

Activación de la respuesta inmune innata y específica en los pacientes con SINDROME UREMICO HEMOLITICO (SUH).

Div. Inmunología. IIHEMA
Academia Nacional de Medicina

- 1) Porqué los menores de 5 años son los más afectados de SUH?
- 2) Porqué sólo el 10% de los infectados desarrolla SUH?
- 3) Porqué el riñón es el principal órgano afectado?

Hipótesis de trabajo:

- ⇒ La respuesta inmune innata ó inflamatoria es capaz de potenciar la toxicidad de la toxina Shiga.
- ⇒ La respuesta inmune humoral específica es capaz de neutralizar la toxina Stx y proteger del SUH

Datos Previos:

- * 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 deSUH.
- * Los LPS y las citoquinas TNF, IL-1 α aumentan la sensibilidad de células epiteliales y endoteliales a los efectos tóxicos de la Stx.
- * En modelos animales el LPS aumenta el daño renal y la mortalidad por Stx.

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

Alta deformabilidad

Secreción de efectores en la rta inflamatoria: citoquinas
y quimioquinas

Componentes bactericidas y bacteriostáticos

Gránulos de los PMN humanos

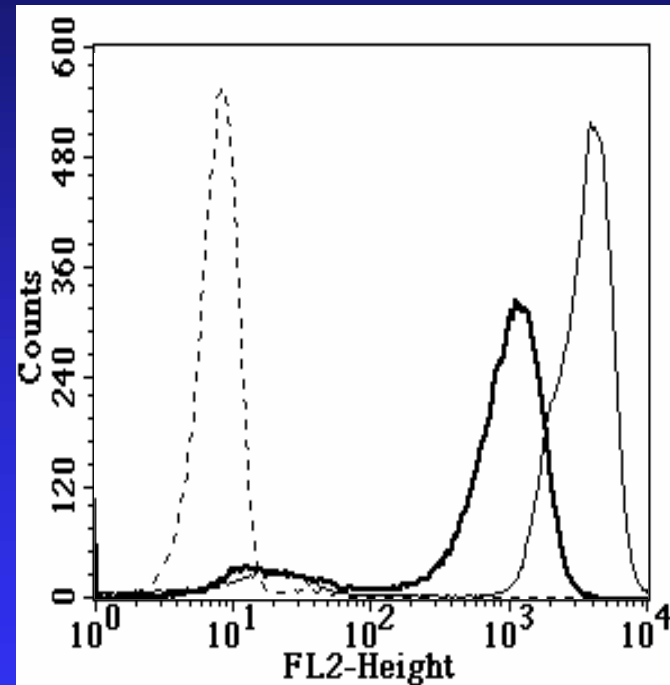
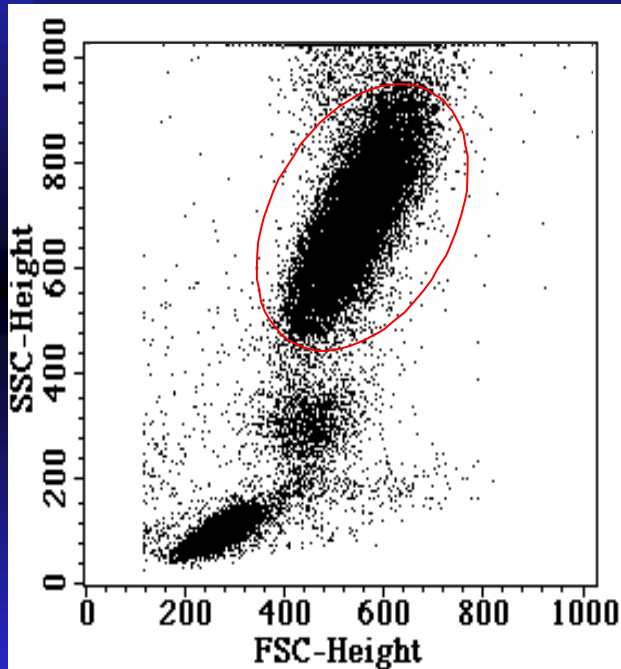
Biogénesis →

Mieloblasto	Promielocito	metamielocito		PMN maduro
	<i>Gránulos primarios (azurófilos)</i>	<i>Gránulos secundarios (específicos)</i>	<i>Gránulos terciarios (organelas almace)</i>	<i>Vesículas secretorias</i>
<i>Enzimas mieloides</i>	<ul style="list-style-type: none"> • MPO 	<ul style="list-style-type: none"> • Lisozima 		
<i>Serín proteasas neutras</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Elastasa • Catepsina G • Proteinasa 			
<i>Metaloproteinasas</i>		<ul style="list-style-type: none"> • Colagenasa 	<ul style="list-style-type: none"> • Gelatinasa 	
<i>Hidrolasas Acidas</i>	<ul style="list-style-type: none"> *N-acetil-β glucuronidasa * Catepsina D * β-glucuronidasa * β-glicerofosfatasa * α-manosidasa 		<ul style="list-style-type: none"> *N-acetil-β glucuronidasa * Catepsina D * β-glucuronidasa? * β-glicerofosfatasa * α-manosidasa? 	
<i>otros</i>	<p>β-glucuronidasa</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Lactoferrina • Prot unión a Vitamina B12 • Citocromo B 		<ul style="list-style-type: none"> • Proteínas plasmáticas: albúmina, tetranectina
<i>Membrana</i>	<ul style="list-style-type: none"> • CD63 • CD68 	<ul style="list-style-type: none"> • CD15 • CD66 • Citb-558 (NADPH-ox) • R-FMLP • R-TNF • R-Fibronectina 	<p>CD66</p> <p>NADPH ox</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Fosfatasa alcalina • Cit b-558 • CD11b/CD18 • R-FMLP • R_uropasminog • CD10,CD13,CD16 • CD14,CR1,DAF

