

## Papel de los leucocitos polimorfonucleares, los monocitos y la fractalquina en la fisiopatología del síndrome urémico hemolítico típico

Dr. Ramón A. Exeni<sup>1</sup>, Dra. Gabriela Fernández<sup>2</sup> y Dra. Marina Palermo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Hospital de Niños de San Justo Depto. Nefrología.

<sup>2</sup>División Inmunología, Instituto de Investigaciones Hematológicas ILEX, Academia Nacional de Medicina.

### INTRODUCCION

El síndrome urémico hemolítico (SUH) es una entidad clínica caracterizada por insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y manifestaciones de compromiso multiorgánico.

Desde las descripciones de Wagner en 1954<sup>(1)</sup> y Gasser<sup>(2)</sup> en 1956 fue Gianantonio<sup>(3)</sup>, con su publicación de 64 casos, quien llama la atención sobre la verdadera importancia de esta enfermedad.

Hitos en el conocimiento del SUH fueron la descripción de Habib de la histopatología<sup>(4)</sup>, la descripción por Koronaluk<sup>(5)</sup> de la verotoxina (VT) y de Kaplan con las formas familiares<sup>(6)</sup>. Trompeter<sup>(7)</sup> divide a la enfermedad en D+ y D-, según haya sido precedida por un pródromo de diarrea o no, y Karmali<sup>(8)</sup>, con el hallazgo más trascendente en el conocimiento de la etiopatogenia de la enfermedad, describe la asociación de infecciones por *Escherichia coli* productora de VT y SUH.

Las investigaciones continuaron con la fisiopatología del SUH y así la coagulación intravascular diseminada, antiagregantes plaquetarios, prostaciclina, endotelina, vitamina E, factor de crecimiento fibroblástico y factor de von Willebrand, merecieron la atención de los diversos grupos que estudiaron la enfermedad.

La respuesta inflamatoria juega un rol preponderante en las infecciones por bacterias Gram negativas. A lo largo de los últimos 5 años hemos investigado el papel de los leucocitos polimorfonucleares (PMN), los monocitos (Mo) y una quimioquina transmembrana, la Fractalquina (FKN), en la fisiopatología del SUH. Los resultados obtenidos serán resumidos a continuación.

### ROL DE LOS LEUCOCITOS PMN

Los datos previos que alentaron el estudio del papel de los PMN en la patogenia del SUH incluyen:

- a) los pacientes con mayor recuento de PMN evolucionan a formas más graves<sup>(9)</sup>;
- b) los PMN de niños en periodo agudo de la enfermedad muestran mayor adhesividad a los endotelios<sup>(10)</sup>;
- c) niveles aumentados de elastasa en plasma, reflejo de la degranulación de los PMN<sup>(11)</sup>;
- d) la interleuquina-8 (IL-8), principal quimioquina activadora de los PMN, está elevada en los sueros de los niños con SUH<sup>(11)</sup>.

Los leucocitos PMN constituyen uno de los primeros mecanismos de defensa durante una infección y expresan una importante actividad microbicida y citotóxica, fundamentalmente a través de dos mecanismos efectores: el sistema NADPH oxidasa capaz de producir intermediarios reactivos de oxígeno (IROs) y la actividad de las enzimas proteolíticas presentes en los gránulos intracelulares. Como respuesta a un estímulo activador estos gránulos fusionan su membrana con la membrana plasmática y vuelcan su contenido al exterior en un proceso conocido como "degranulación"<sup>(12)</sup>.

Los gránulos pueden clasificarse en:

- a) vesículas secretorias,
- b) gránulos azurófilos o primarios,
- c) gránulos específicos o secundarios y
- c) gránulos de almacenamiento o terciarios.

Las vesículas secretorias son las primeras en ser degranuladas, contienen moléculas de adhesión CD11b/CD18, receptores para el Fc de IgG (CD16) y receptores para fragmentos del complemento (CR1)<sup>(13)</sup>.

Los gránulos secundarios y terciarios contienen enzimas degradadoras de la matriz extracelular lo que permite al PMN atravesar los tejidos en respuesta a estímulos quimioattractantes, el complejo de NADPH oxidasa, mediador de la producción de intermediarios reactivos del oxígeno (IRO), y el antígeno CD66b.

Los gránulos primarios contienen enzimas bacteriostá-

ticas y bactericidas como la mieloperoxidasa (MPO), la elastasa, la beta glucuronidasa, entre otras<sup>(13)</sup>.

El estudio de estos parámetros permitió la evaluación del estado de activación de los neutrófilos, ya que el nivel de expresión en la membrana plasmática de las moléculas presentes en cada tipo de gránulo, sugiere cuáles han sido movilizados.

