

PAPEL DE LA TOXINA SHIGA EN EL SÍNDROME UREMICO HEMOLITICO

VIRGINIA PISTONE CREYDT, PABLO NUÑEZ, JAVIER BOCCOLI, CLAUDIA SILBERSTEIN,
ELSA ZOTTA, JORGE GOLDSTEIN, CRISTINA IBARRA

Laboratorio de Fisiopatogenia, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Resumen En los últimos años, las infecciones por *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) y el desarrollo del Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) han cobrado tal relevancia desde el punto de vista clínico y como problema de salud pública, que se considera uno de los patógenos emergentes más importantes de infecciones transmitidas por alimentos. Las infecciones por STEC pueden manifestarse dentro de un amplio espectro clínico, tales como infecciones asintomáticas intestinales, diarrea acuosa, diarrea sanguinolenta (colitis hemorrágica) y complicaciones sistémicas conocidas con el nombre de SUH. En Argentina, el SUH es la principal causa pediátrica de insuficiencia renal aguda y la segunda de insuficiencia renal crónica. Hasta el presente no existe un tratamiento específico para tratar las infecciones por STEC y disminuir la progresión del SUH. Los mecanismos por los cuales la toxina Shiga (Stx) induce SUH pueden ayudar a encontrar nuevas estrategias para impedir o mejorar el pronóstico del SUH. En este artículo se describen recientes progresos que contribuyen a entender el papel de Stx en la patogénesis del SUH y nuevas estrategias usadas para prevenir el pasaje de la toxina a la circulación sistémica durante la fase diarreica o luego del establecimiento del SUH.

Palabras claves: toxina Shiga, SUH, diarrea, insuficiencia renal, daño cerebral

Abstract *Role of the Shiga toxin in the Hemolytic Uremic Syndrome.* In the last years, infection associated with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and subsequent Hemolytic-Uremic Syndrome (HUS) became relevant as a public health since it was considered as one of the most important emergent pathogen present in the food contaminated by cattle feces. STEC infection may be asymptomatic or begins with a watery diarrhea that may or may not progress to bloody diarrhea (hemorrhagic colitis) and HUS. In Argentina, HUS is the most common pediatric cause of acute renal insufficiency and the second cause of chronic renal failure. Up to now, STEC infection lacks of known effective treatment strategies that diminish risk of progression to HUS. The mechanisms by which Shiga toxin (Stx) induce HUS may help to find strategies to prevent or ameliorate HUS. In this article, recent progress that has contributed to understanding the disease pathogenesis of STEC is reviewed. New strategies to prevent further uptake of Shiga from the gut, either during the diarrheal phase or once HUS has developed are discussed.

Key words: Shiga toxin, HUS, diarrhea, renal failure, brain damage

Toxina Shiga y Síndrome Urémico Hemolítico

El SUH es una entidad clínica caracterizada por anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia e insuficiencia renal aguda que puede progresar a insuficiencia renal crónica¹.

La base patogénica del SUH está determinada por el daño de las células endoteliales de los pequeños vasos del colon, riñón y sistema nervioso central. Como esos tejidos no forman parte del epitelio intestinal donde colo-

niza *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC), se postula que el daño endotelial es una consecuencia directa de la acción de Stx que, liberada por las bacterias atraviesa la barrera intestinal y ganan acceso a la circulación sanguínea. Los genes de esta toxina se encuentran codificados en fagos que infectan las bacterias *Escherichia coli*.

Stx pertenece a una familia de proteínas estructural y funcionalmente relacionadas con la toxina Shiga sintetizada por la *Shigella dysenteriae*. Ellas son designadas por un número o una combinación de números y letras. La toxina Shiga tipo 1 (Stx1) difiere en un sólo aminoácido con la toxina Shiga de *S. dysenteriae*, mientras que la tipo 2 (Stx2) tiene solo 56% de identidad con Stx1². Además, algunas variantes de Stx2 son más virulentas en humanos, tal es el caso de Stx2c y ciertas formas de Stx2d, que pueden ser activadas por la elastasa presen-

Dirección Postal: Dra. Cristina Ibarra, Laboratorio de Fisiopatogenia, Depto. de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA, Paraguay 2155, 1121 Buenos Aires, Argentina.

e-mail: ibarra@fmed.uba.ar

te en el mucus humano³. Si bien las infecciones por STEC están asociadas a Stx1, Stx2 o ambas, la producción de Stx2 aumenta el riesgo de SUH.