CD11b/CD16

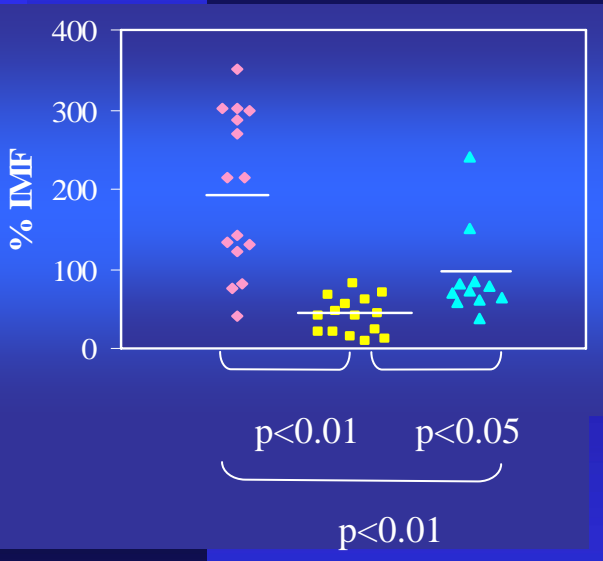
← Orden de degranulación

Parámetros de activación en los PMN

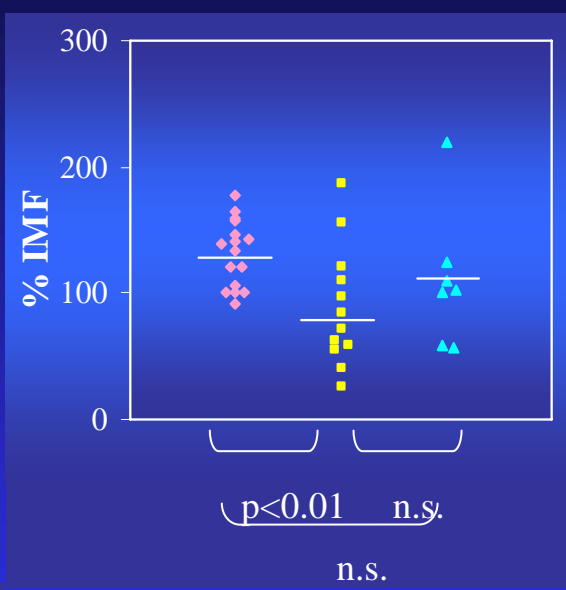


Parámetros de activación de PMN en los pacientes

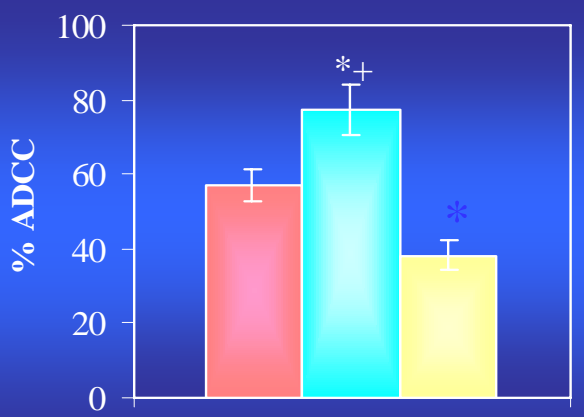
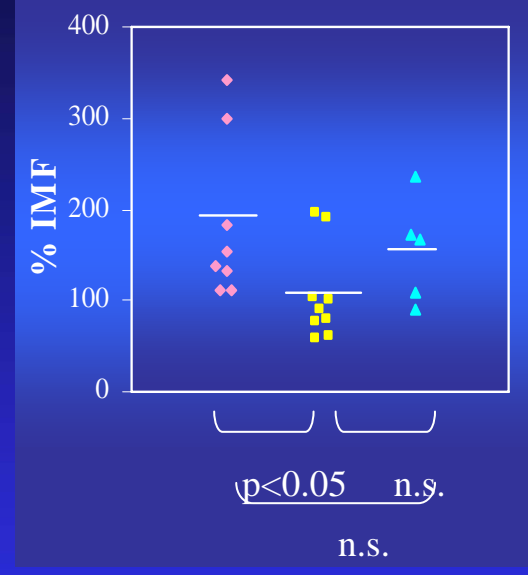
CD16 (FcγRIII)



