



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA**

**Participación de los Receptores Tipo Toll en la
Respuesta Inflamatoria de Neutrófilos Humanos a
*Helicobacter pylori***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

**M. en Biol. Exp. MARÍA DE LOURDES
ÁLVAREZ ARELLANO**

TUTOR: DR. JAVIER TORRES LÓPEZ

MÉXICO, D.F.

JUNIO 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la dirección de la **Dra. Ma. del Carmen Maldonado Bernal** y el **Dr. Javier Torres López** y la asesoría de la **Dra. Ingeborg Becker Fauser** del Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la UNAM y de la **Dra. Gladis Fragoso González** del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Parte del trabajo fue realizado en el Departamento de Biología Celular del CINVESTAV del Instituto Politécnico Nacional bajo la asesoría del **Dr. José Eduardo Pérez Salazar**.

El presente trabajo fue realizado gracias a la beca con número de registro **176314** otorgada por el **CONACyT**.

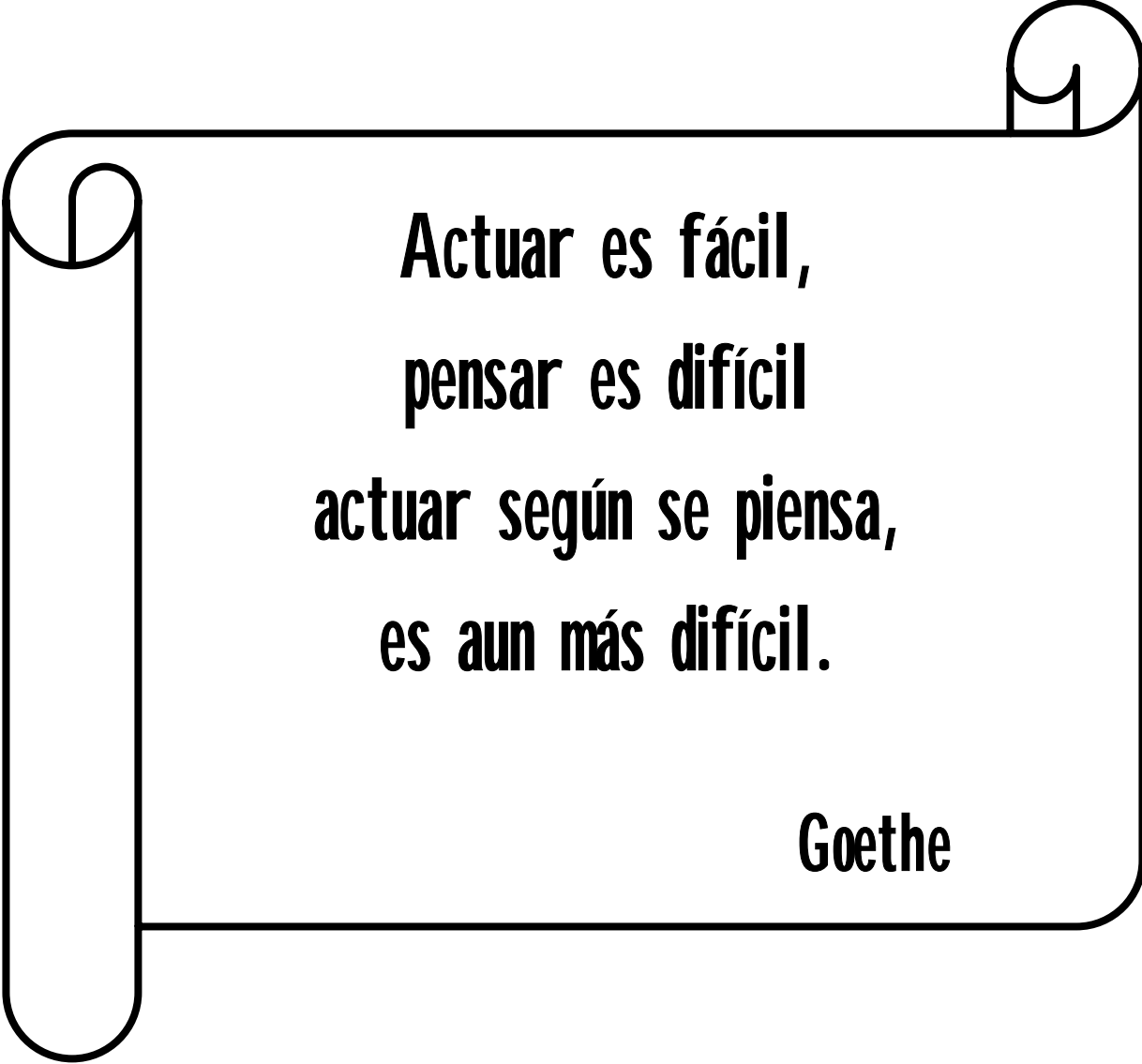
AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento y reconocimiento a la Dra. Ma. del Carmen Maldonado Bernal por compartir su experiencia y conocimiento conmigo, por dirigir mi trabajo y por el tiempo compartido dentro y fuera del laboratorio.

Al Dr. Javier Torres por darme la oportunidad de continuar con mi formación académica en su laboratorio y por sus comentarios para mi trabajo. A la Dra. Ingeborg Becker y a la Dra. Gladis Fragoso por su tiempo y consejos que me ayudaron a concluir satisfactoriamente. Al Dr. Eduardo Pérez Salazar por permitirme realizar parte de mi trabajo en su laboratorio, así como al Dr. Pedro Cortes por su contribución a este trabajo.

A mi esposo Pablo por amarme tal y como soy, por su ternura siempre reconfortante, por sus consejos y por existir en mi espacio y en mi tiempo. A mis Papas y mis hermanas Nadia y Adriana, mil gracias porque son la base de mi construcción, los quiero!!

Al Dr. Leopoldo Muñoz, a la Dra. Lupita Gordillo, a Carmen Bautista y al Dr. Gerardo González por su amistad, su apoyo, por creer siempre en mí y por hacer el día a día más divertido. A todos mis compañeros de la UIMEIP que con su trabajo hacen que todo funcione.



**Actuar es fácil,
pensar es difícil
actuar según se piensa,
es aun más difícil.**

Goethe

ÍNDICE

	Página
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN	5
3.1 Respuesta Inmune Innata.....	5
3.2 Receptores Tipo Toll.....	6
3.3 Vía de Señalización de los TLRs.....	7
3.4 Neutrófilos.....	11
3.5 <i>Helicobacter pylori</i>	13
3.6 Respuesta Inmune Innata en la Infección por <i>H. pylori</i>	15
3.7 Respuesta Inmune Adaptativa en la Infección por <i>H. pylori</i>	19
4. JUSTIFICACIÓN	20
5. OBJETIVO GENERAL	21
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
7. MATERIAL Y MÉTODOS	22
7.1 Obtención y Cultivo de Neutrófilos.....	22
7.2 Cultivo de <i>H. pylori</i> y Extracción de DNA.....	23
7.3 Cuantificación de Citocinas por ELISA.....	24
7.4 Expresión de TLR2, TLR4 y TLR9 en Neutrófilos.....	24

7.5 Bloqueo de TLRs.....	25
7.6 Expresión del mRNA de la IL-8 y del TLR9.....	26
7.7 Obtención de Proteínas Nucleares.....	28
7.8 Activación de NF-κB.....	29
7.9 Análisis Estadístico.....	30
8. RESULTADOS.....	31
8.1 <i>H. pylori</i> Induce la Producción de Citocinas en Neutrófilos.....	31
8.2 <i>H. pylori</i> Induce un Aumento en la Expresión del TLR2 y del TLR4 en Neutrófilos.....	33
8.3 <i>H. pylori</i> Induce una Regulación Negativa de la Proteína y del mRNA del TLR9 en Neutrófilos.....	36
8.4 Los TLRs Participan en la Activación Inducida por <i>H. pylori</i> en Neutrófilos.....	39
8.5 El DNA de <i>H. pylori</i> Induce la Expresión y Secreción de IL-8 y un Aumento en la Expresión del mRNA del TLR9 en Neutrófilos.....	43
8.6 Participación del TLR9 en la Activación de Neutrófilos Inducida por <i>H. pylori</i> y el DNA de <i>H. pylori</i>	48
8.7 Activación de NF-κB inducida por <i>H. pylori</i> y por el DNA de <i>H. pylori</i>	52
9. DISCUSIÓN.....	57
10. CONCLUSIONES.....	62
11. REFERENCIAS.....	63
12. ANEXO PUBLICACIÓN.....	75

1. RESUMEN

La inmunidad innata es la primera línea de defensa contra microorganismos patógenos. El reconocimiento de microorganismos se lleva a cabo por medio de los receptores de reconocimiento patrón (PRRs). En esta familia de receptores se encuentran los receptores tipo Toll (TLRs). La activación de los TLRs desencadena una cascada de señalización que culmina con la activación de la transcripción de moléculas involucradas en la respuesta inflamatoria.

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa que coloniza la mucosa gástrica humana y representa una de las infecciones bacterianas más comunes a nivel mundial. El proceso inflamatorio involucra una gran afluencia de neutrófilos a la lámina propia del epitelio gástrico. Los neutrófilos constituyen un componente esencial de la respuesta inflamatoria aguda y de la resolución de la infección. Sin embargo, hasta el momento no se conocen los receptores y mecanismos moleculares involucrados en la activación de los neutrófilos y es muy probable que los TLRs participen en la respuesta inflamatoria inducida por *H. pylori*. Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo fue determinar la participación de los TLRs en la respuesta inflamatoria de neutrófilos humanos a *H. pylori*.

Los resultados de este trabajo demuestran por primera vez, que *H. pylori* activa a neutrófilos humanos induciendo una respuesta proinflamatoria caracterizada por la producción de IL-8, TNF- α e IL-1 β , seguida de una respuesta antiinflamatoria dada por la producción de IL-10. Asimismo, *H. pylori* induce un aumento en la expresión del TLR2 y del TLR4 en la superficie de los neutrófilos.

Por primera vez se demostró que los neutrófilos humanos expresan en condiciones basales el TLR9 en su superficie y que *H. pylori* regula negativamente la expresión de este receptor.

Además, en este trabajo se demostró utilizando anticuerpos neutralizantes, que los TLRs -1, 2, 4, 5, 6 y 9 participan en la activación medida por la producción de IL-8

de neutrófilos humanos inducida por *H. pylori*. De forma similar, los TLRs 2 y 4 participan en la inducción de IL-10 en los neutrófilos estimulados con *H. pylori*.

Por otro lado, se observó que la activación de los neutrófilos inducida por *H. pylori*, conducía a la activación del factor de transcripción NF- κ B. Adicionalmente, se demostró que el DNA de *H. pylori* es capaz de activar a los neutrófilos a través del TLR9 induciendo la producción de IL-8 y la activación de NF- κ B.

Estudios complementarios son necesarios para determinar la participación del NF- κ B en la activación de neutrófilos mediada por el TLR9, así como la importancia de otros factores de transcripción como AP-1, además de la participación de otros receptores involucrados en la activación de los neutrófilos inducida por *H. pylori*. Aspectos que serán importantes en el entendimiento de los mecanismos de reconocimiento y activación de la respuesta inmune que permiten el mantenimiento o la erradicación de la infección y que pueden significar una herramienta en la búsqueda y mejoramiento de nuevas alternativas preventivas o de tratamiento.