Stx tiene una estructura AB5 que consiste en una subunidad A unida a un pentámero de cinco monómeros de subunidad B responsable de la unión de la toxina a las células del huésped. Hasta el presente, el principal receptor identificado para Stx1 y Stx2 en humanos es el receptor globotriaosilceramida o Gb3, y la expresión en la superficie de las células blanco está ligada a la citotoxicidad⁴. Una vez que la toxina se une al receptor, se internaliza y sigue un transporte retrógrado vía el complejo de Golgi hacia el retículo endoplásmico y la membrana nuclear⁵. La subunidad A de Stx se trasloca al citoplasma donde actúa como una glicosidasa removiendo una adenina de la unidad ribosomal 28S, lo que resulta en una inhibición irreversible de la síntesis de proteínas⁶. Recientes estudios demuestran que la actividad ribotóxica también puede inducir apoptosis o muerte celular programada⁷.

Si bien la citotoxicidad de Stx está ligada a la expresión del receptor Gb3 en la superficie celular, la sensibilidad de una célula a la toxina no sólo se correlaciona con la cantidad de Gb3 expresado en su superficie sino también con la estructura del receptor. Modificaciones de la longitud de la cadena de ácidos grasos del Gb3 o disociación del Gb3 de los arreglos lipídicos de la membrana pueden conducir a una terminación prematura del transporte retrógrado al complejo de Golgi^{8,9} o a un transporte hacia el compartimiento lisosomal¹⁰. Ambas alteraciones resultan en una sensibilidad reducida o, más aún, en una resistencia a la inhibición de la síntesis de proteínas. La exitosa inhibición de la síntesis de proteínas por Stx depende del clivado de su subunidad A en un fragmento A1 de 27,5 kDa enzimáticamente activo y otro A2 de 4,5 kDa^{11,12}. Este corte está mediado por furina, una proteasa de serina dependiente de calcio localizada en el aparato de Golgi. En la clivado y activación de la subunidad A ocurre a una menor velocidad en células que no poseen furina y se la atribuye a la presencia de calpaína en el citoplasma o catepsina en los lisosomas^{11,13}.

La toxina Shiga en intestino

Si bien la mayoría de los datos obtenidos acerca del tráfico de Stx y su citotoxicidad están basados en estudios realizados en células Gb3 positivas, el hallazgo del transporte retrógrado de Stx en la línea celular T84 que carece de receptores Gb3¹⁴ es de particular interés, ya que son células usadas como modelo de epitelio intestinal humano y además son resistente a la acción de la toxina¹⁵. En estas células se detectó Stx1 en endosomas, Golgi, retículo endoplásmico y membrana nuclear¹⁴. Además, el clivado de la subunidad A ocurre luego de 6 ho-

ras de incubación mientras que la citotoxicidad no se observa aún en períodos de 24 horas. Aunque estos resultados se atribuyen a deficiencias en la acción ribotóxica de Stx, se necesitan investigaciones adicionales para clarificar este punto.

En cambio, en otra línea intestinal humana, Caco-2, que expresa receptores Gb3 se demostró que Stx1 y Stx2 se transportan al retículo endoplásmico, la subunidad A de ambas se activa mediante un clivado dependiente de furina y producen ribotoxicidad con la consecuente inhibición de la síntesis de proteínas e inducción de apoptosis celular¹⁵. Asimismo, nosotros demostramos que Stx2 ejerce un efecto citotóxico tanto en células Caco-2 como en T84, aunque el efecto fue significativamente mayor en Caco-2¹⁶. Por otra parte, en ambas líneas celulares también se describió un movimiento de la toxina a través de la barrera intestinal sin aparente daño celular, probablemente vía un camino transcelular activo¹⁷.

El conjunto de estos resultados parece indicar que la citotoxicidad va asociada a la presencia del receptor Gb3 aunque su expresión en la membrana apical de las células epiteliales de la mucosa colónica está discutida. Algunas investigaciones demuestran la existencia del receptor Gb3¹⁸ y otras su ausencia¹⁵, pero en todas ellas se describen alteraciones estructurales y funcionales del epitelio por acción de la toxina.