CD11b



MPO

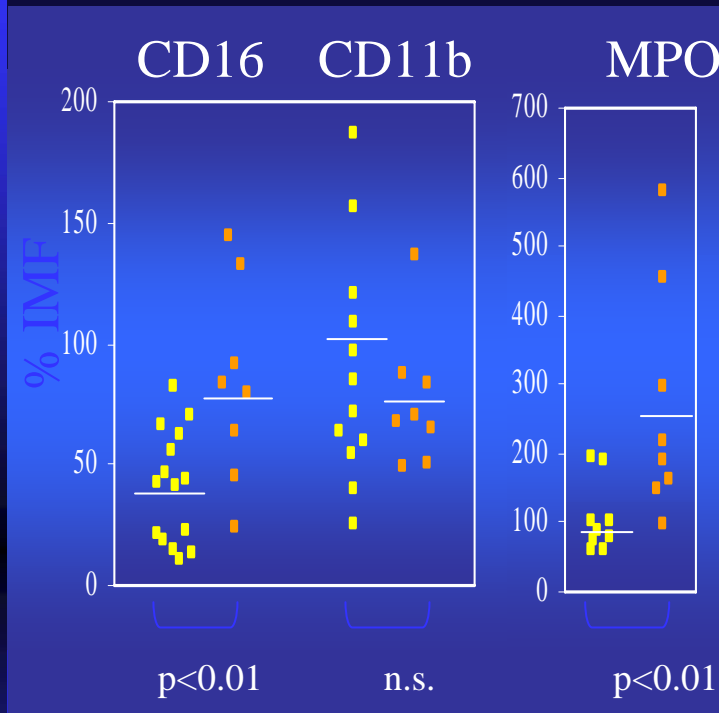


Disminución de marcadores de activación y degranulación en la membrana de PMN

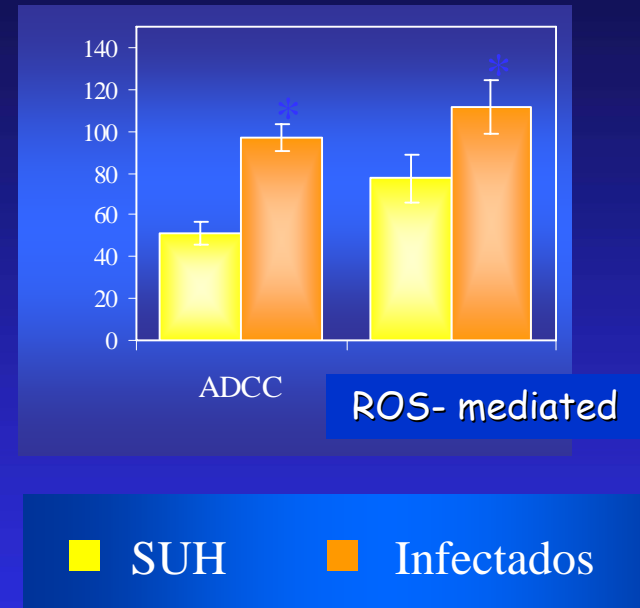


* p < 0.05 vs. sanos
+ p < 0.05 vs. SUH

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



Capacidad Citotóxica

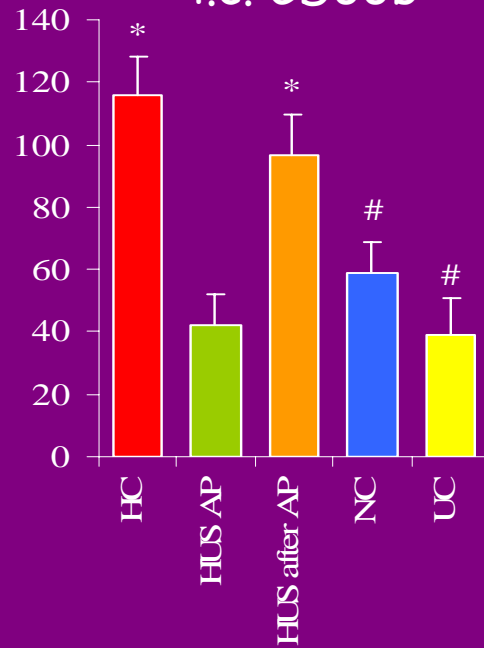


➤ Estas diferencias aún persisten

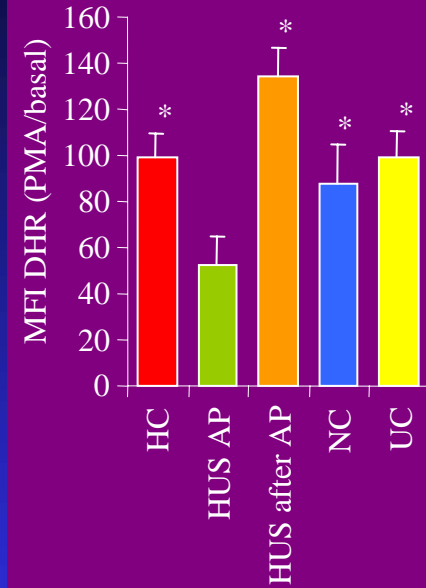
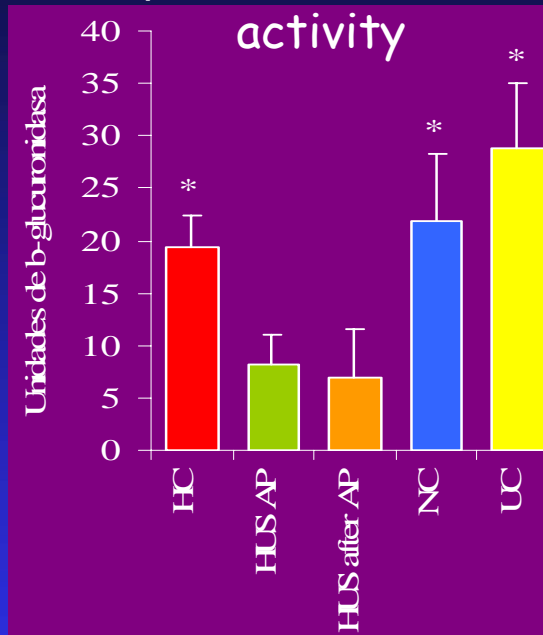
Fernández et al. Phenotype markers and function of peripheral neutrophils in children with HUS. *Pediatric Nephrology*. 17:337-344, 2002.

Contenido intracelular de marcadores de degranulación evaluados en los PMN de pacientes con ROS-production

i.c. CD66b



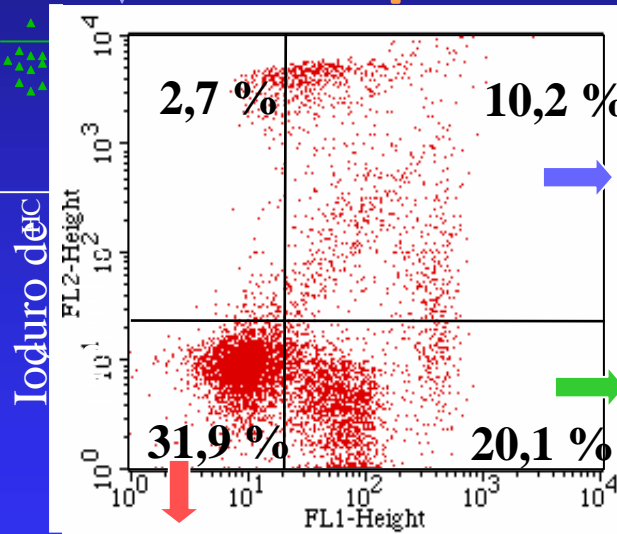
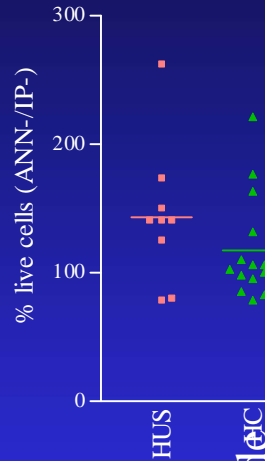
SUH
β-Glucuronidase activity