En conclusión, en este trabajo se demostró que *H. pylori* activa a los neutrófilos induciendo una respuesta caracterizada por: la producción de citocinas inflamatorias, cambios en la expresión de los TLRs y la activación del factor de transcripción NF- κ B. Además se demostró que la producción de IL-8 e IL-10 es mediada por los TLRs. Y se demostró que los neutrófilos humanos expresan TLR9 en su superficie y que el DNA de *H. pylori* activa a NF- κ B e induce la producción de IL-8 a través del TLR9.

2. ABSTRACT

Innate immunity is the first line of defense against pathogens. Recognition of microorganisms is performed by pattern recognition receptors (PRRs) which family includes the Toll-like receptors (TLRs). Activation of TLRs triggers a signaling cascade that leads to the activation of transcription molecules involved in the inflammatory response.

Helicobacter pylori is a Gram-negative bacterium that colonizes human gastric mucosa and represents one of the most common bacterial infections worldwide. The inflammatory process involves a large influx of neutrophils to the lamina propria of the gastric epithelium. Neutrophils are an essential component of the acute inflammatory response and resolution of infection; however the molecular mechanisms involved in activation of neutrophils remain unknown. It is likely that TLRs participate in the inflammatory response induced by *H. pylori*. Therefore, the aim of this study was to determine the role of TLRs in the inflammatory response of human neutrophils challenged with *H. pylori*.

Our results show for the first time that *H. pylori* activates human neutrophils to induce a pro-inflammatory response characterized by production of IL-8, TNF- α and IL-1 β , followed by an anti-inflammatory response given by the production of IL-10. *H. pylori* also induces an increase in the expression of TLR2 and TLR4 on the surface of neutrophils. We also report for the first time that human neutrophils express in basal conditions the TLR9 on their surface and that *H. pylori* regulates negatively the expression of this receptor.

We also found that TLRs -1, 2, 4, 5, 6 and 9 might be involved in the production of IL-8 in human neutrophils after *H. pylori* challenge. Similarly, the TLR2 and TLR4 participate in the induction of IL-10 in neutrophils stimulated with *H. pylori*. Furthermore, we observed that *H. pylori* activation of neutrophils leads to activation of the transcription

factor NF- κ B. *H. pylori* DNA was capable of activating neutrophils via TLR9 and induced the production of IL-8 and activation of NF- κ B.

Additional studies are needed to determine the involvement of NF- κ B in the activation of neutrophils mediated by TLR9 and the importance of other transcription factors such as AP-1, as well as the involvement of other receptors in activation of neutrophils induced *H. pylori*. Understanding the mechanisms of recognition and activation of the immune response which allow persistence or eradication of the infection would provide knowledge to develop improved preventive or therapeutic measures.

In conclusion, we showed that *H. pylori* activated neutrophils induce a response characterized by the production of inflammatory cytokines, changes in expression of TLRs and activation the transcription factor NF- κ B. It also showed that production of IL-8 and IL-10 is mediated by TLRs. And it was shown that human neutrophils express TLR9 on the surface and that the DNA of *H. pylori* activates NF- κ B and induces production of IL-8 via TLR9.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Respuesta Inmune Innata

La inmunidad innata es la primera línea de defensa contra microorganismos patógenos. La respuesta inmune innata está conformada por barreras epiteliales, mucosas, citocinas, complemento y células. Las principales células efectoras son los neutrófilos, las células dendríticas, las células asesinas naturales (NK) y los monocitos/macrófagos (Blach-Olszewska y cols., 2005; Tosi y cols., 2005).

La estrategia de activación de la respuesta inmune innata se basa en la detección de productos o constituyentes que son invariantes en los microorganismos de una determinada clase y que son esenciales para su sobrevivencia. Estas moléculas son llamadas patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs), algunos ejemplos son: el lipopolisacárido (LPS), las lipoproteínas, el ácido lipoteicoico (LTA), los peptidoglicanos, los lipopéptidos, la flagelina y los ácidos nucleicos entre otros (Kaisho y cols., 2006).

El reconocimiento de los MAMPs se lleva a cabo por medio de un número limitado de receptores codificados en línea germinal, llamados receptores de reconocimiento patrón (PRRs). En esta familia de receptores se encuentran la lectina unidora de manosa (MBL), los receptores tipo Toll (TLRs), los receptores “scavenger”, los receptores NOD (dominios de oligomerización de unión a nucleótidos), la dectina-1, los NLRs (receptores tipo NOD) y las pentrexinas entre otros. Los PRRs pueden ser expresados en la superficie celular, en compartimentos intracelulares, citoplasmáticos, secretados a la circulación sanguínea o fluidos tisulares. Y son expresados principalmente en las células del sistema inmune: neutrófilos, células dendríticas, células NK, células epiteliales, células cebadas, monocitos/macrófago, linfocitos, etc. (Inhohara y cols., 1999; Peterson y cols., 2001; Strapagiel y cols., 2006).

Las principales funciones de los PRRs incluyen la opsonización, la fagocitosis, la activación del complemento, la cascada de coagulación, la activación de la cascada de

señalización proinflamatoria y la inducción de apoptosis (Aderem y cols., 2000; Kaisho y cols., 2006).

3.2 Receptores Tipo Toll

Los TLRs son receptores transmembranales tipo I, se caracterizan por tener un dominio extracelular con regiones repetitivas ricas en leucina (LRR) cada una de 24 a 29 aminoácidos y una o dos regiones ricas en cisteína. A través del dominio extracelular se lleva a cabo el reconocimiento de los ligandos (Matsushima y cols., 2007). Además, los TLRs poseen un dominio intracelular similar al que tiene la familia de receptores de la interleucina I (IL-1R), denominado Toll/IL-1R (TIR) por medio del cual se lleva a cabo la transducción de señales (Akira S, 2003).

La proteína Toll inicialmente fue identificada en *Drosophila melanogaster* como un receptor esencial para el establecimiento de la polaridad dorsoventral durante las primeras etapas del desarrollo embrionario de la mosca (Lemaitre y cols., 1996). Estudios posteriores demostraron que es de gran importancia en el sistema inmune del insecto adulto, principalmente en infecciones por bacterias y hongos. Actualmente, se sabe que los TLRs se encuentran conservados evolutivamente desde organismos invertebrados como los gusanos *Caenorhabditis elegans* hasta los mamíferos (Pujol y cols., 2001). A la fecha se han identificado 13 miembros de esta familia en mamíferos y 11 en humanos (TLR1 a TLR11) y se han descrito algunos de sus ligandos (**Tabla 1**).

El TLR4 fue el primer TLR descrito (Poltorak y cols., 1998), sin embargo las primeras observaciones acerca de la función de los TLRs en la respuesta inmune innata es el estudio en el que se demostró que el TLR2 activa al factor nuclear kappa B (NF- κ B) en respuesta al LPS, quedando de manifiesto la importancia de los TLRs en la inmunidad innata de los mamíferos (Kirschning y cols., 1998). En la actualidad se sabe

que los TLRs no solo son de gran importancia en la respuesta inmune innata, sino también en la respuesta inmune adaptativa (Liu y Zhao, 2007; Parker y cols., 2007; Imanishi y cols., 2007).

3.3 Vía de Señalización de los TLRs

El primer componente conocido de la vía de señalización de los TLRs fue una proteína adaptadora denominada MyD88 (Hultmark y cols., 1994), la cual se encuentra asociada a la señalización de todos los TLRs, excepto al TLR3 (Alexopoulou y cols., 2001). La proteína MyD88 está conformada por un dominio de muerte en el extremo amino y un dominio TIR en el extremo carboxilo. El dominio TIR de MyD88 interacciona con el dominio TIR de los TLRs, mientras que el dominio de muerte interacciona con la familia de cinasas asociadas al receptor de IL-1 (IRAK4). La formación del complejo MyD88-IRAK4, da como resultado la fosforilación y activación de IRAK1, lo cual permite el reclutamiento del factor 6 asociado al receptor de TNF- α (TRAF6). Posteriormente, el TRAF6 activa al complejo TAK1/Tab1/2/3, el cual a su vez fosforila y activa al complejo IKK, para finalmente liberar al NF- κ B de su inhibidor I κ B. El NF- κ B es translocado al núcleo donde activa la expresión de genes que codifican para moléculas que participan en la respuesta inmune, tales como citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión y moléculas de coestimulación (McDonald y cols., 1997; Ryan y cols., 2004; Aravalli y cols., 2005) (**Fig. 1**).

La señalización independiente de MyD88 la llevan a cabo el TLR3 y el TLR4. En el caso del TLR3, TRIF (activador de interferón asociado al receptor Toll) es la molécula adaptadora que se une directamente al receptor. Posteriormente, es reclutada la proteína RIP1 (proteína1 de interacción con el receptor), que se une al dominio RHIM (motivo de interacción homotípico con RIP) de TRIF. Este complejo se une al complejo TAK1/Tab1/2 para continuar con la cascada de activación del NF- κ B, sin embargo, el

mecanismo exacto aún no se ha demostrado (Meylan y cols., 2004). Por otro lado, TRIF también puede interactuar directamente con TRAF6 y activar a NF- κ B (Hacker y cols., 2006) (**Fig. 1**).

Además, el TLR3 es capaz de activar al factor de transcripción IRF3 (factor 3 de regulación del interferón) a través de TRIF, el cual se une a TBK1 e IKK ϵ . Finalmente, son reclutadas Nap1 y TRAF3 para inducir la fosforilación de IRF3 y su translocación al núcleo para activar la transcripción de genes como IFN- α , IFN- β y CXCR10 (Hoebe y col., 2006).

Por otro lado, el TLR4 para activar la señalización independiente de MyD88, requiere de una proteína adaptadora denominada TRAM (molécula adaptadora relacionada a TRIF). Esta proteína funciona como intermediario entre el receptor y TRIF, para continuar con la cascada de señalización. La función de TRAM está restringida a la señalización de TLR4, ya que ésta no participa en la señalización mediada por el TLR3 (Fitzgerald y cols., 2003; Yamamoto y cols., 2003).

Tabla 1. TLRs y algunos de sus ligandos.

Receptor	Ligando	Origen del ligando
TLR1	Triacil lipopéptidos Factores solubles	Bacterias y micobacterias <i>Neisseria meningitidis</i>
TLR2	Lipoproteínas Peptidoglicano Ac. Lipoteicoico Lipoarabinomanana Zimosan Proteínas de choque térmico Porinas Glicolípidos Fosfolipomanana Glicofosfatidilinositol Lipofosfopeptidoglicana	Diversos microorganismos Bacterias Gram positivas Bacterias Gram positivas <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Hongos Endógeno <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Treponema maltophilum</i> <i>Candida albicans</i> <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>E. histolytica</i>
TLR3	RNA doble cadena	Virus
TLR4	Lipopolisacárido Taxol Ac. hialurónico Fibrinógeno Proteínas de choque térmico Manana Proteína F Elastasa Lipofosfopeptidoglicana	Bacterias Gram negativas Plantas Endógeno Endógeno Endógeno <i>Candida albicans</i> Virus Endógeno <i>E. histolytica</i>
TLR5	Flagelina	Bacterias
TLR6	Diacil lipopéptidos	<i>Micoplasma</i>
TLR7	Imidazoquinolinas Loxoribin RNA cadena sencilla	Sintético Sintético Virus
TLR8	Imidazoquinolinas RNA cadena sencilla	Sintético Virus
TLR9	CpGs no metilados	Bacterias y virus
TLR10	nd	nd
TLR11	nd Profilina Cromatina-IgG	Bacterias uropatógenicas <i>Toxoplasma gondii</i> Endógeno

nd, No determinado. Modificado de Akira y Takeda, 2004.