Durante estos estudios encontramos que los PMN circulantes obtenidos de los pacientes con SUH presentan un estado de granulación y desactivación característico y diferente a los otros grupos clínicos controles<sup>(15,16)</sup>. Específicamente, los PMN de los pacientes con SUH durante el período agudo y previo a cualquier diálisis o transfusión, presentan disminución en la expresión de CD16 y CD11b, CD66 y menor producción de IRO, menor contenido de MPO y  $\beta$ glucuronidasa, y menor capacidad citotóxica y menor porcentaje de células apoptóticas<sup>(15)</sup>. Además estos PMN presentan menor contenido intracelular de estos marcadores, y una menor capacidad de respuesta frente a tres citoquinas estimuladoras características de los PMN: TNF (tumor necrosis factor), IL-8 (interleukin-8) y G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor)<sup>(16)</sup>. Estos resultados sugirieron que no se trata de un bloqueo en su activación, si no más bien un estado de "agotamiento" posterior a una fuerte activación.

De manera muy interesante, el nivel de degranulación se correlaciona con la gravedad del periodo agudo<sup>(17)</sup>, según la clasificación de Gianantonio basada en el periodo de oligoanuria del paciente<sup>(18)</sup>. Es decir, que los pacientes con mayor compromiso de la función renal muestran mayor gravedad de la afectación de los PMN: degranulación y desactivación más marcadas<sup>(17)</sup>.

## ROL DE LOS MONOCITOS

Los monocitos (Mo) también cumplen un rol trascendente en los mecanismos de inflamación e inmunidad. A diferencia de los PMN, no son células terminales y pueden sufrir procesos de maduración y diferenciación según los estímulos. Son células altamente secretoras y participan en la presentación de antígenos, iniciando y regulando la respuesta inmune específica o adaptativa. La expresión de los antígenos HLA-DR es central en el proceso de presentación de antígenos, habiéndose encontrado correlación con un variada cantidad de procesos infecciosos.

Las siguientes evidencias clínicas y experimentales, sugieren que los Mo podrían estar involucrados en el mecanismo patogénico del SUH:

- 1) en el modelo murino, la toxicidad de la VT está significativamente disminuida en ausencia de monocitos/macrófagos<sup>(19)</sup>;
- 2) los Mo son capaces de responder a la VT secretando TNF e IL-1<sup>(20)</sup>;
- 3) los pacientes con SUH presentan altos niveles de TNF sérico y varias quimioquinas<sup>(21)</sup>;
- 4) la presencia de TNF sensibiliza los endotelios a los efectos tóxicos de la VT<sup>(22)</sup>.

Teniendo esto en cuenta, estudiamos el fenotipo y la función de los monocitos en el período agudo del SUH. Se seleccionaron los siguientes marcadores asociados a sus funciones específicas:

- a) CD14, integrante del complejo que reconoce al lipopolisacárido (LPS),
- b) CD11b, integrina que media la adhesión a endotelios,
- c), CD64, receptor tipo I para Fc de IgG (Fc $\gamma$ RI), involucrado en la fagocitosis y citotoxicidad mediada por anticuerpos,
- d) HLA-DR, molécula asociada a la presentación antigénica.

La población de monocitos obtenida a partir de pacientes con SUH en el período agudo mostró expresión reducida de CD14, CD64 y CD11b, así como disminución de la citotoxicidad dependiente del Fc $\gamma$ RI<sup>(23)</sup>.

La disminución de la expresión de CD14 en la membrana del Mo ha sido asociada por distintos autores a la estimulación previa por el LPS de la bacteria. Aunque no se ha demostrado que en niños con SUH se produzca endotoxemia, hay evidencias de estimulación del sistema inmune por el LPS. La expresión reducida de CD64 y CD11b es un hallazgo novedoso y muy interesante. Además, el descenso en la expresión del CD14 y CD64 puede asociarse con la menor funcionalidad de estos Mo.

Por otra parte, los Mo mostraron expresión disminuida del antígeno HLA-DR, encontrándose una asociación positiva entre el nivel de disminución del HLA-DR y la severidad del cuadro clínico<sup>(23)</sup>.

Se deduce que los monocitos presentan alteraciones fenotípicas y funcionales en niños en el período agudo del SUH, coherentes con haber sufrido una marcada respuesta inflamatoria, y en forma coincidente con lo hallado al estudiar los PMN.

## PAPEL DE LA FRACTALKINA

Trabajos recientes han indicado que la quimioquina fractalquina (FKN) juega un papel importante en distintas patologías renales<sup>(24)</sup>. La FKN es una proteína transmembrana que está presente en células endoteliales y epiteliales, y funciona como molécula de adhesión, o su forma soluble como quimioattractante<sup>(25)</sup>. Su receptor (CX3CR1) se expresa en los Mo, las células Natural Killer (NK) y una subpoblación de linfocitos T citotóxicos<sup>(25)</sup>. Particularmente, se ha descrito la presencia de monocitos que expresan el receptor para FKN en cortes histológicos de pacientes con glomerulopatías.

Cuando analizamos los leucocitos periféricos de los pacientes con SUH, encontramos una marcada disminución de los Mo y células NK que expresan el receptor para FKN. Un hallazgo interesante fue la correlación negativa entre el número de leucocitos que expresan el CX3CR1 y la severidad del cuadro clínico del SUH<sup>(26)</sup>.