Nosotros describimos una inhibición significativa del transporte de agua a través de la mucosa colónica humana *in vitro* y una destrucción importante de la superficie intestinal luego de incubar el lado mucoso del tejido con Stx2 pura o sobrenadantes de STEC aislados de niños con SUH en Argentina¹⁹. En ambos casos se observó una infiltración de neutrófilos, siendo más importante en tejidos incubados con sobrenadantes bacterianos que contenían lipopolisacáridos (LPS). Teniendo en cuenta que en infecciones por STEC frecuentemente se encuentran leucocitos en materia fecal²⁰, y que la migración de neutrófilos hacia la luz intestinal puede promover el pasaje de la toxina a través de la barrera intestinal²¹, es posible que la inflamación que observamos potencie la acción citotóxica de Stx.

En ausencia de la subunidad A, el pentámero de subunidades B de Stx2 (Stx2B) fue capaz de inhibir la absorción de agua en colon humano *in vitro* y producir acumulación de fluido acuoso en fragmentos de colon ligado de rata. Estos efectos podrían ocurrir por una alteración directa de los mecanismos involucrados en el transporte de iones y agua y contribuir a la diarrea acuosa observada en los primeros días de la infección por STEC²².

La toxina Shiga en riñón

Una apreciación de la alta sensibilidad a Stx de las células endoteliales de la microvasculatura sanguínea que

expresan Gb3 resultó en la hipótesis que la toxina directamente inicia las lesiones clásicas del SUH: hinchamiento de las células endoteliales glomerulares, desprendimiento de la membrana basal y subsecuente depósito de trombos de plaquetas y fibrina en la microvasculatura renal. Sin embargo, en los últimos años el paradigma de que el daño renal en el SUH se debe solamente a la destrucción de las células endoteliales está en revisión a partir de los estudios que aportan evidencias de un daño epitelial tubular directo producido por la toxina. El túbulo proximal fue el primero en ser claramente identificado como tejido blanco de Stx1²³ y numerosos trabajos describen la presencia de Gb3, la unión de Stx, su internalización y la producción de citoquinas^{24, 25}. En estudios de tejidos obtenidos de pacientes con SUH y en modelos *in vitro*, se demostró la estimulación de apoptosis en células de la corteza renal humana sugiriendo que la toxina puede iniciar la muerte celular programada de estas células por diferentes mecanismos²⁶⁻²⁸. Recientemente nosotros informamos que Stx2 y Stx2B alteran la funcionalidad específica medida como absorción neta de agua a través de una monocapa de células epiteliales tubulares renales humanas en cultivo y modifican significativamente la viabilidad celular, síntesis de proteínas y apoptosis celular²⁹. La acción tóxica de Stx2 y Stx2B sobre las células renales fue potenciada por algunos factores inflamatorios presentes en el suero y orina de pacientes con SUH^{30, 31}.

La toxina Shiga en sistema nervioso central

En Argentina existe una mortalidad de alrededor de un 2,4% de los casos de SUH asociado a infecciones por STEC³² siendo la mayor parte de estos casos debido a la injuria del Sistema Nervioso Central (SNC) por la acción de Stx. En estudios de especímenes obtenidos de cerebros provenientes de autopsias de niños que murieron por SUH se observó trombos en la microvasculatura, edema endotelial e infartos que sugerían que el evento inicial de la encefalopatía asociado al SUH era la injuria endotelial³³. Investigaciones realizadas en modelos animales también mostraron que el daño neurológico estaba asociado a la destrucción de la microvasculatura y de células neurogliales de la corteza cerebral³⁴. Se observó un daño selectivo de neuronas localizadas en las capas profundas de la corteza cerebelosa y cerebral, cerebro medio y médula espinal, y la toxina se detectó en la pared de los vasos sanguíneos de las zonas involucradas. Los estudios de imagen por resonancia magnética (MRI) detectaron lesiones cerebrales en el hipotálamo, hipocampo, tallo cerebral, médula y cerebelo de conejos inyectados con Stx2³⁵⁻³⁶. Aunque la técnica de MRI es confiable para mostrar daño cerebral, es ineficiente para señalar las áreas afectadas a nivel celular. Nosotros pu-