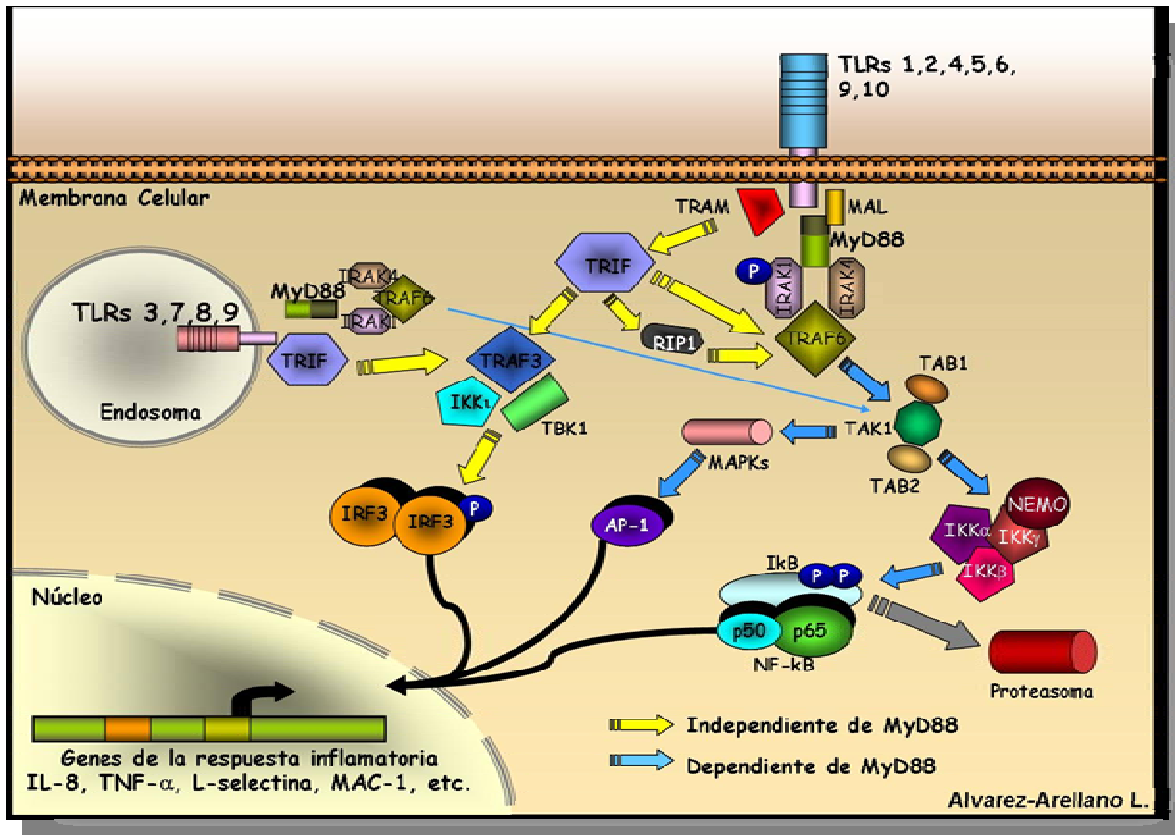


Figura 1. Esquema de las principales vías de señalización inducidas a través de la activación de los TLRs. La activación de los diferentes TLRs desencadena cascadas de señalización que llevan a la activación de factores de transcripción que activan la transcripción de genes involucrados en la respuesta inmune innata. Las moléculas que participan en esta cascada de señalización son reclutadas dependiendo del TLR y el ligando involucrado.

3.4 Neutrófilos

Los neutrófilos son los leucocitos más abundantes, constituyen el 90% de las células fagocíticas. Son producidos en la médula ósea a partir de una célula madre mieloide en un proceso denominado granulopoesis. Durante su maduración en la médula ósea pasan por seis etapas morfológicas: mieloblasto, promieloblasto, mielocito, metamielocito, neutrófilo no segmentado y neutrófilo segmentado, estadio en el cual se encuentra en circulación. Los neutrófilos se caracterizan por su alto contenido de gránulos, la mayoría denominados gránulos específicos o secundarios, que contienen enzimas de degradación como lisozimas, colagenasas, defensinas y elastasas. El resto de los gránulos se denominan gránulos azurófilos o primarios y se trata en realidad de lisosomas (Faurischou y cols., 2005).

Los neutrófilos son células de vida media corta (8 a 12 horas) en circulación y en caso de no ser activados mueren por apoptosis. Sin embargo, su potencial inmunológico se incrementa, cuando su esperanza de vida aumenta en el sitio de infección por activación con componentes bacterianos o por acción del complemento y citocinas proinflamatorias (Colotta y cols., 1992; Lord y cols., 2001; Prince y cols., 2004; Power y cols., 2004; François y cols., 2005).

Los neutrófilos son las primeras células en migrar al sitio de infección por lo tanto, median las fases iniciales de la respuesta inflamatoria. En el sitio de infección ejercen diversas funciones que incluyen la fagocitosis, la liberación de enzimas proteolíticas y péptidos antimicrobianos, la producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (estallido respiratorio), así como la producción de citocinas inflamatorias (Xing y col., 2004; Yang y cols., 2004; Petkovic y cols., 2005; Mitra y cols., 2006; Wong y cols., 2007; Cloutier y cols., 2007). En conjunto, todas estas acciones contribuyen a la eliminación de los microorganismos patógenos, ya que se ha observado que pacientes con neutropenia desarrollan infecciones más severas y con mayor frecuencia (Wisplinghoff y cols., 2003).

Los neutrófilos reconocen a los microorganismos patógenos por medio de diversos PRRs, tales como: NODs, TLRs, etc. Los neutrófilos expresan el mRNA y/o la proteína

de la mayoría de los TLRs (**Tabla 2**). Sin embargo, la expresión de TLR3 es controversial, ya que existen publicaciones que indican que los neutrófilos no expresan TLR3 (Zarembler y col., 2002; Hayashi y cols., 2003; Nagase y cols., 2003; Wong y cols., 2007). Los procesos de reconocimiento por los TLRs y la posterior activación de los neutrófilos, son fundamentales en la respuesta inmune innata ya que controlan y en la mayoría de los casos eliminan a los microorganismos patógenos.

Tabla 2. Expresión de TLRs en neutrófilos.

TLR	Expresión	Ligando	Referencia
1	m, p	Pam3CSK4	Hayashi, 2003
2	m, p	PG, LTA, lipoproteínas	François, 2005
3	p	nd	Wong, 2007
4	m, p	LPS	Bellocchio, 2004
5	m, p	Flagelina	Hayashi, 2003
6	m, p	MALP-2	Hayashi, 2003
7	m, p	R-848, loxoribina	François, 2005; Hayashi, 2003
8	m, p	R-848	François, 2005
9	m, p	CpG	Bellocchio 2004; François, 2005
10	m	nd	Bellocchio, 2004
11	nd	nd	

m, mRNA; p, Proteína; nd, No determinado; PG, Peptidoglicana.

3.5 *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa, flagelada y de forma helicoidal que coloniza la mucosa gástrica humana. La infección por *H. pylori* representa una de las infecciones bacterianas más comunes a nivel mundial. En países desarrollados la seroprevalencia es de aproximadamente el 40% y en países en vías de desarrollo del 80-90% (Perez-Perez y cols., 2004). En México, la seroprevalencia promedio es del 66% en un estudio realizado en la población entre 1 y 90 años de edad (Torres y cols., 1998) (**Fig. 2**).

Desde su aislamiento en 1983, *H. pylori* se ha asociado a la etiología de diversas enfermedades gastroduodenales (Warren y Marshall, 1983). En 1994, con base en la evidencia epidemiológica acumulada, la infección por esta bacteria fue clasificada como carcinógeno humano tipo I por la International Agency for Research on Cancer (IARC) (Fontham y cols., 1995). Los estudios longitudinales sugieren que la infección persistente puede conducir a la formación de úlcera péptica, linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa gástrica (MALT) y carcinoma gástrico (Fontham y cols., 1995; van Doorn y cols., 1998). El desarrollo de las diferentes patologías asociadas a la infección por *H. pylori* dependerá tanto de factores ambientales, como de factores de la bacteria y del hospedero.

Diversos factores contribuyen a la patogénesis de *H. pylori* y uno de los más estudiados es la proteína CagA (por sus siglas del inglés cytotoxin associated gene A), codificada por el gen *cagA*. El gen *cagA* forma parte de una región cromosomal de 38-40 Kb, que contiene 31 genes asociados a virulencia, denominada isla de patogenicidad *cag* (PAI *cag*) (Backert y col., 2008). Aproximadamente 12 de estos genes conforman el sistema de secreción tipo IV, un sistema de exportación especializado para la transferencia de proteínas y DNA a células blanco como células epiteliales, neutrófilos y macrófagos (Odenbreit y cols., 2001; Philpott y cols., 2002; Backert y col., 2008).

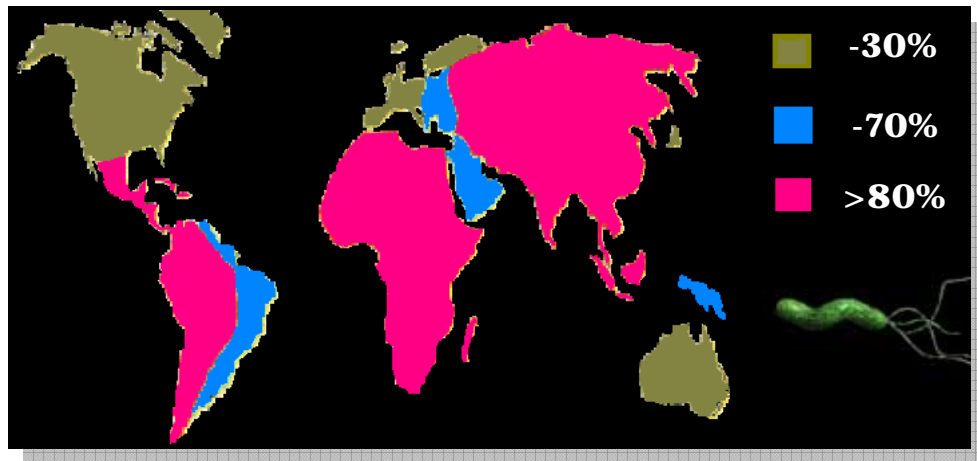


Figura 2. Seroprevalencia de la infección por *H. pylori* a nivel mundial. *H. pylori* infecta a aproximadamente el 50% de la población a nivel mundial, siendo en los países en vías de desarrollo en donde existe un mayor porcentaje de seroprevalencia de la infección.

H. pylori también produce una toxina vacuolizante denominada VacA (por sus siglas del inglés vacuolating cytotoxina A), que es responsable de un efecto vacuolizante *in vitro* en células eucariontes. El gen *vacA* está presente en todas las cepas, pero no se expresa en todas. Aproximadamente, el 50% de las cepas de *H. pylori* expresan esta actividad. El gen *vacA*, presenta variación alélica en la región de la secuencia señal (s) y en la región media (m), dando lugar a un mosaico genético. Los alelos s1 y m1 de *vacA* son los que más se han asociado a úlcera péptica y a atrofia de la mucosa gástrica, así como a mayor actividad inflamatoria. Las cepas de *H. pylori* que son PAI cag + y presentan el alelo *vacA* s1m1 son más virulentas y las que no tienen PAI cag y tienen alelos s2m2 se les conoce como cepas de poca virulencia (Atherton y cols., 1997).