A través de técnicas de inmunohistoquímica, encontramos células expresando CX3CR1 en tejido renal de biopsias de niños con SUH<sup>(26)</sup>. Estos resultados en conjunto, sugieren que células con alto potencial citotóxico que expresan el receptor para fractalquina desaparecen de la circulación quedando retenidas en los endotelios. Este fenómeno podría potenciar la injuria endotelial provocada por la toxina Shiga (Stx).

Estos hallazgos nos permiten concluir que la respuesta inflamatoria, a través de sus distintos componentes celulares participa activamente en el daño endotelial inducido por la Stx y contribuiría decisivamente en la evolución del SUH.

## REFERENCIAS

1. Gasser C, Gautier E, Steck A, Siebmna R, Occsil R. Hemolytic Uremic Syndrome Anamien Schweiz Med Wochenschr 1955;85:905-907.
2. Gianantonio C, Vitaco M, Mendilaharzu F, Ruty A The Hemolytic Uremic Syndrome. J Pediatr 1964; 64:478-483.
3. Habib R, Cortecuisse V, Leclerc F, Mathieu H, Royer P. Etude anatomopathologique de 35 observations de syndrome hemolytique et uremic del infant, Arch Fr Pediatr 1969; 26-39.
4. Konowalchuk J, Speirs J. Vero response to a cytotoxin of E. coli. Infect Immun 1977; 18:775-779.
5. Kaplan B. Hemolytic Uremic syndrome with recurrent episodes- Clin Nephrol 1977; 8:495- 501.
6. Karmali M, Steele B, Petric M, Lim C. Sporadic cases of hemolytic uremic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin producing E coli in stools. Lancet 1983; 1: 619-623.

7. 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; 6:232-237,1991.
8. Forsyth, K D, Simpson AC, Fitzpatrick MM, Barratt TM, Levinsky RJ. Neutrophil mediated endothelial injury in haemolytic uraemic syndrome. Lancet 1989; 2: 411-414.
9. Fitzpatrick MM, Shah V, Trompeter RS, Dillon MJ y Barratt TM. Interleukin-8 and polymorphoneutrophil leucocyte activation in hemolytic uremic syndrome of childhood. Kidney Int 1992; 42: 951-6.
10. Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. Microbes Infect 2003; 14:1317-27.
11. Borregaard N, Sorensen OE, Theilgaard-Monch K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. Trends Immunol. 2007 8:340-5. Review.
12. 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; 95:227-234.
13. Fernández GC, Rubel C, Barrionuevo P, López L, Ramirez F, Díaz M, Isturiz MA, Palermo MS. Phenotype markers and function of peripheral neutrophils in children with hemolytic uremic syndrome. Pediatric Nephrol. 2002, 17:337-344.
14. Fernández GC, Gómez AS, Rubel CJ, Bentancor LV, Barrionuevo P, Alduncin M, Grimoldi I, Exeni R, Isturiz MA, Palermo MS. Impaired neutrophils in children with the typical form of Hemolytic Uremic Syndrome. Pedr Nephrol 2005; 120:1306-14.
15. Fernández GC, Gomez SA, Ramos MV, Bentancor LV, Fernandez-Brando RJ, LandoniVI, Lopez L, Ramirez F, Diaz M, Alduncin M, Grimoldi I, Exeni R, Isturiz MA, Palermo MS. The functional state of neutrophils correlates with the severity of renal dysfunction in children with Hemolytic Uremic Syndrome. Pediatric Research 2007; 61:123-128.
16. Gianantonio CA, Vitacco M, Mendilaharzu F, Gallo GE, Sojo ET. The hemolytic-uremic syndrome. Nephron 11:174-192, 1973.
17. Palermo M, Alves Rosa F, van Rooijen N, Isturiz, M.A. Depletion of liver and splenic macrophages reduces the lethality of Shiga toxin-2 in a mouse model. Clin. Exp. Immunol. 1999; 116:462-467.
18. van Setten PA, Monnens LA, Verstraten RG, van den Heuvel LP, van Hinsbergh VW. Effects of verocytotoxin-1 on nonadherent human monocytes: binding characteristics, protein synthesis, and induction of cytokine release. Blood 1996 88:174-83.
19. Proulx F, Toledano B, Phan V, Clermont MJ, Mariscalco MM, Seidman EG 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; 52:928-934.
20. Louise CB, Obrig TG. 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; 59:4173-9.
21. Fernandez GC, Ramos MV, Gomez SA, Dran GI, Exeni R, Alduncin M, Grimoldi I, Vallejo G, Elias-Costa C, Isturiz MA, Palermo MS. Differential expression of function-related antigens on blood monocytes in children with hemolytic uremic syndrome. J Leukoc Biol. 2005;78:853-861.

22. 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.
23. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature.* 1997;385:640-644.
24. Ramos MV, Fernández GC, Patey N, Schierloh P, Exeni R, Grimoldi I, Vallejo G, Elías-Costa C, Sasiain MC, Trachtman H, Combadière C, Proulx F, Palermo MS. Involvement of fractalkine pathway in the pathogenesis of childhood hemolytic uremic syndrome. *Blood* 109:2438-45, 2007.