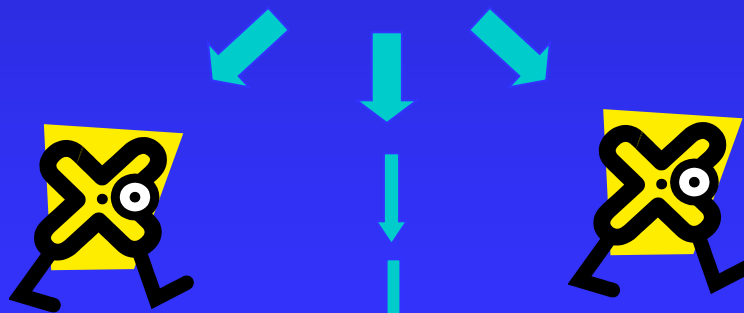
Infección con *E. coli* productora de Stx

Diarrea no sanguinolenta



(90%)

Diarrea sanguinolenta



SUH (10%)

Papel de la Respuesta Inflamatoria?  
?

# Conclusiones

Hemos demostrado la existencia de una intensa respuesta inflamatoria que tiene lugar en los niños con infecciones por STEC previamente al diagnóstico clínico de SUH. Proponemos que las características cuali y cuantitativas en el proceso inflamatorio serían determinantes en la evolución a SUH

La búsqueda de nuevos parámetros indicadores de evolución o mal pronóstico en niños infectados con STEC.

Terapias específicas deberían suministrarse previo al desarrollo de SUH.

MUCHAS GRACIAS!!!



# Laboratorio de Patogénesis e Inmunología de Procesos Infecciosos

Dra María Victoria Ramos

Dra. Romina Fernandez Brando

Dra. María Pilar Mejías

Lic. Gabriela Fiorentino

Dra. Marina S Palermo

Lab. Inmunidad Innata

Dra Florencia Sabbione

Dra Analía Trevani

Hospital Municipal del Niño, La Matanza, Pcia BsAs

Departamentos de Nefrología

Dr. Ramón Exeni

Dra. Adriana Santiago

Dra. Claudia Exeni

Dra. M. Carmen Laso

Dra. Irene Grimoldi

Hospital Austral, Pilar, Pcia Bs As

Dra. Andrea Exeni