Otro factor de gran importancia asociado a virulencia es la adherencia de *H. pylori* a las células del epitelio gástrico, debido a que juega un papel fundamental en el inicio de la colonización y en la persistencia de la infección. La adherencia está dada por una gran familia de 32 proteínas de membrana externa, las cuales incluyen a las adhesinas. Una de las adhesinas mejor caracterizadas es BabA (por sus siglas del inglés blood adhesion binding antigen), codificada por el gen *babA2*. BabA se une al

determinante antigénico del grupo sanguíneo Lewis b en las células del hospedero y generalmente está presente en las cepas que son PAI cag +, confiriéndoles una mayor capacidad de colonización y persistencia. La presencia de BabA se ha asociado con una mayor incidencia de úlcera duodenal y adenocarcinoma gástrico (Torres y cols., 2000; Wen y cols., 2008).

La ureasa es otro factor de virulencia, de gran importancia en el proceso de colonización de *H. pylori*. La ureasa es una enzima formada por dos subunidades (UreA y UreB) que hidroliza la urea en amonio y dióxido de carbono. Los productos de esta reacción le permiten a *H. pylori* mantener un microambiente neutro alrededor de la bacteria y así poder sobrevivir en el medio ácido del estómago (Montecucco y col., 2001).

3.6 Respuesta Inmune Innata en la Infección por *H. pylori*

La infección por *H. pylori* se caracteriza por la infiltración de células plasmáticas, neutrófilos, monocitos y linfocitos a la lámina propia del epitelio gástrico y una respuesta humoral tanto en la fase aguda como crónica de la infección (Elios y cols., 1999) (**Fig. 3**). En la gastritis aguda y crónica causada por la infección por *H. pylori*, los neutrófilos son los iniciadores del proceso inflamatorio. El reclutamiento y la activación de los neutrófilos puede ser inducido directamente por proteínas secretadas por *H. pylori*. Por ejemplo, la proteína activadora de neutrófilos (HP-NAP) y la ureasa (Mai y cols., 1992; D'Elios y cols., 2007). Sin embargo, el reclutamiento y activación también pueden ser indirectos a través de la cascada de citocinas y quimiocinas como IL-1 β , TNF- α , IL-8, GRO- α , RANTES, etc. producidas por las células epiteliales como respuesta a la infección con *H. pylori* (Noach y cols., 1994; Yamaoka y cols., 1998; Sieveking y cols., 2004). Asimismo, la activación de los neutrófilos es probable que pueda ser por contacto directo con la bacteria ya que recientemente en diferentes estudios se ha observado la presencia de neutrófilos en biopsias gástricas, no sólo en la lamina propia del epitelio, sino también entre las células epiteliales y en contacto directo con la bacteria (Schmausser y cols., 2004a; Schmausser y cols., 2004b; Muñoz y cols., 2007) (**Fig. 3**).

Se ha demostrado que los neutrófilos y una fuerte respuesta inflamatoria son esenciales en la resolución de la infección por *H. pylori* (Ismail y cols., 2003). Sin embargo, estudios recientes han mostrado que existe una correlación entre el grado de daño de la mucosa y la infiltración de neutrófilos, debido principalmente a que los neutrófilos activados tienen propiedades que pueden contribuir al daño tisular (Crabtree y cols., 1996, Allen y cols., 2005). La inflamación crónica puede incrementar el riesgo de desarrollar cáncer gástrico debido a diferentes factores como, el incremento del estrés oxidativo que causa daño al DNA, alteraciones en la regulación del ciclo celular, inhibición de la apoptosis e inhibición de la adherencia celular (Mc Namara y col., 2008).

A la fecha, los mecanismos moleculares del reclutamiento y activación de los neutrófilos no han sido totalmente esclarecidos. Además, poco se conoce sobre los receptores involucrados en la activación de la respuesta inmune en la infección con *H. pylori*. Recientemente se reportó que a través del sistema de secreción tipo IV se libera peptidoglicana al interior de las células epiteliales y que esta peptidoglicana es reconocida por NOD1 induciendo la activación de NF- κ B y la producción de IL-8 (Viala y cols., 2004). Asimismo, existen diferentes trabajos que han estudiado la participación de los TLRs en la respuesta inmune a *H. pylori* (Perez-Perez y cols., 1995; Kawahara y cols., 2001; Smith y cols., 2003; Lee y cols., 2003; Mandell y cols., 2004; Stoicov y cols., 2004). Algunos de los cuales son contradictorios. Mediante microarreglos de cDNA de biopsias de pacientes infectados con *H. pylori*, se demostró que hay una sobreexpresión de TLR1, TLR4, TLR5 y TLR6, lo cual sugiere la posible participación de estos receptores en la respuesta inmune de la mucosa a este microorganismo (Wen y cols., 2004).

Por otro lado, en biopsias de pacientes con gastritis e infectados con *H. pylori*, se determinó mediante inmunohistoquímica la expresión de los TLRs 4, 5 y 9. Encontrando que el TLR4 se expresa apical y basolateralmente en las células del epitelio gástrico, mientras que la expresión de los TLRs 5 y 9 no es estática y se pueden expresar tanto apical como basolateralmente en las células epiteliales en respuesta a la infección, probablemente en respuesta a la flagelina y el DNA de *H. pylori*. Asimismo, encontraron

que el TLR9 además de expresarse en la superficie del epitelio, se expresa en el citoplasma de las células epiteliales. La expresión diferencial y dinámica de los TLRs en el epitelio gástrico sugiere la participación de estos receptores en la respuesta inmune innata a *H. pylori* (Schmauber y cols., 2004).

El lipopolisacárido (LPS) es el principal mediador de inflamación durante las infecciones con la mayoría de las bacterias Gram negativas. Sin embargo, el LPS de *H. pylori* tiene una actividad biológica muy baja comparada con el LPS de otras bacterias como el LPS de *E. coli*, al menos medido por su capacidad de activar macrófagos (Perez-Perez y cols., 1995). El efecto del LPS de *H. pylori* en células epiteliales gástricas, aún no es claro. Kawahara y cols. demostraron que el LPS de *H. pylori* producido por cepas que contienen la PAI cag activan el TLR4 en células epiteliales gástricas pero no las mutantes de la PAI cag (Kawahara y cols., 2001). Existen otros estudios que demuestran que el TLR2 media los efectos proinflamatorios de *H. pylori* en células epiteliales y muestran que el LPS de *H. pylori* es agonista del TLR2 (Smith y cols., 2003; Mandell y cols., 2004). Se ha sugerido que los bajos niveles de patogenicidad del LPS de *H. pylori* se deben a su incapacidad para activar el TLR4 (Poltorak y cols., 1998; Stoicov y cols., 2004). Las contradicciones en estos estudios pueden deberse a diferencias en las cepas empleadas, a diferencias en las cargas bacterianas o a la presencia de trazas de contaminantes en el LPS utilizado tales como, peptidoglicana o lipopéptidos (Stoicov y cols., 2004).

Recientemente, se demostró que el TLR2 y el TLR4 son esenciales para la producción de IL-6, IL-1 β , IL-12 e IL-10 en macrófagos derivados de medula ósea de ratones estimulados con *H. pylori* y que el TLR9 no participa en dicho proceso (Obonyo y cols., 2007). Por otro lado, se han reportado hallazgos similares para las flagelinas de *H. pylori*. Las dos subunidades que conforman los flagelos de *H. pylori* (FlaA y FlaB) mostraron tener un potencial reducido para activar al TLR5 comparado con las flagelinas de otras bacterias Gram negativas, tales como FliC de *S. typhimurium* (Lee y cols., 2003).

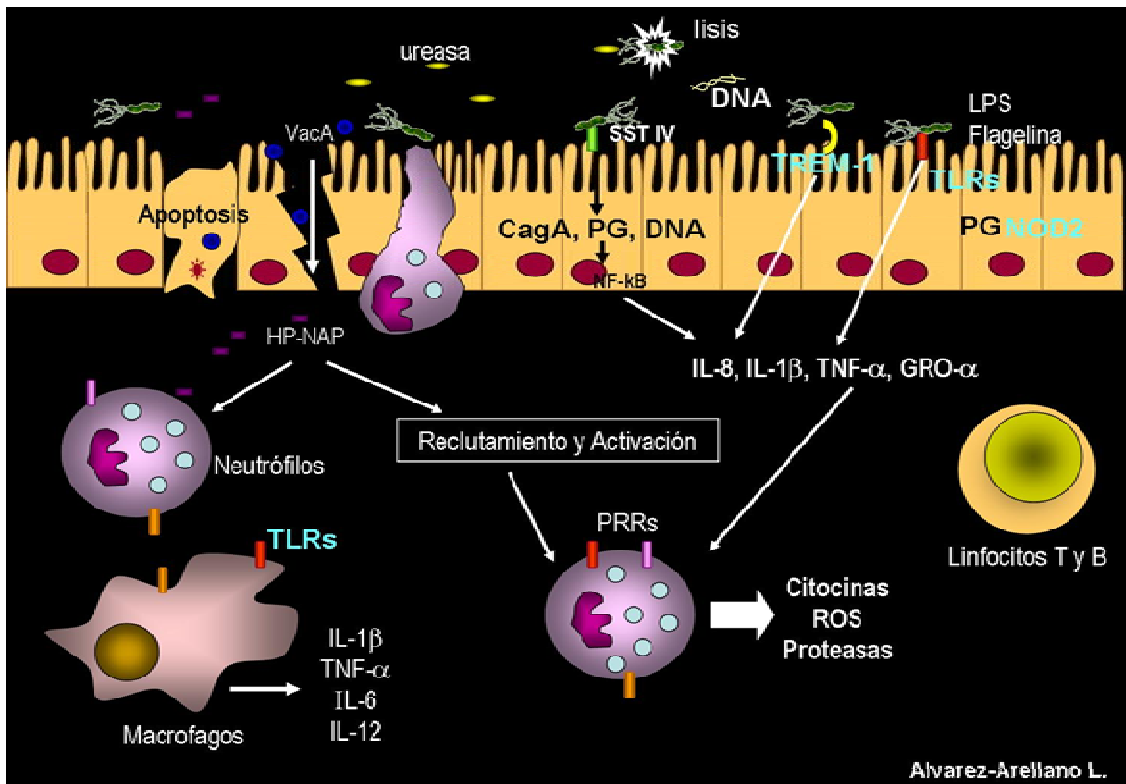


Figura 3. Respuesta inmunológica en la infección por *H. pylori*. En la infección por *H. pylori*, las células del sistema inmune son reclutadas a la lamina propia del epitelio gástrico por productos secretados por la bacteria y citocinas y quimiocinas producidas por las células epiteliales e inducidas a su vez por *H. pylori*. En el sitio de infección las células son activadas a través de diferentes receptores y ejercen su función efectora produciendo citocinas, quimiocinas, enzimas proteolíticas y especies reactivas del oxígeno (ROS). Sin embargo, la respuesta inflamatoria crónica puede generar daño al epitelio gástrico lo que trae como consecuencia el desarrollo de patologías más severas como úlcera duodenal y cáncer gástrico.

3.7 Respuesta Inmune Adaptativa en la Infección por *H. pylori*

La infección por *H. pylori* se induce una respuesta adaptativa caracterizada por una respuesta humoral y celular que generalmente no logra erradicar a la bacteria la cual persiste a lo largo de la vida del individuo. *H. pylori* induce la producción local y sistémica de anticuerpos IgA e IgG, pero el efecto de estos anticuerpos es controversial. Se ha reportado que IgA monoclonal y específica contra *H. pylori* protege contra la infección en ratones cuando es administrada por la vía intragástrica. En contraste, existen reportes que demuestran que la producción de IgA e IgG no es esencial para la

protección y por el contrario, contribuyen al daño generado a la mucosa gástrica debido a que existe una reacción cruzada con antígenos del hospedero presentes en las células epiteliales y parietales como lo son las ATPasas y al antígeno Lewis (Robinson y cols., 2007).