simos a punto la técnica de microinyección intracerebral en ratas de laboratorio, que tiene como ventaja el estudio de la acción directa de la toxina en SNC independiente de trastornos metabólicos gatillados por la patogenia del SUH³⁷. En experiencias preliminares con ratas, observamos degeneración de neuronas asociadas a apoptosis, astrocitos con edema citoplasmático relacionado con gliosis, y oligodendrocitos desmielinizados en el cuerpo estriado. También observamos cambios en el número de neuronas que expresan óxido nítrico y en la actividad de la óxido nítrico sintetasa en el cuerpo estriado, corteza cerebral e hipotálamo. Finalmente detectamos un aumento de la proteína ácida fibrilar glial en astrocitos hipertrofiados que contactaron con neuronas Stx2 positivas. El conjunto de estos resultados sugiere que Stx2 produce un daño directo en células del parénquima del SNC³⁸.

Estrategias para impedir la acción de la toxina Shiga

Las infecciones por STEC pueden ser asintomáticas o comenzar con una diarrea acuosa que progresa o no a diarrea sanguinolenta (colitis hemorrágica) al cabo de 1 a 2 días de infección. Posteriormente pueden aparecer las complicaciones sistémicas que se manifiestan clínicamente como SUH. Hasta el presente no hay un modo de predecir en quién y cómo se desarrollará el SUH. Una vez establecido, no existe un tratamiento específico que pueda impedir la progresión del daño que causa la toxina en los diferentes órganos, siendo el más común el daño renal.

Distintas estrategias se orientan entonces a impedir que Stx atraviese la barrera intestinal durante la fase diarreaica o luego del establecimiento del SUH. Teniendo en cuenta la alta afinidad de Stx1 y Stx2 por el receptor Gb3 se pensó que una estrategia podría ser la administración oral de análogos de Gb3 con capacidad para unir Stx y evitar su traslocación. Así se realizó un estudio multicéntrico controlado que evaluó los efectos de un compuesto formado por una matriz de silicona no absorbible que tenía ligado Gb3 (SYNSORB-PK). Los pacientes que recibieron SYNSORB-Pk tuvieron similar evolución del SUH que aquellos que no lo recibieron³⁹ lo que sugirió que una vez que comienza la diarrea sanguinolenta la toxina ya llegó a la vasculatura sanguínea y se diseminó por la circulación sistémica, de manera tal que impedir el pasaje de más Stx por la barrera intestinal no presentaría mayores beneficios. La posibilidad de administrar absorbedores de toxina a nivel sistémico así como anticuerpos monoclonales que neutralizan Stx puede ser otra estrategia a ser considerada⁴⁰.

A partir de nuestra experiencia en el estudio de la acción de Stx en células epiteliales humanas decidimos

usar la estrategia de neutralizar la citotoxicidad por bloqueo de los sitios de unión de la toxina. En experiencias preliminares observamos que mutantes no tóxicos de Stx2B neutralizaron la acción de la toxina en mucosa colónica humana *in vitro* y en células epiteliales tubulares renales humanas en cultivo⁴¹. Sin embargo, para que esta estrategia sea considerada válida deberá ser ensayada en un modelo animal de SUH que reproduzca la enfermedad humana. Recientemente se demostró en un modelo de ratón nulo para la síntesis del Gb3/CD77 (knock-out) que el daño tisular producido por Stx desaparece⁴¹. Esos resultados sugieren que la estrategia de neutralizar los receptores de Gb3 en los órganos blanco puede ser un método efectivo para protegerlos contra los desórdenes relacionados con la patogénesis de STEC.