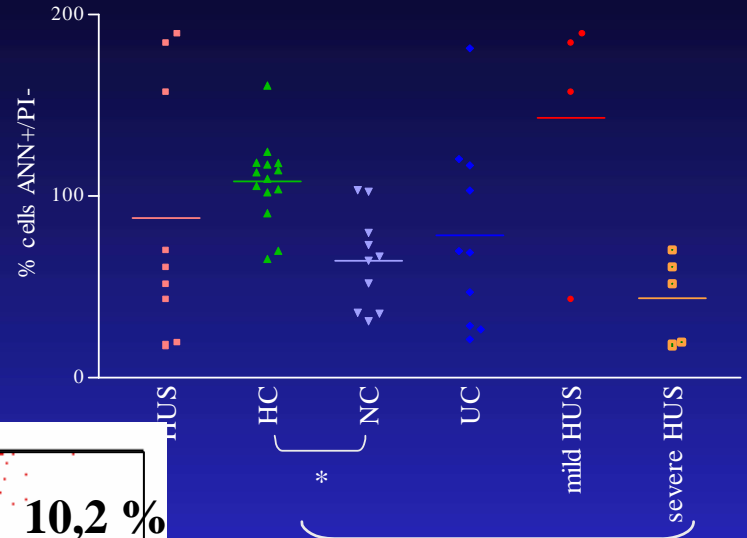
* p < 0.05 vs SUH
p < 0.05 vs S

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.

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



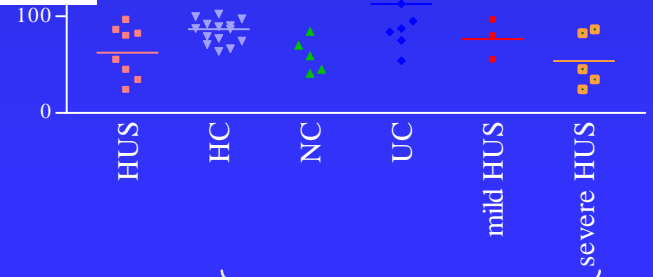
Vivas Anexina V



Apoptosis temprana

Apoptosis tardía

Apoptosis temprana



*

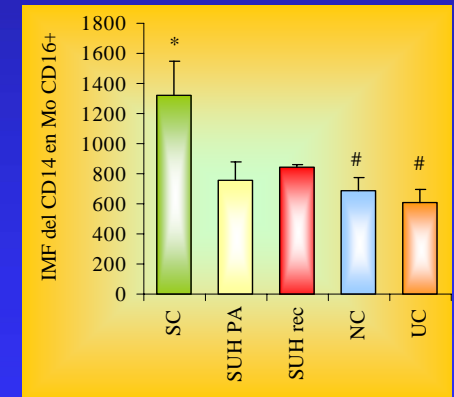
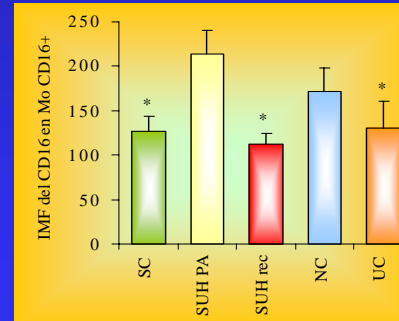
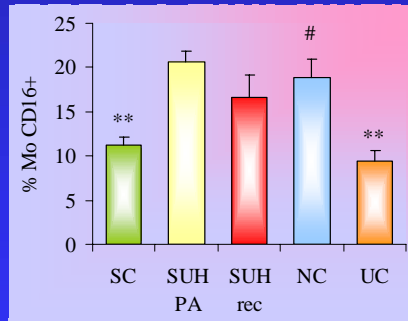
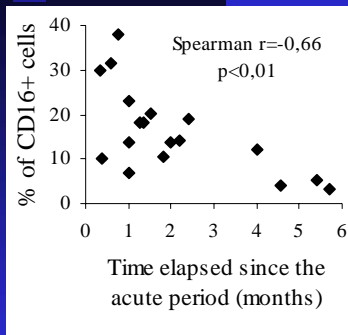
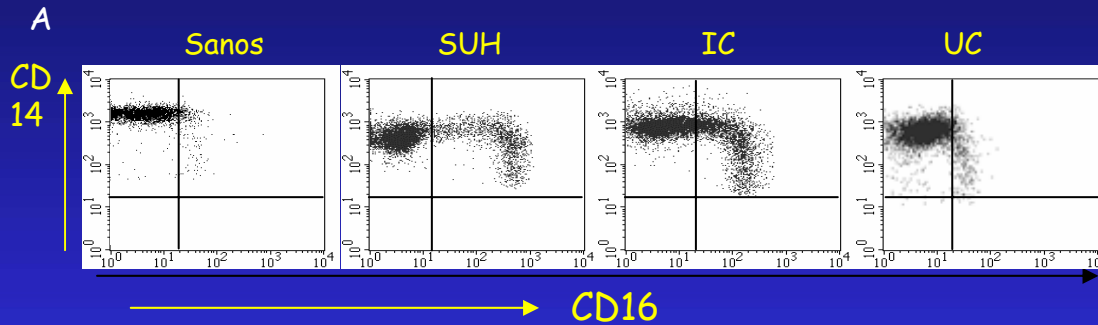
Correlación entre estado funcional de los PMN y la severidad

	SUH				Correlación
	Sanos	Leves	Moderados	Graves	
N° PMN (x10 ⁹ /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; §p<0.05 vs leves

El otro componente celular inflamatorio: los monocitos???