Por otro lado, la respuesta celular es predominantemente del tipo Th1 que se caracteriza por la producción de IFN- γ e IL-12 que se asocian a la expresión de citocinas proinflamatorias. Sin embargo, no es lo suficientemente efectiva debido a que *H. pylori* posee diversos mecanismos a través de los cuales inhibe la acción de los linfocitos T, disminuyendo la capacidad de respuesta del sistema inmunológico (D'Elios y cols., 2005).

Considerando todas las evidencias anteriores y con el propósito de determinar la importancia de los neutrófilos y los TLRs en la respuesta inmune innata que se presenta en la infección por *H. pylori*, nos planteamos como objetivo del presente estudio determinar si los TLRs participan en el reconocimiento de *H. pylori* induciendo una respuesta inflamatoria que pueda ayudar a controlar la infección.

4. JUSTIFICACIÓN

La infección por *H. pylori* se adquiere generalmente durante la niñez y su persistencia puede conducir al desarrollo de enfermedades gastroduodenales tan severas como la úlcera péptica o el carcinoma gástrico. El proceso inflamatorio inicial involucra una gran afluencia de neutrófilos a la lámina propia del epitelio gástrico. Los neutrófilos son componentes esenciales de la respuesta inflamatoria y en la resolución de la infección microbiana. Sin embargo, no se conoce la participación de los TLRs expresados en los neutrófilos en esta respuesta inflamatoria a *H. pylori*.

Es probable que los TLRs participen en el reconocimiento y la activación de los neutrófilos induciendo una respuesta inflamatoria aguda que ayude a controlar la infección por *H. pylori*, o bien de no ser suficientemente efectiva permita el establecimiento y el desarrollo de las diferentes patologías asociadas a la infección. Por lo tanto, el entendimiento de los mecanismos de reconocimiento y activación de la respuesta inmune a *H. pylori*, pueden significar una herramienta de gran importancia en la búsqueda y mejoramiento de nuevas alternativas preventivas o terapéuticas.

5. OJETIVO GENERAL

Determinar si *H. pylori* activa a los neutrófilos humanos a través de los Receptores Tipo Toll (TLRs), induciendo la producción de citocinas inflamatorias.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la producción de IL-8, IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-10 inducida por *H. pylori* en neutrófilos.
- Determinar la expresión de los TLRs (2, 4, y 9) en la superficie celular de neutrófilos estimulados con *H. pylori*.
- Determinar la participación de los TLRs (1, 2, 4, 5, 6 y 9) en la activación de neutrófilos estimulados con *H. pylori*.
- Determinar la producción de IL-8, IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-10 inducida por el DNA de *H. pylori* en neutrófilos.
- Determinar la expresión del TLR9 en neutrófilos estimulados con el DNA de *H. pylori* (mRNA y proteína).
- Determinar la participación del DNA de *H. pylori* en la activación del TLR9.
- Determinar la vía de señalización involucrada en la activación del TLR9 en los neutrófilos inducida por *H. pylori* o su DNA.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Obtención y Cultivo de Neutrófilos

Los neutrófilos fueron obtenidos mediante un gradiente de densidad a partir de sangre periférica de donadores sanos y seronegativos para *H. pylori*. Brevemente, sangre periférica mantenida con anticoagulante, se diluyó en una proporción 1:2 con solución salina (NaCl al 0.9%) y se depositó en tubos cónicos de 50 mL libres de pirógenos, en una proporción 1:3 con Lymphoprep (Nycomed, Oslo, Norway). Se centrifugó a 2,000 rpm durante 30 min a temperatura ambiente. Como resultado de esta centrifugación se obtuvieron dos fases: en la parte superior del tubo se encuentra la banda correspondiente a los mononucleares y en la parte inferior se encuentra la banda correspondiente a los neutrófilos y eritrocitos. Se eliminó el sobrenadante hasta la fase correspondiente a los neutrófilos. Para eliminar los eritrocitos se agregó 40 mL de solución de lisis (NH_4Cl 155 mM, NaHCO_3 10 mM y EDTA 0.1mM) y los tubos se centrifugaron a 1,500 rpm por 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante fue eliminado y se realizaron dos lavados adicionales con solución salina seguidos de dos centrifugaciones a 1,500 rpm durante 10 min a temperatura ambiente.

Se analizó la viabilidad mediante la tinción con azul tripán, la cual siempre fue mayor al 95%. Se determinó la pureza de los neutrófilos mediante citometría de flujo, la cual siempre fue mayor al 97% empleando un anticuerpo anti-CD16b conjugado con ficoeritrina (PE) como marcador específico de neutrófilos (clona eB72-1665, eBioscience). La detección de linfocitos B y T contaminantes se realizó mediante la tinción con anti-CD19 y anti-CD3, respectivamente (BD Pharmingen, Diego, CA).

Posteriormente, los neutrófilos se sembraron en placas de cultivo a una densidad de 5×10^6 células/mL de medio de cultivo. El medio de cultivo que se utilizó fue RPMI 1640 (Gibco BRL, Life Technologies) complementado con 5,000 U/mL de penicilina-estreptomicina y 2% de suero fetal bovino (SFB, Gibco BRL, Life Technologies). Las células se incubaron a 37°C en un ambiente de 5% CO_2 y 5% de humedad.

7.2 Cultivo de *H. pylori* y Extracción de DNA

Se utilizó *H. pylori* de la cepa tipo 26695 (ATCC 700392) y se cultivó en medio gelosa sangre al 5%. Las bacterias se incubaron a 37 °C con 9% de CO₂ y 5% de humedad. La bacteria se resuspendió en solución salina al 0.9% y la densidad óptica de la suspensión se ajustó a una absorbancia final de 0.75 correspondiente a 1×10^9 bacterias/mL a una longitud de onda de 550 nm.

El DNA total de la bacteria se obtuvo de cultivos de 24 horas utilizando el kit comercial QIAamp DNA (Qiagen, Valencia, CA) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Para eliminar una eventual contaminación con LPS se incubó con polimixina B en una concentración de 5 µg/mg de DNA durante 1 hora a temperatura ambiente. La concentración del DNA se determinó por espectrofotometría a 260 y 280 nm y la integridad fue visualizada en un gel de agarosa al 0.7%.

7.3 Cuantificación de Citocinas por ELISA

Los neutrófilos (10×10^6 células) se estimularon con *H. pylori* (10×10^8 UFC) o DNA de *H. pylori* ($1 \mu\text{g/mL}$) durante 0.5, 1, 3, 6 y 24 horas. Al término de cada tiempo se recolectaron los sobrenadantes y se determinó la producción de IL-8, IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-10 mediante ELISA empleando un kit comercial y siguiendo las instrucciones del fabricante (OptEIA, BD Pharmingen, San Diego, CA). Los sobrenadantes fueron diluidos apropiadamente para su cuantificación cuando así fue requerido.

7.4 Expresión de TLR2, TLR4 y TLR9 en Neutrófilos

Se determinó el cambio en la expresión de los TLR2, TLR4 y TLR9 en la superficie de los neutrófilos por medio de citometría de flujo. Los neutrófilos se estimularon con *H. pylori* (10×10^8 UFC) o con DNA de *H. pylori* ($1 \mu\text{g/mL}$) durante 0.5, 1.0, 3.0, 6.0 y 24 horas. Los anticuerpos empleados fueron los siguientes, anti-TLR2-PE (clona TLR2.1, Santa Cruz Biotechnology, CA), anti-TLR4-PE (clona HTA125, Santa Cruz Biotechnology, CA), anti-TLR9-PE (clona eB72-1665, eBioscience), los controles de isotipo IgG2a-PE (BD Pharmingen, San Diego, CA) e IgG1-PE (BD Pharmingen, San Diego, CA). Brevemente, se colocaron 5×10^5 células por pozo en placas de 96 pozos de fondo redondo y se resuspendieron en 100 μL de solución de bloqueo (NaN_3 al 0.1%, SFB al 2.0%, suero de conejo al 2.0% y EDTA 5 mM) y se incubaron durante 1 hora a 4°C. A continuación se realizaron dos lavados centrifugando las muestras a 2,500 rpm durante 3 min a 4°C con solución de tinción (NaN_3 al 0.1%, SFB al 2.0% y EDTA 5 mM). Posteriormente, las muestras se incubaron con el anticuerpo correspondiente en solución de tinción durante 30 minutos a 4°C en obscuridad. Las muestras se fijaron con paraformaldehído al 4.0% en PBS. Finalmente, se leyeron 20,000 eventos en cada condición en un citómetro de flujo FACscan (BD, Bioscience).

7.5 Bloqueo de TLRs

La participación de los TLRs en la activación de los neutrófilos se determinó mediante ensayos de bloqueo utilizando anticuerpos anti-TLR1 (clona N-20, Santa Cruz Biotechnology), anti-TLR2 (clona TLR2.1, Imgenex Biocarta, San Diego, CA), anti-TLR4 (clona HTA125.1, Imgenex Biocarta, San Diego, CA), anti-TLR5 (clona N-15, Santa Cruz Biotechnology, CA), anti-TLR6 (clona N-18, Santa Cruz Biotechnology, CA) y anti-TLR9 (clona D-18, Santa Cruz Biotechnology, CA). Los neutrófilos se incubaron previamente durante 1 hora con anti-IgG humana (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Aventis Behering GmbH, Marburgo, Germany), a fin de saturar los receptores Fc y evitar uniones inespecíficas. Posteriormente, se incubaron con el anti-TLR correspondiente durante una hora a 37°C y se estimularon con *H. pylori* o con DNA de *H. pylori* durante 24 horas. Posteriormente, se determinó la producción de IL-8 o IL-10 según correspondía en los sobrenadantes, mediante ELISA. Como controles positivos se utilizó LTA de *S. faecalis* (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para el TLR2, LPS de *E. coli* (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para el TLR4 y flagelina de *S. muenchen* (100 ng/mL) para TLR5.

Además, para corroborar la participación del TLR9 se empleó un oligonucleótido inhibidor (ODN inhibidor, TTAGGG; Invivo Gen, San Diego, CA) y cloroquina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), un inhibidor de la acidificación de endosomas, y por tanto de la señalización del TLR9. Neutrófilos (5×10^6) fueron preincubados con el ODN inhibidor (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o con cloroquina (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 1 hora. Posteriormente, se estimularon con *H. pylori* o con DNA de *H. pylori* durante 24 horas, al término del tiempo se determinó en el sobrenadante la producción de IL-8 mediante ELISA.

7.6 Expresión del mRNA de la IL-8 y del TLR9

El cambio en la expresión del mRNA de IL-8 y de TLR9 inducido por *H. pylori* o por el DNA se determinó por RT-PCR en tiempo real. Se aisló el RNA total de las células mediante la técnica de TRIzol® (Invitrogen). La concentración y pureza del RNA se determinó por espectrofotometría a 260 y 280 nm y la integridad fue visualizada en un gel de agarosa al 1%.

La reacción de transcripción reversa (RT) se realizó utilizando el sistema Super Script™ (GIBCO BRL, Rockville, MD) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se determinó la expresión del receptor utilizando el sistema TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA). Este método utiliza un fluorocromo unido a un oligonucleótido específico (sonda), que al ser removido por la TaqMan® DNA polimerasa emite una señal luminosa que es registrada en un espectrofluorómetro y analizada en una computadora anexa al termociclador (GeneAmp 5700, Applied Biosystem). La captura y análisis de los datos se llevó a cabo por el programa, incorporado al termociclador, Sequence Detection System (Applied Biosystems). Las condiciones de la PCR fueron: 1 ciclo a 95°C/10 min, 45 ciclos de 95°C/15 s y 60°C/1 min. Para normalizar la cantidad de cDNA se utilizó el gen de GAPDH.