Bibliografía

1. Repetto HA: Long-term course and mechanisms of progression of renal disease in hemolytic uremic syndrome. *Kidney Internat* 2005; 97: S102-S106.
2. Jackson M, Neill R, O'Brien AD, Holmes R, Newland J: Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *E coli* 933. *FEMS Microbiol Lett* 1987; 44:109-4.
3. Melton-Celsa AR, Kokai-Kun JF, O'Brien AD: Activation of Shiga toxin type 2d (Stx2d) by elastase involves cleavage of the C-terminal two amino acids of the A2 peptide in the context of the appropriate B pentamer. *Mol Microbiol* 2002; 43: 207-15.
4. Jacewicz MS, Acheson DW, Mobassaleh M, Donohue-Rolfe A, Balasubramanian KA, Keusch GT: Maturational regulation of globotriaosylceramide, the Shiga-like toxin 1 receptor, in cultured human gut epithelial cells. *J Clin Invest* 1995; 96: 1328-35.
5. Sandvig K, Van Deurs B: Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin. *Physiol Rev* 1996; 76: 949-66.
6. Endo Y, Tsurugi K, Yutsudo T, Takeda Y, Ogasawara K, Igarashi K: Site of action of a Vero toxin (VT2) from *E coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of the toxins. *Eur J Biochem* 1988; 171: 335-7.
7. Smith WE, Kane AK, Campbell ST, Acheson DWK, Cochran BH, Thorpe CM: Shiga toxin 1 triggers a ribotoxic stress response leading to p38 and JNK activation and induction of apoptosis in intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 2003; 71: 1497-504.
8. Sandvig K, Garred O, Prydz K, Kozlov JV, Hansen SH, Van Deurs B: Retrograde transport of endocytosed Shiga Toxin to the endoplasmic reticulum. *Nature* 1992; 358: 510-11.
9. Sandvig K, Ryd M, Garred O, Schweda E, Holm PK, Van Deurs B: Retrograde transport from the Golgi complex to the ER of both Shiga toxin and the non-toxic Shiga B-fragment is regulated by butyric acid and cAMP. *J Cell Biol* 1994; 126: 53-64.
10. Falguieres T, Mallard F, Baron C, et al. Targeting of Shiga toxin B-subunit to retrograde transport route in association with detergent-resistant membranes. *Mol Biol Cell* 2001; 12: 2453-68.
11. Garred O, Van Deurs B, Sandvig K: Furin-induced cleavage and activation of Shiga toxin. *J Biol Chem* 1995; 270: 10817-21.
12. Lea N, Lord JM, Roberts LM: Proteolytic cleavage of the A subunit is essential for maximal cytotoxicity of *Escherichia coli* O157:H7 Shiga-like toxin-1. *Microbiol* 1999; 145: 999-1004.
13. Garred O, Dubinina E, Holm PK, et al. Role of processing and intracellular transport for optimal toxicity of Shiga toxin and toxin mutants. *Exp Cell Res* 1995; 218: 39-49.
14. Philpott DJ, Ackerley CA, Kiliaan AJ, Karmali MA, Perdue MH, Sherman PM: Translocation of verotoxin-1 across T84 monolayers: mechanism of bacterial toxin penetration of epithelium. *Am J Physiol* 1997; 273: G1349-58.
15. Schüller S, Frankel G, Phillips AD: Interaction of Shiga toxin from *Escherichia coli* with human intestinal epithelial cell lines and explants; Stx2 induces epithelial damages in organ culture. *Cellular Microbiol* 2004; 6: 289-301.
16. Núñez P, Pistone Creydt V, Bibini M, Ibarra C. Acción citotóxica de la toxina Shiga tipo 2 (Stx2) dependiente e independiente de Gb3 en modelos celulares de epitelio intestinal humano. *Medicina (Buenos Aires)* 2005; 65: 86.
17. Acheson D, Moore R, De Breucker S, et al. Translocation of Shiga toxin across polarized intestinal cells in tissue culture. *Infect Immun* 1996; 64: 3294-300.
18. Imai Y, Fukui T, Kurohane K, et al. Restricted expression of Shiga toxin binding sites on mucosal epithelium of mouse distal colon. *Infect Immun* 2003; 71: 985-90.
19. Fiorito P, Burgos J, Fernández Miyakawa M, Rivas M, Chillemi G, Berkowski D, Zotta E, Silberstein C, Ibarra C: Effect of Shiga toxin 2 on water and ion transport in the human colon *in vitro*. *Dig Dis Sc* 2000; 45: 480-6.
20. Slutsker L, Ries AA, Greene KD, Wells JG, Hutwagner L, Griffin PM: *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in the United States: clinical and epidemiologic features. *Ann Intern Med* 1997; 126: 505-13.
21. Hurley BP, Thorpe CM, Acheson DW: Shiga toxin translocation across intestinal epithelial cells is enhanced by neutrophil transmigration. *Infect Immun* 2001; 69: 6148-55.
22. Pistone Creydt V, Martín F, Fernández Miyakawa M, Zotta E, Silberstein C, Ibarra C. Shiga toxin 2 B subunit inhibits net fluid absorption in human colon and elicits fluid accumulation in rat colon loops. *Brazilian J Med Biol Res* 2004; 37: 799-808.
23. Hughes AK, Stricklett PK, Kohan DE. Cytotoxic effect of Shiga toxin-1 on human proximal tubules cells. *Kidney Internat* 1998; 54: 426-37.
24. Taguchi T, Uchida H, Kiyokawa N, et al: Verotoxins induce apoptosis in human renal tubular epithelium derived. *Kidney Internat* 1998; 53: 1681-8.
25. 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.
26. Karpman D, Hakansson A, Perez MT, Isaksson C, Carlemalm E, Caprioli A, Svanborg C: Apoptosis of renal cortical cells in the hemolytic-uremic syndrome: *in vivo* and *in vitro* studies. *Infect Immun* 1998; 66: 636-44.
27. Kiyokawa N, Taguchi T, Mori T, et al. Induction of apoptosis in normal renal tubular epithelial cells by *Escherichia coli* Shiga toxin 1 and 2. *J Infect Dis* 1998; 178: 178-84.
28. Cherla RP, Sang-Yun L, Tesh VL: Shiga toxins and apoptosis. *FEMS Microbiol Lett* 2003; 228: 159-66.
29. Pistone Creydt V, Silberstein C, Zotta E, Ibarra C: Cytotoxic effect of Shiga toxin-2 holotoxin and its B subunit on human renal tubular epithelial cells. *Microbe Infec* 2006; 8: 410-19.