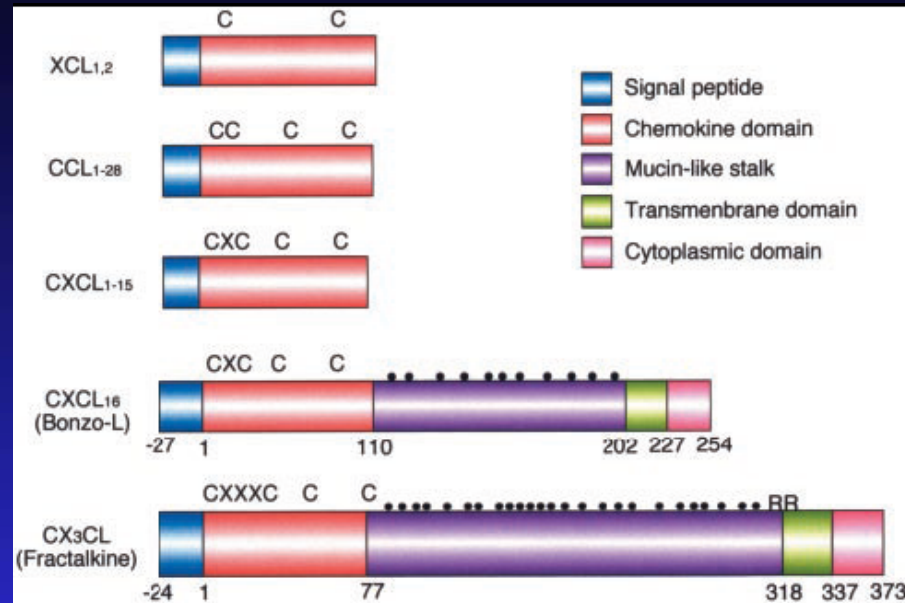
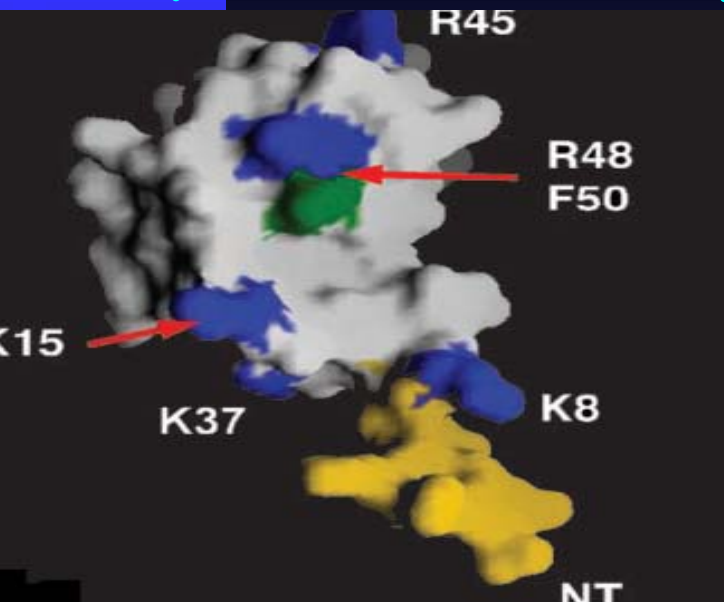
- Datos previos:
- Niveles aumentados de citoquinas derivadas de los monocitos (Mo) en suero y orina de pacientes con SUH.
- * La Stx in vitro induce la síntesis de IL-1 β , TNF, IL-6, e IL-8 por Mo.
- La eliminación de macrófagos hepáticos y esplénicos disminuye la toxicidad de la Stx2 en ratones.



Los Mo de los pacientes con SUH muestran signos de haber recibido un estímulo activante previo, el cual los ha diferenciado hacia un perfil o "subset inflamatorio"

Fernandez et al. Differential expression of function-related antigens on blood monocytes in children with Hemolytic Uremic Syndrome. *J. Leuk. Biol.* In press.

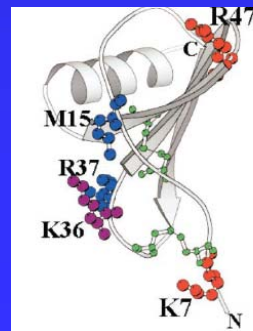
Porqué es el riñón el principal órgano afectado??



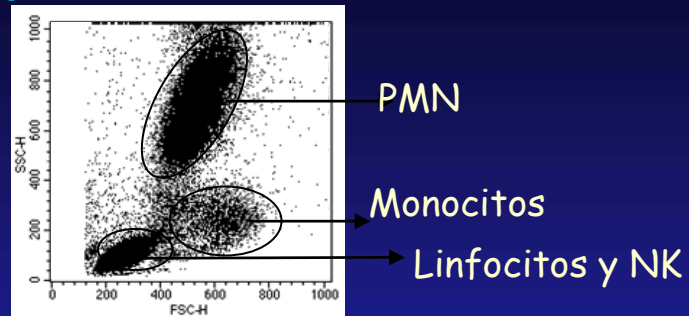
Fractalquina: CX₃CL1

- * La expresión de fractalquina y la presencia de células que expresan su receptor (CX₃CR1) en el riñón ha sido demostrado en pacientes con varios tipos de nefropatías.
- * En modelos animales, el tratamiento con anti-CX₃CR1 bloquea la infiltración de leucocitos en el glomérulo y mejora la función renal.

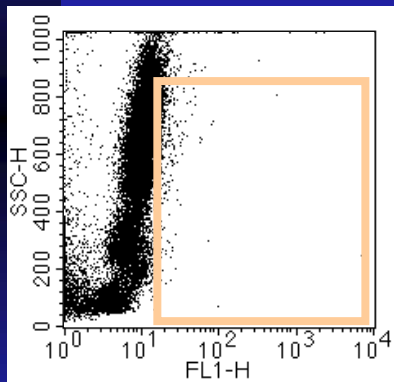
Fractalquina expresada sobre el endotelio inflamado podría potenciar el daño vascular, capturando células citotóxicas circulantes que expresan el CX₃CR1.