Las secuencias de las sondas y de los oligonucleótidos que se utilizaron fueron las que se describen a continuación:

Sentido

IL-8	5' – AGACAGCAGAGCACACAAGC – 3'
TLR9	5' – TACCTTGCCTGCCTTCCTAC – 3'
GAPDH	5' – GAAGGTGAAGGTCGGAGTC – 3'

Antisentido

IL-8	5' – ATGGTTCCTTCCGGTGTT – 3'
TLR9	5' – GCCAGTTGCAGTTCACCAG – 3'
GAPDH	5' – GAAGATGGTGATGGGATTTC – 3'

Sonda

IL-8	5' – GCCAGGAA – 3'
TLR9	5' – CTCCAGCC – 3'
GAPDH	5' – CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC – 3'

7.7 Obtención de Proteínas Nucleares

Las proteínas nucleares fueron obtenidos a partir de 5×10^6 neutrófilos estimulados durante 0.5, 1.0, 2.0 y 3.0 horas con *H. pylori* o su DNA. Brevemente, al término de cada tiempo las células fueron centrifugadas a 1,500 rpm durante 10 min y el sobrenadante retirado. Las células fueron resuspendidas en 1 mL de regulador hipotónico (Tris HCl 10 mM pH 7.0, NaCl 10 mM, MgCl₂ 6.0 mM, NaF 3.2 mM, Na₃VO₄ 1.0 mM, DTT 1.0 mM, PMSF 1.0 mM) e incubadas durante 10 min en hielo. Posteriormente, se les agregó 10 μ l de IGEPAL al 10% y se colocaron en agitación suave durante 5 min. Al término de la incubación, se centrifugaron a 2,600 rpm durante 5 min a 4° C, se desechó el sobrenadante y se agregó 500 μ l de regulador hipotónico para lavar el sedimento, se repitió el lavado una vez más. Finalmente, el sedimento se resuspendió en 25 μ l de regulador hipertónico (Hepes 20 mM pH 7.9, NaCl 420 mM, glicerol al 20%, MgCl₂ 5 mM, EDTA 0.2 mM, Na₃VO₄ 1.0 mM, NaF 10 mM, PMSF 0.2 mM, DTT 1.0 mM) y las muestras se colocaron en agitación vigorosa durante 15 min. Por último, las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm durante 15 min a 4°C y el sobrenadante fue recuperado siendo este la fracción correspondiente a las proteínas nucleares.

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford, utilizando el reactivo Protein Assay (Bio-Rad) y siguiendo las instrucciones del fabricante y las proteínas nucleares se guardaron a -20°C hasta su uso.

7.8 Activación de NF- κ B

Para determinar la activación de NF- κ B se realizaron ensayos de inhibición empleando PDTC (ditiocarbamato de pirrolidina, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y además se empleó DHMEQ (dehidroximetilepoxiquinomicina, proporcionado por la Dra. Sara Huerta Yopez del Hospital Infantil de México "Federico Gómez"). Neutrófilos (5×10^6) fueron preincubados durante 1 hora con PDTC (300 μ M) o con DHMEQ (5 μ g/mL) y posteriormente estimulados durante 24 horas con *H. pylori* (5×10^8) o con DNA de *H. pylori* (1 μ g/mL). Finalmente, se determinó la producción de IL-8 en el sobrenadante mediante ELISA.

Además, se determinó la activación de NF- κ B por ensayo de retardo de movilidad electroforética (EMSA). Brevemente, se utilizaron proteínas nucleares de neutrófilos (10×10^6) sin estímulo, estimulados con *H. pylori* (10×10^8) o con DNA de *H. pylori* (1.0 μ g/mL). Brevemente, oligonucleótidos (5'-AGCTAAGGGACTTTCCGCTGGGGACTTTCCAGG-3') que contiene un sitio de unión a NF- κ B marcados con 32 P fueron incubados con 5 μ g de proteínas nucleares y con el regulador de carga (espermidina 4 mM, MgCl₂ 4 mM, HEPES 240 mM pH 7.8, EDTA 1 mM pH 8.0, KCl 120 mM, glicerol al 50% y Poli-DI:DC 0.5 μ g) durante 15 min a 4°C. Posteriormente, las muestras fueron separadas en un gel de poliacrilamida al 6% y los resultados fueron visualizados con autorradiografía. Se determinó la densidad óptica de las bandas obtenidas con el programa Labworks Analysis Software (UVP Inc., Upland, CA).

7.9 Análisis Estadístico

Se determinaron los valores promedio de las citocinas analizadas y la expresión de los TLRs de por lo menos tres diferentes experimentos y su desviación estándar (DE) ó el error estándar de la media (EEM). Las diferencias de los valores de las muestras con tratamiento y los valores de las muestras sin tratamiento se determinaron por la prueba de t-student y Mann-Whitney cuando así fue requerido. Para el análisis se utilizó el programa estadístico SIGMA STAT (Jandel Scientific Software, CA).

8. RESULTADOS

8.1 *H. pylori* Induce la Producción de Citocinas en Neutrófilos

Para determinar si *H. pylori* es capaz de activar a neutrófilos humanos se determinó la producción de IL-8, IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-10 en el sobrenadante de neutrófilos estimulados con *H. pylori* durante diferentes tiempos. La producción de IL-8 se incrementó considerablemente en los neutrófilos estimulados con *H. pylori* con respecto a los neutrófilos sin estimular. Este incremento fue estadísticamente significativo a partir de las 3 horas y hasta las 24 horas de cultivo (**Fig. 4A**). Por otro lado, la producción de IL-1 β se incrementó a partir de las 3 horas de cultivo, siendo estadísticamente significativa la diferencia a partir de las 6 horas y hasta las 24 horas (**Fig. 4B**). La producción de TNF- α se incrementó a partir de las 3 horas en los neutrófilos estimulados con la bacteria y este incremento fue estadísticamente significativo a partir de las 6 horas de estímulo (**Fig. 4C**). En la producción de IL-10 en los neutrófilos estimulados con *H. pylori* no se observó una diferencia estadísticamente significativa con respecto a las células sin estímulo. Sin embargo, se observa una tendencia de incremento en la producción de IL-10 desde las 6 horas en las células estimuladas con *H. pylori* (**Fig. 4D**). Por otro lado, no se detectó producción de IL-6 en los neutrófilos estimulados con *H. pylori* ni en los neutrófilos sin estimular.

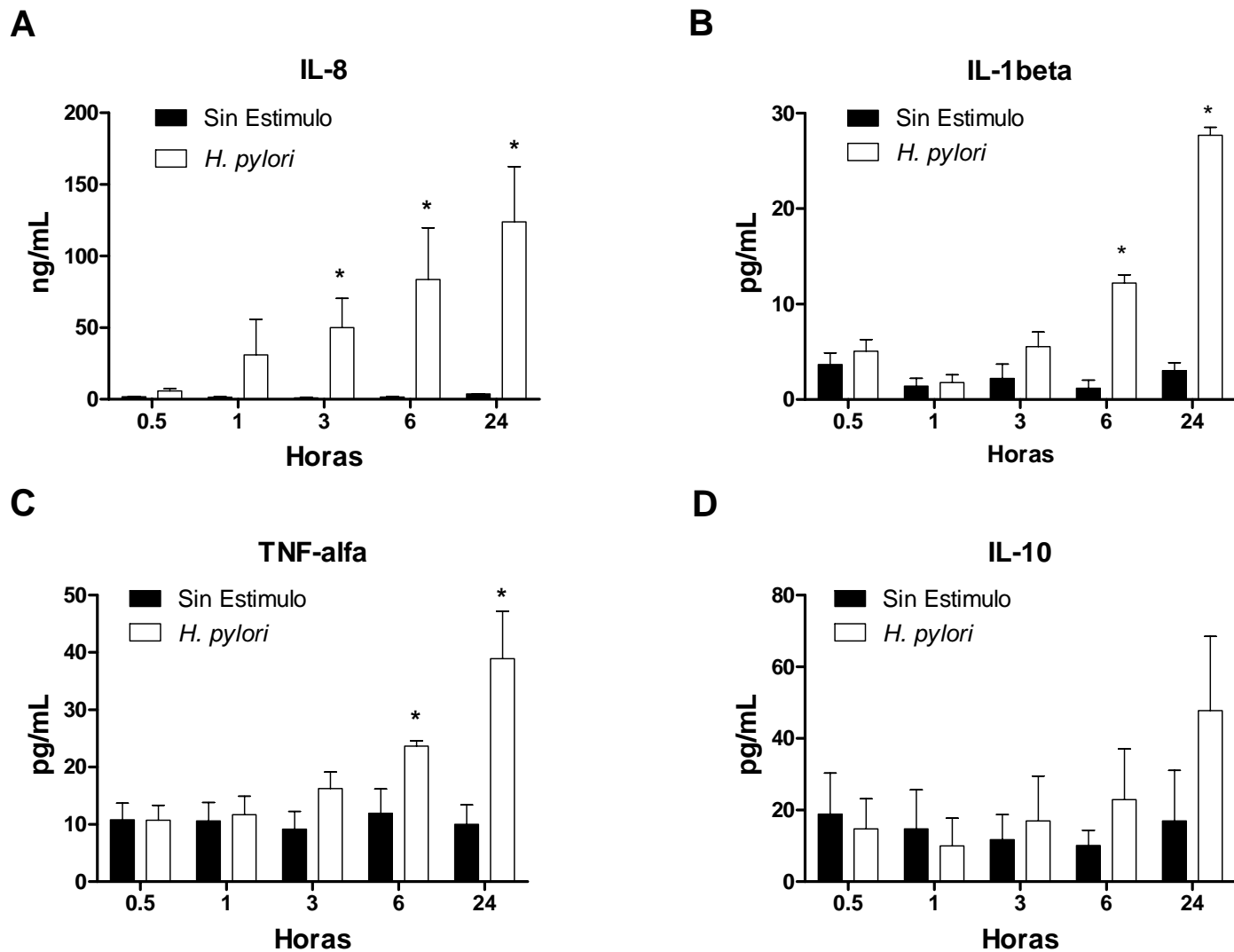


Figura 4. Aumento de la producción de citocinas en neutrófilos humanos inducida por *H. pylori*. Se determinó la producción de IL-8 (A), IL-1 β (B), TNF- α (C) e IL-10 (D) en el sobrenadante de neutrófilos estimulados con *H. pylori* mediante ELISA. Las barras representan el promedio de tres experimentos independientes + EEM. * $p < 0.05$.

8.2 *H. pylori* Induce un Aumento en la Expresión del TLR2 y del TLR4 en Neutrófilos

Inicialmente fue necesario determinar la expresión basal de los TLRs en los neutrófilos y posteriormente determinar si *H. pylori* modifica dicha expresión. Para tal efecto se determinó la expresión del TLR2 y el TLR4 en la superficie de los neutrófilos estimulados con *H. pylori* durante 1.0, 3.0, 6.0 y 24 horas por medio de citometría de flujo. Los resultados obtenidos muestran que tanto el TLR2 como el TLR4 se expresan constitutivamente en los neutrófilos sin estímulo, aunque en baja concentración. Mientras que la expresión de ambos receptores en los neutrófilos estimulados con *H. pylori* aumenta en todos los tiempos de estímulo, siendo estadísticamente significativo a las 6.0 y 24 horas para TLR2 y a la 1.0 y 6.0 horas para el TLR4 (**Fig. 5 y 6**). Estos resultados nos indican que probablemente el TLR2 y el TLR4 estén involucrados en la activación de neutrófilos por *H. pylori*.