30. Karpman D, Adreasson A, Thysell H, Kaplan BS, Svanborg C: Cytokines in childhood hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Pediatr Nephrol* 1995; 9: 694-9.
31. 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; 14: 594-8.
32. Comité de Nefrología: Incidencia del Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) en la República Argentina. *Arch Arg Pediatría* 1995; 93: 407-11.
33. Richardson SE, Karmali MA, Becker LE, Smith CR: The histopathology of the hemolytic uremic syndrome associated with verocytotoxin-producing *E. coli*. *Hum Pathol* 1988; 19: 1102-8.
34. Fujii J, Kita T, Yoshida S, et al. Direct evidence of neuron impairment by oral infection with verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H- in mitomycin-treated mice. *Infect Immun* 1994; 62: 3447-53.
35. Fujii J, Kinoshita Y, Kita T, et al. Magnetic resonance imaging and histopathological study of brain lesions in rabbits given intravenous verotoxin 2. *Infect Immun* 1996; 64: 5053-60.
36. Fujii J, Kinoshita Y, Yamada Y, et al. Neurotoxicity of intrathecal Shiga toxin 2 and protection by intrathecal injection of anti-Shiga toxin 2 antiserum in rabbits. *Microb Pathog* 1998; 25: 139-46.
37. Núñez P, Pistone Creydt V, Bibini M, Ibarra C. Acción citotóxica de la toxina Shiga tipo 2 (Stx2) dependiente e independiente de Gb3 en modelos celulares de epitelio intestinal humano. *Medicina (Buenos Aires)* 2005; 65: 86.
38. Goldstein J, Pistone Creydt V, Loidl FC, Lopez-Costa JJ, Javier Boccoli J, Ibarra C: Intracerebroventricular administration of Shiga toxin type 2 altered neuroglial ultrastructures and changed the expression levels of nitric oxide synthase and glial fibrillary acidic protein. In VTEC2006 6th Internat Symposium on Shiga toxin (Verocytotoxin) producing *Escherichia coli* infections. Melbourne, Australia.
39. Trachtman H, Cnaan A, Christen E, et al. Effect of an oral Shiga toxin-binding agent on diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome in children: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003; 290: 1337-44.
40. Thorpe CM: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 1299-303.
41. Castro-Parodi M, Levi L, Ibarra C: Neutralización de la acción de la toxina Shiga por un péptido de Stx2B que no tiene efecto citotóxico *per se*. *Medicina (Buenos Aires)* 2005; 65: 108.
42. Okuda T, Tokuda N, Numata S-I, et al. Targeted disruption of Gb3/DC77 synthase gene resulted in the complete deletion of globo-series glycosphingolipids and loss of sensitivity to verotoxins. *J Biol Chem* 2006; 281: 10230-5.