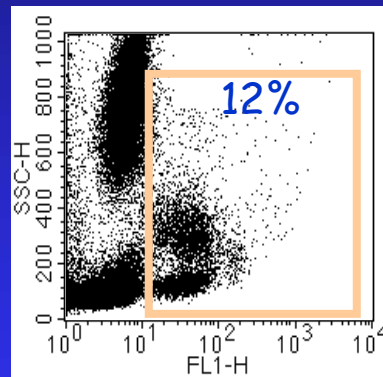
Poblaciones Leucocitarias en sangre periférica que expresan el CX₃CR1



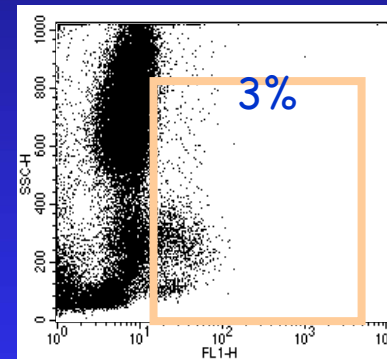
SSC
Control de isotipo



Niños sanos



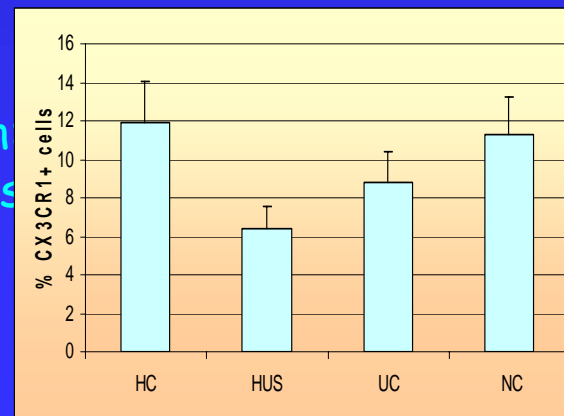
Niños con SUH



CX₃CR1

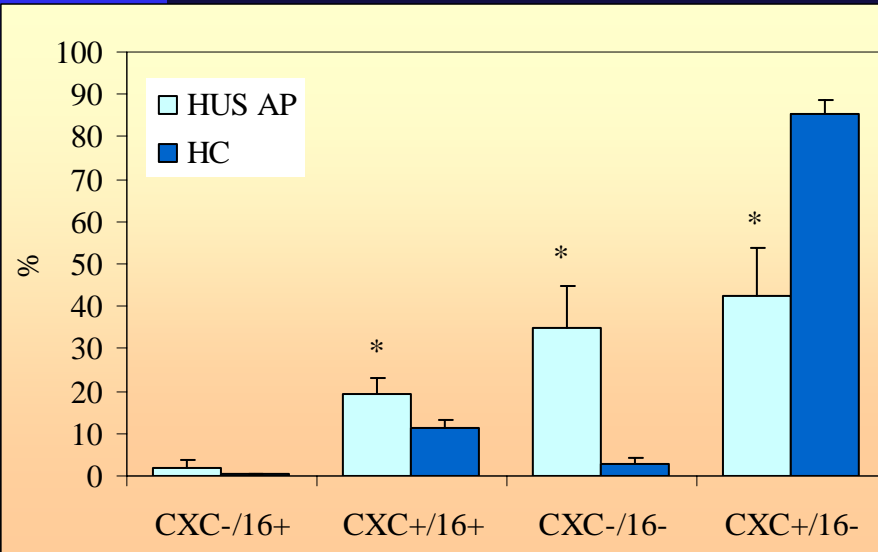
Leucocitos que expresan el CX₃CR1 incluyen monocitos, células NK y un subconjunto de células T citotóxicas

Todas estas poblaciones tienen un alto potencial citotóxico

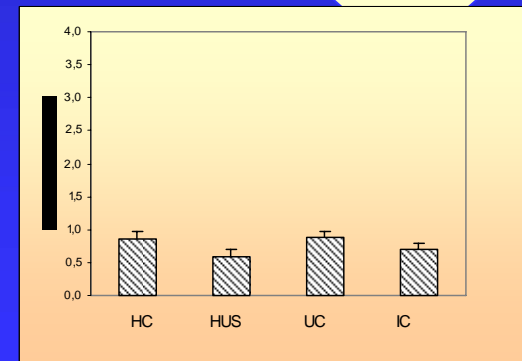
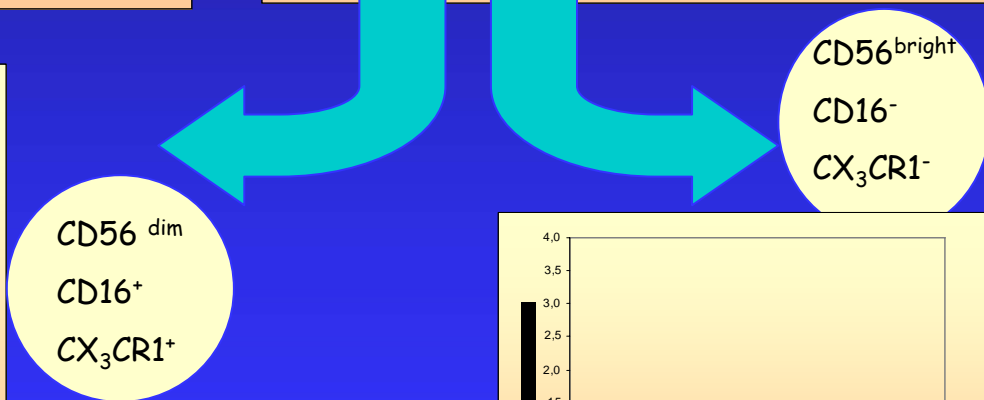
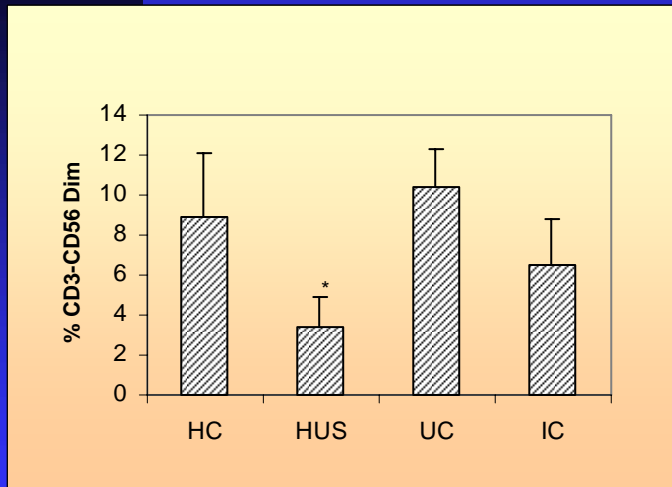
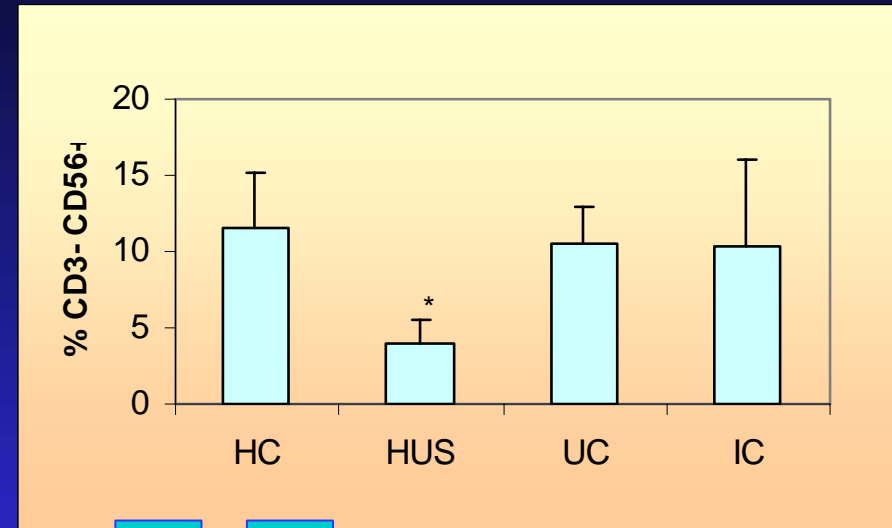