Es importante señalar que la expresión tanto del TLR2 como del TLR4 en los neutrófilos sin estímulo se incrementa el porcentaje de células positivas conforme aumenta el tiempo de cultivo. Consideramos que el aumento pudo deberse a la acción de componentes presentes en el suero con el que se complementó el medio de cultivo (**Fig. 5 y 6**).

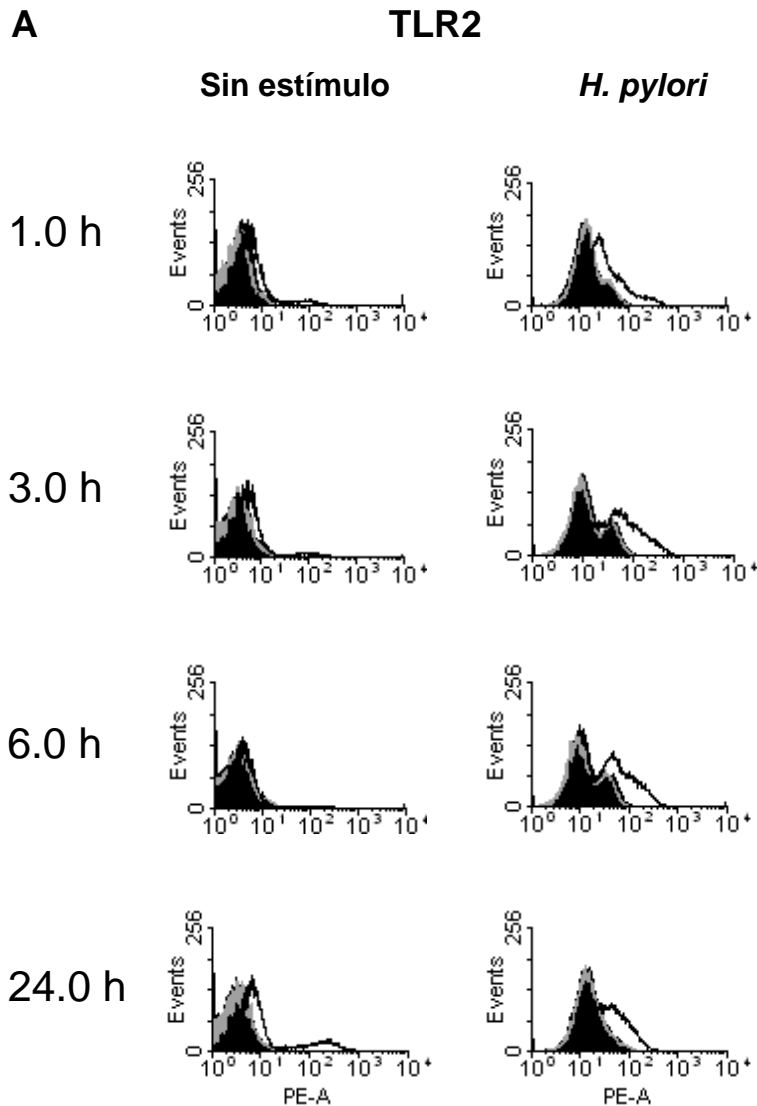
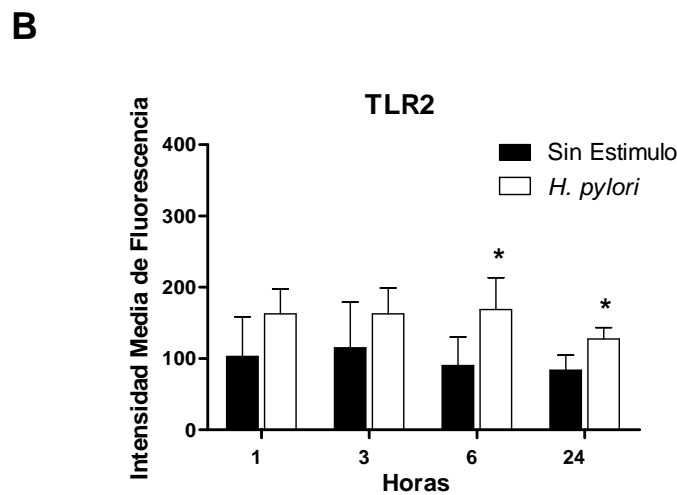


Figura 5. *H. pylori* aumenta la expresión del TLR2 en los neutrófilos. (A) Se determinó la expresión del TLR2 en la superficie de neutrófilos, sin estímulo (histograma gris) y estimulados con *H. pylori* (histograma blanco), por citometría de flujo. Control de isotipo, histograma negro. **(B)** Representación gráfica de la expresión del TLR2. Las barras representan el promedio de la intensidad media de fluorescencia de tres experimentos independientes + EEM. * $p < 0.05$.



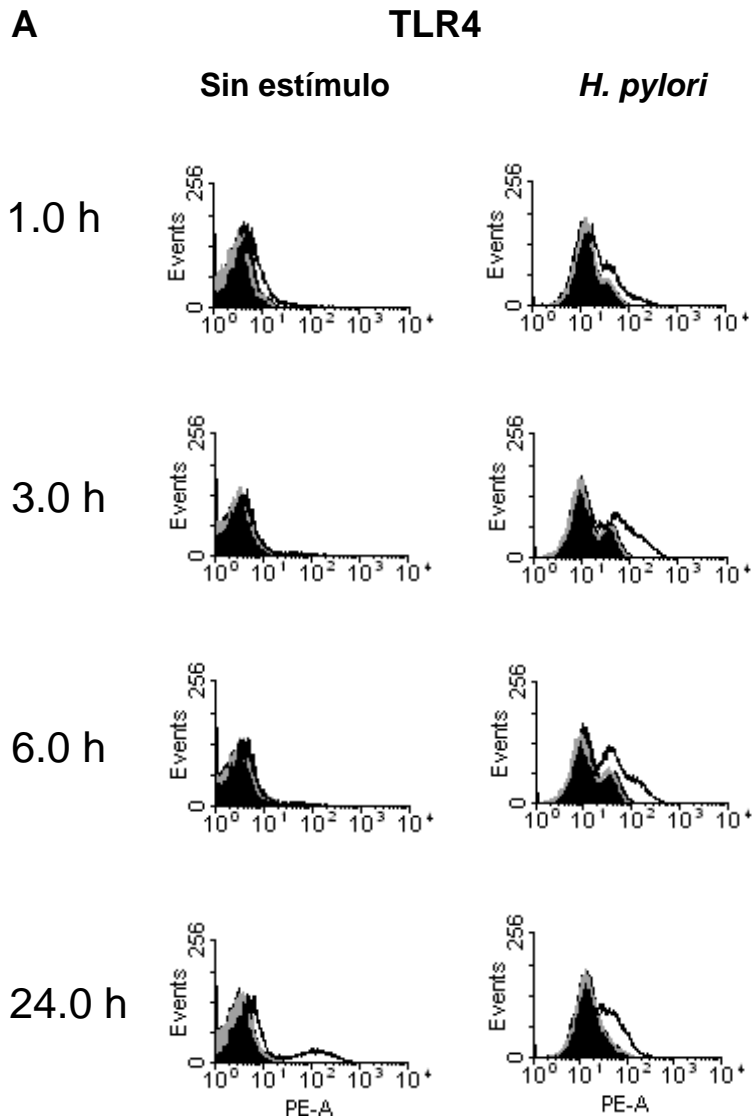
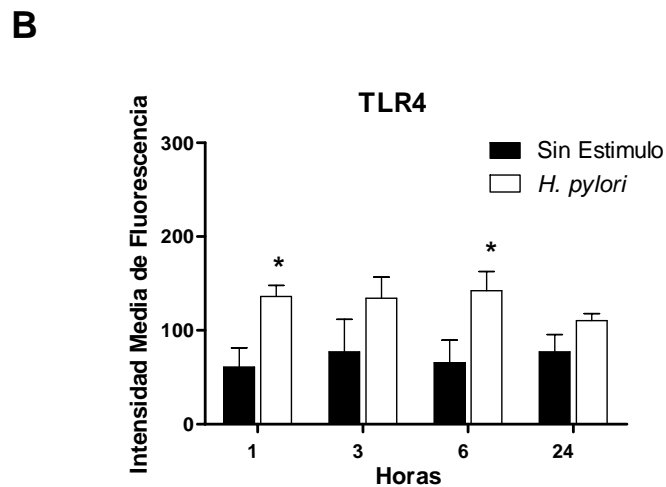


Figura 6. *H. pylori* aumenta la expresión del TLR4 en los neutrófilos. (A) Se determinó la expresión del TLR4 en la superficie de neutrófilos sin estímulo (histograma gris) y estimulados con *H. pylori* (histograma blanco), por citometría de flujo. Control de isotipo, histograma negro.

(B) Representación gráfica de la expresión del TLR4. Las barras representan el promedio de la intensidad media de fluorescencia de tres experimentos independientes + EEM. * $p < 0.05$.



8.3 *H. pylori* Induce una Regulación Negativa de la Proteína y del mRNA del TLR9 en Neutrófilos

Posteriormente determinamos si *H. pylori* también modificaba la expresión del TLR9. Nuestros resultados demuestran que el TLR9 se expresa constitutivamente en la superficie de los neutrófilos sin estímulo y disminuye considerablemente en las células estimuladas con *H. pylori* desde tiempos muy cortos de estimulación. Esta disminución es estadísticamente significativa a las 6 y 24 horas de estímulo (**Fig. 7**).

Para determinar si la disminución en la expresión del TLR9 se debía a la internalización del receptor o a la regulación negativa de la transcripción del mRNA, se determinó la expresión del mRNA del TLR9 por medio de PCR en tiempo real en los neutrófilos en condiciones sin estímulo y estimulados con *H. pylori* durante 0.5, 1.0, 3.0 y 6.0 horas. Para normalizar se utilizó el gen de *gapdh*. Se observó una disminución en la expresión del TLR9 en los neutrófilos estimulados con *H. pylori* con respecto a las células sin estimular a tiempos cortos y aumento en la expresión a las 3.0 horas de estímulo (**Fig. 8**).