Cambios en la poblaciones positivas para CX₃CR1

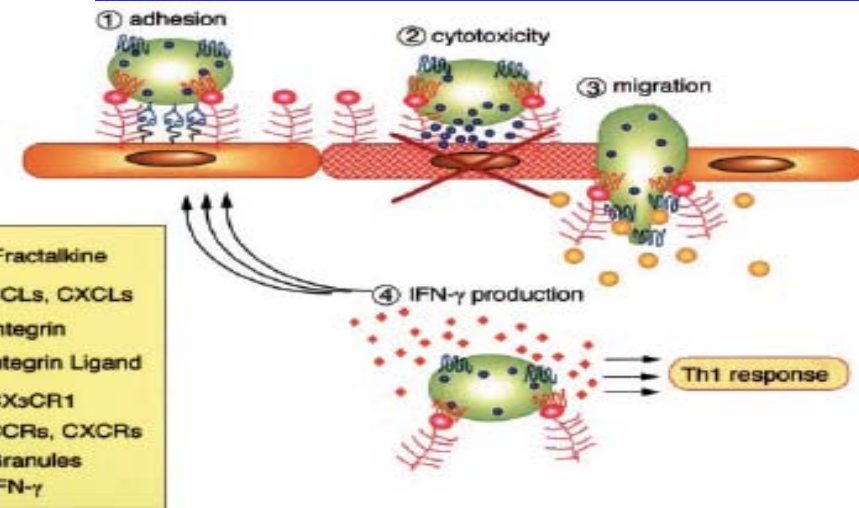
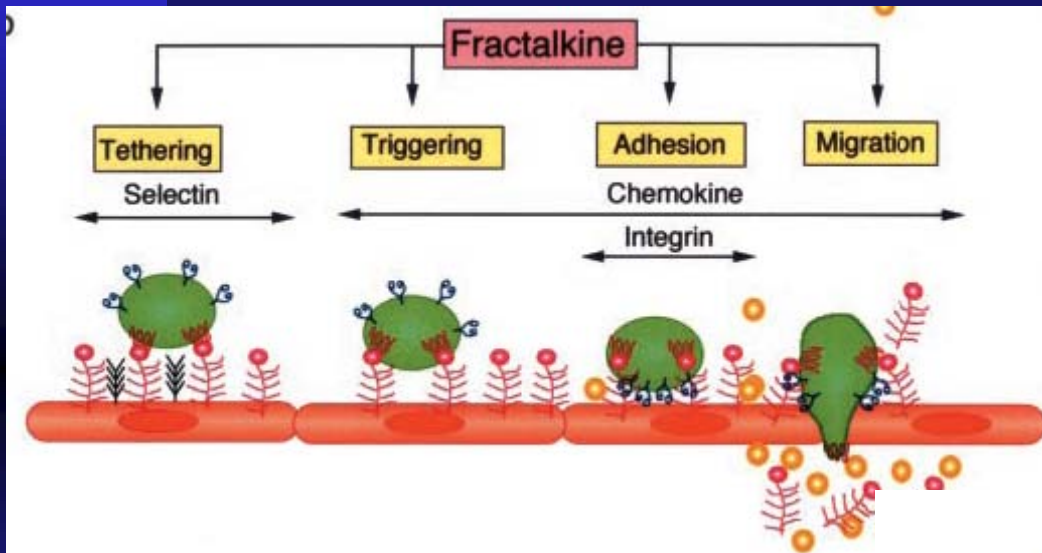
Monocitos



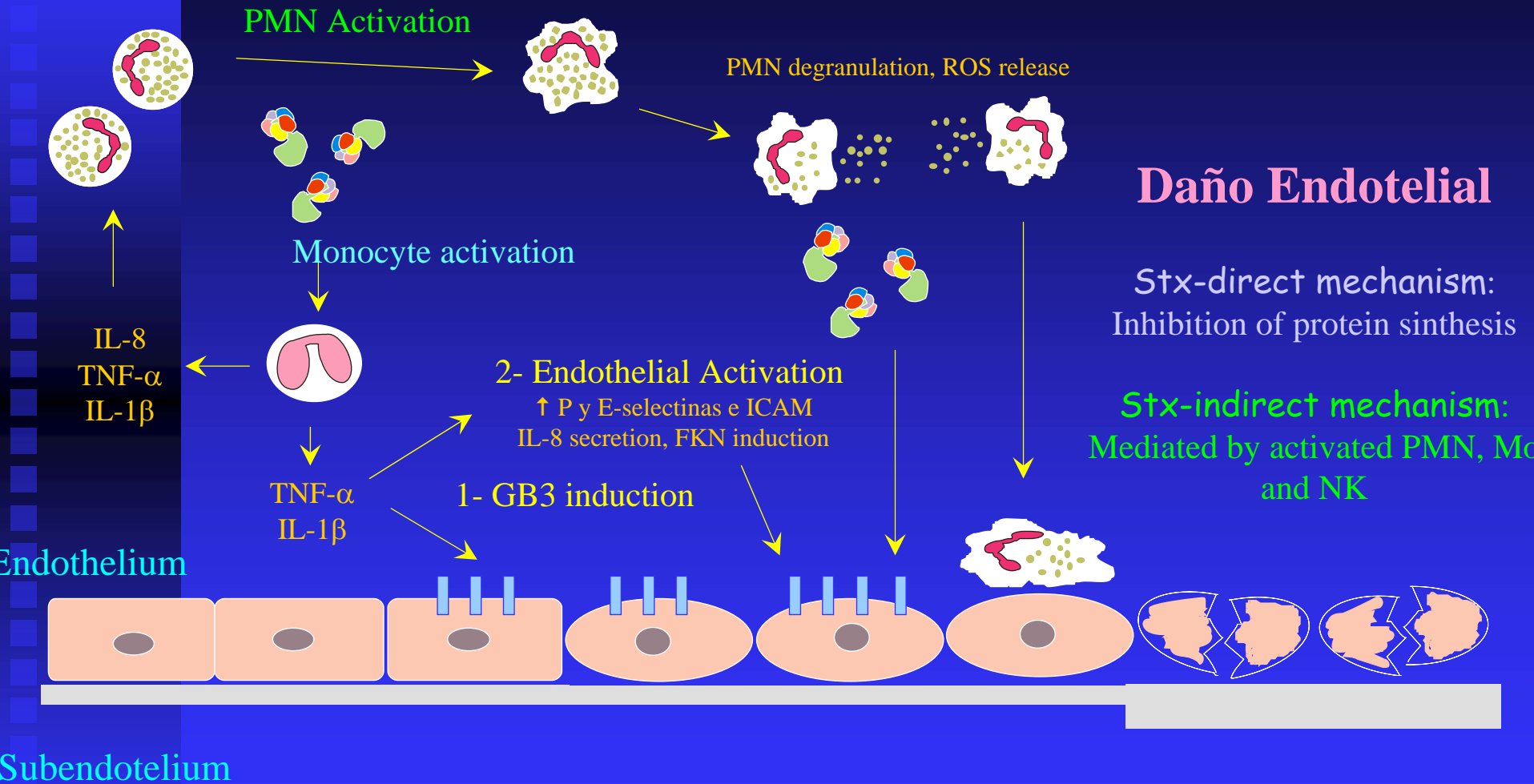
Células NK



La expresión aumentada de fractalquina en el riñón y la específica disminución de los leucocitos circulantes positivos para este receptor, sugiere que esta quimioquina podría participar en la patogénesis del SUH, favoreciendo la adhesión al endotelio y epitelio, y potenciando el daño iniciado por la toxina Stx2.



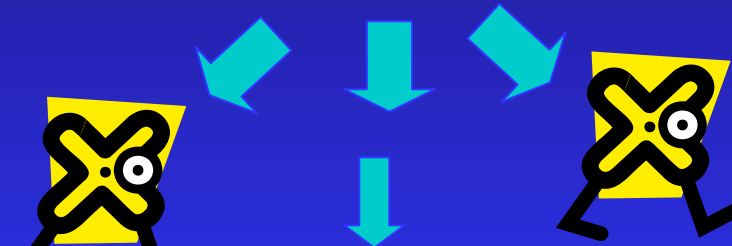
Papel de la respuesta inflamatoria en la toxicidad de la Stx.



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

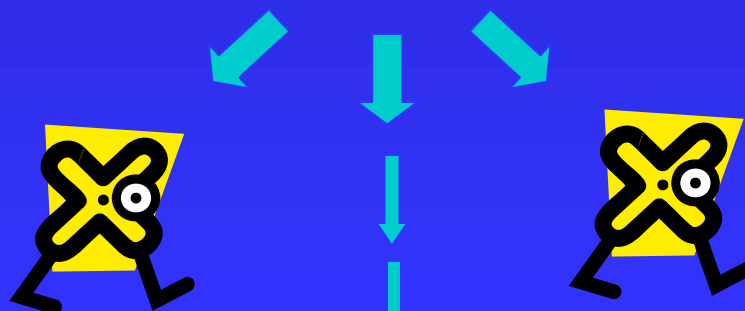
Infección con *E. coli* productora de Stx

Diarrea no sanguinolenta



(90%)

Diarrea sanguinolenta



SUH (10%)

Papel de la
Respuesta
Inflamatoria?
?

Academia Nacional de Medicina

División Inmunología

Lic Leticia Bentancor

Lic María Victoria Ramos

Bioq. Romina Fernández Brando

Dra. Gabriela Fernández

Dra. Graciela Dran

Gabriela Camerano

Dr. Martín Isturiz

Departamento de Patología.

Dr. Roberto Meiss

Servicios de nefrología

Hospital Municipal del Niño,
La Matanza, Pcia Bs As.

Dr. Ramón Exeni

Dra. Irene Grimoldi

Dra. Marta Alduncín

Hospital Nacional de Pediatría
"J.P. Garrahan"

Dr. Mario Diaz

Dra. Laura Lopez

Dra. Flavia Ramirez

Hospital de Niños
"R. Gutierrez"
Ciudad de Buenos Aires

Dra. Graciela Vallejo

Dra. Christian Elias-Costa

MUCHAS GRACIAS!!!