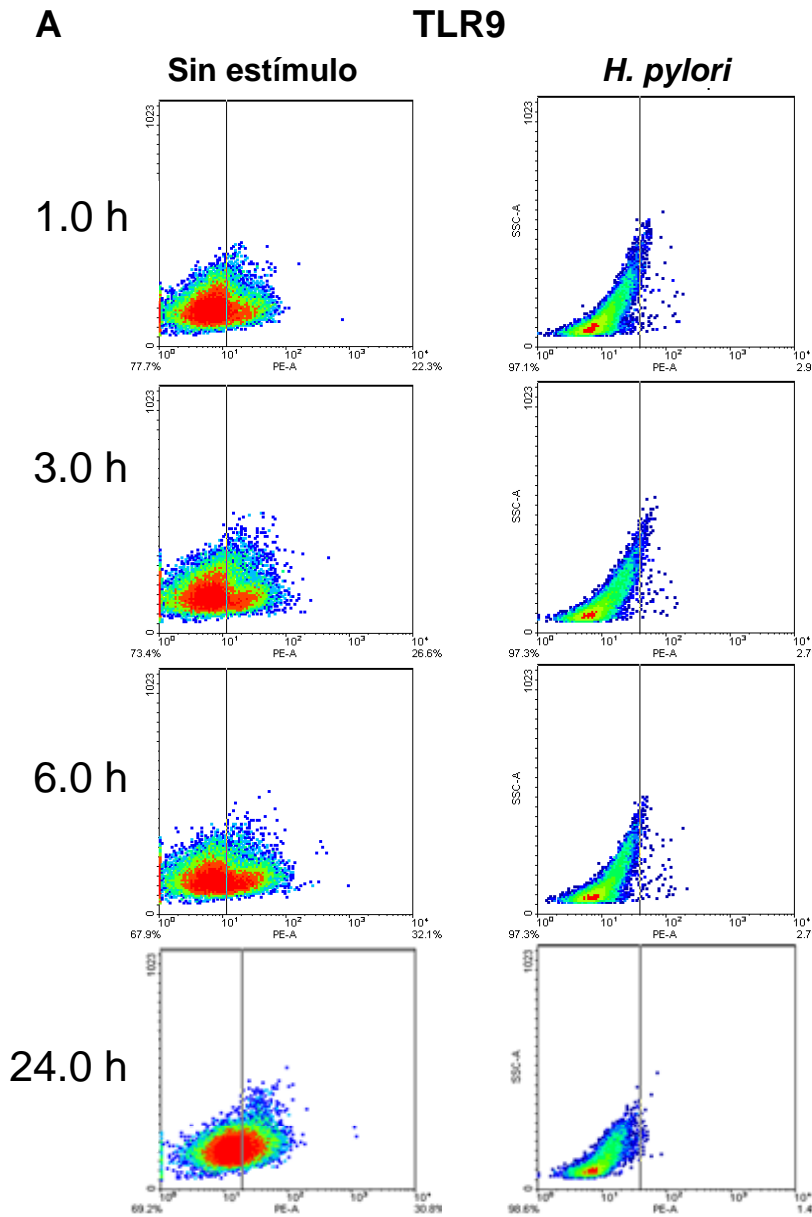
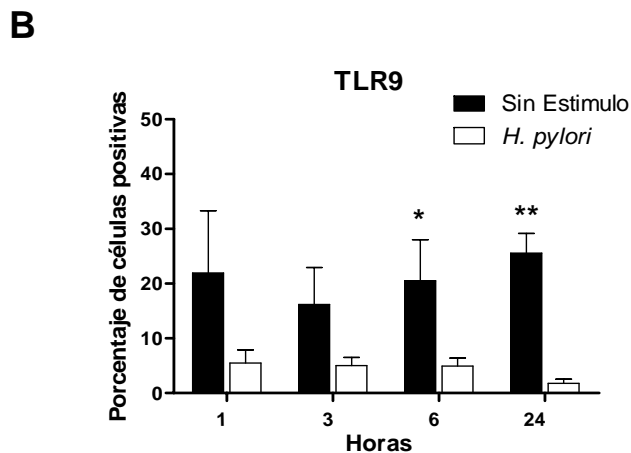


Figura 7. *H. pylori* disminuye la expresión del TLR9 en la superficie de los neutrófilos. (A) Se determinó la expresión del TLR9 en la superficie de neutrófilos, sin estímulo (histograma gris) y estimulados con *H. pylori* (histograma blanco), por citometría de flujo. Control de isotipo, histograma negro. **(B)** Representación gráfica de la expresión del TLR9. Las barras representan el promedio del porcentaje de células positivas de tres experimentos independientes + EEM. * $p < 0.05$; ** < 0.01 .



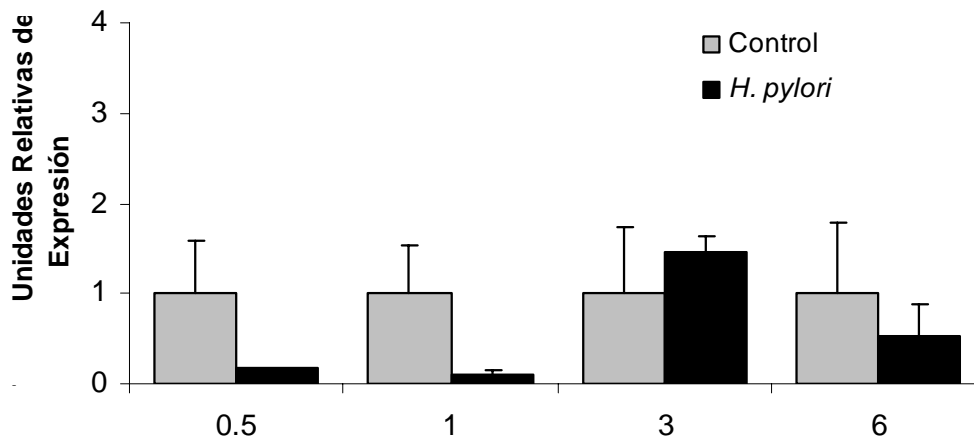


Figura 8. *H. pylori* modifica la expresión del mRNA de TLR9. Se determinó la expresión del mRNA de TLR9 en neutrófilos (10×10^6) estimulados con *H. pylori* (10×10^8) por PCR en tiempo real, se utilizó el gen de *gapdh* para normalizar. Experimento representativo de dos experimentos independientes.

8.4 Los TLRs Participan en la Activación Inducida por *H. pylori* en Neutrófilos

La participación de los TLRs (1, 2, 4, 5, 6 y 9) en la activación de los neutrófilos inducida por *H. pylori* se determinó utilizando anticuerpos neutralizantes específicos. Después de bloquear los receptores y estimular con *H. pylori* durante 24 horas, se determinó la producción de IL-8 e IL-10. En los resultados obtenidos se observa una disminución estadísticamente significativa en la producción de IL-8 en los neutrófilos cuyos TLRs fueron bloqueados y que posteriormente fueron estimulados con *H. pylori* comparada con la producción de IL-8 de las células únicamente estimuladas con *H. pylori*. Obteniéndose los siguientes porcentajes de inhibición: 44% (TLR1), 12% (TLR2), 37% (TLR4), 35% (TLR5), 49% (TLR6) y 47% (TLR9) (**Fig. 9**). Sin embargo, la inhibición de la producción de IL-8 como puede observarse en ningún caso fue total, lo que sugiere la existencia de otros mecanismos de activación, aunados a la activación mediada por los TLRs involucrados en la activación de los neutrófilos inducida por *H. pylori*.

Para determinar si existía un efecto aditivo entre los receptores se bloquearon simultáneamente el TLR2 y el TLR4, sin embargo, no se observó tal efecto (**Fig. 10A**). Por otro lado, se determinó la participación del TLR2 y del TLR4 en la producción de IL-10 e IL-1 β inducida por *H. pylori*. Se encontró una disminución significativa en la producción de IL-10 al bloquear el TLR2 y el TLR4, lo que indica la participación del TLR2 y del TLR4 en la producción de IL-10 en los neutrófilos. Por el contrario, no se modificó la producción de IL-1 β al bloquear el TLR2 y el TLR4, por lo tanto dichos receptores no participan en la producción de IL-1 β (**Fig. 10B y C**).

Se utilizaron como controles positivos los ligandos específicos para cada receptor (LTA de *S. fecalis* para TLR2, LPS de *E. coli* para TLR4 y flagelina de *S. muenchen* para TLR5) y los resultados obtenidos fueron los esperados (**Fig. 11**).

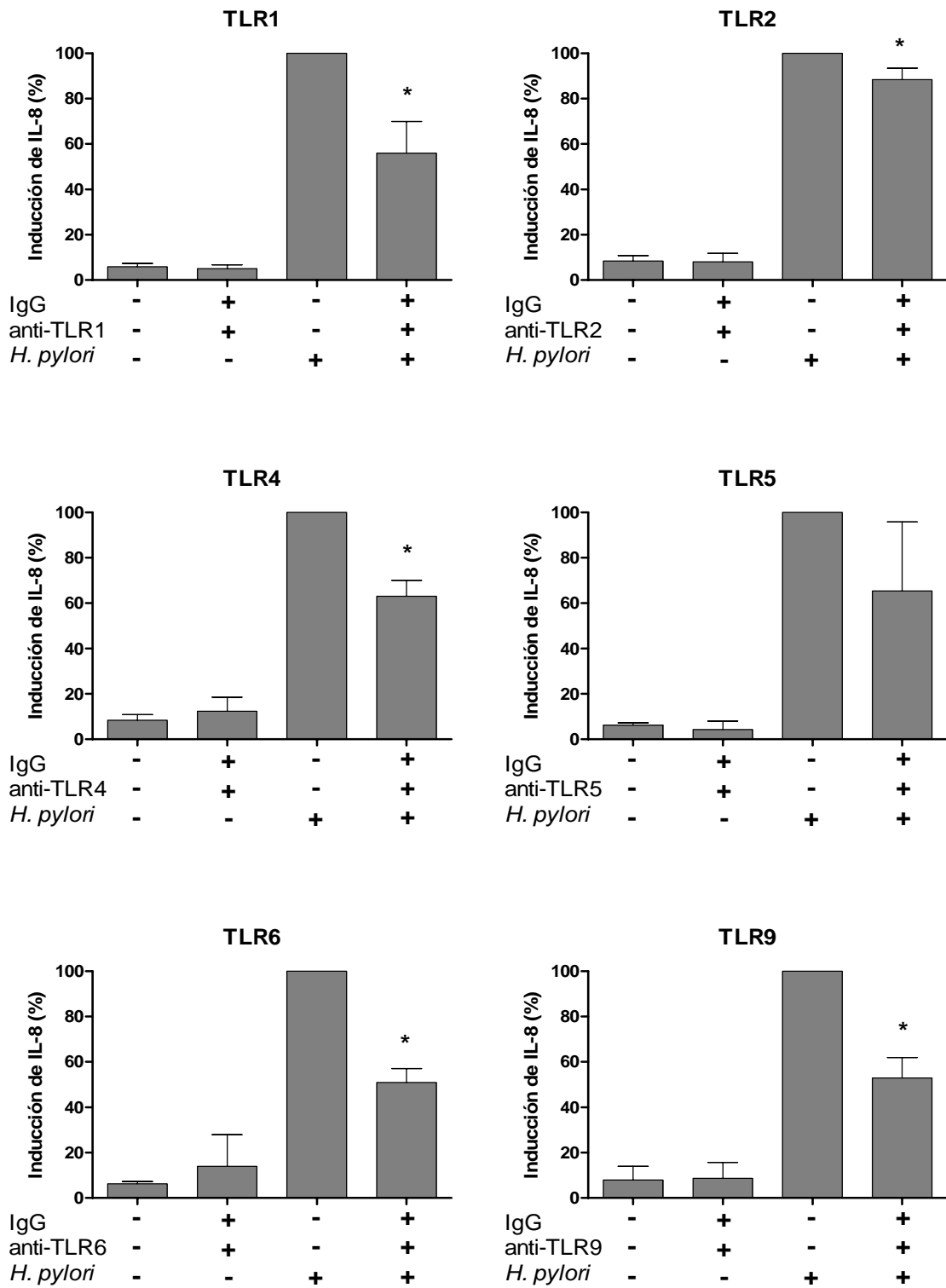


Figura 9. Los TLRs participan en la activación de neutrófilos estimulados con *H. pylori*. Neutrófilos fueron incubados con IgGs humanas y con anticuerpos neutralizantes específicos para cada TLR y posteriormente estimulados con *H. pylori* durante 24 horas. Se determinó la producción de IL-8, mediante ELISA. Los resultados están expresados como porcentaje de inducción de IL-8, considerando como el 100% la producción inducida por *H. pylori*. Las barras representan el promedio + EEM de cuatro experimentos independientes. * $p < 0.05$

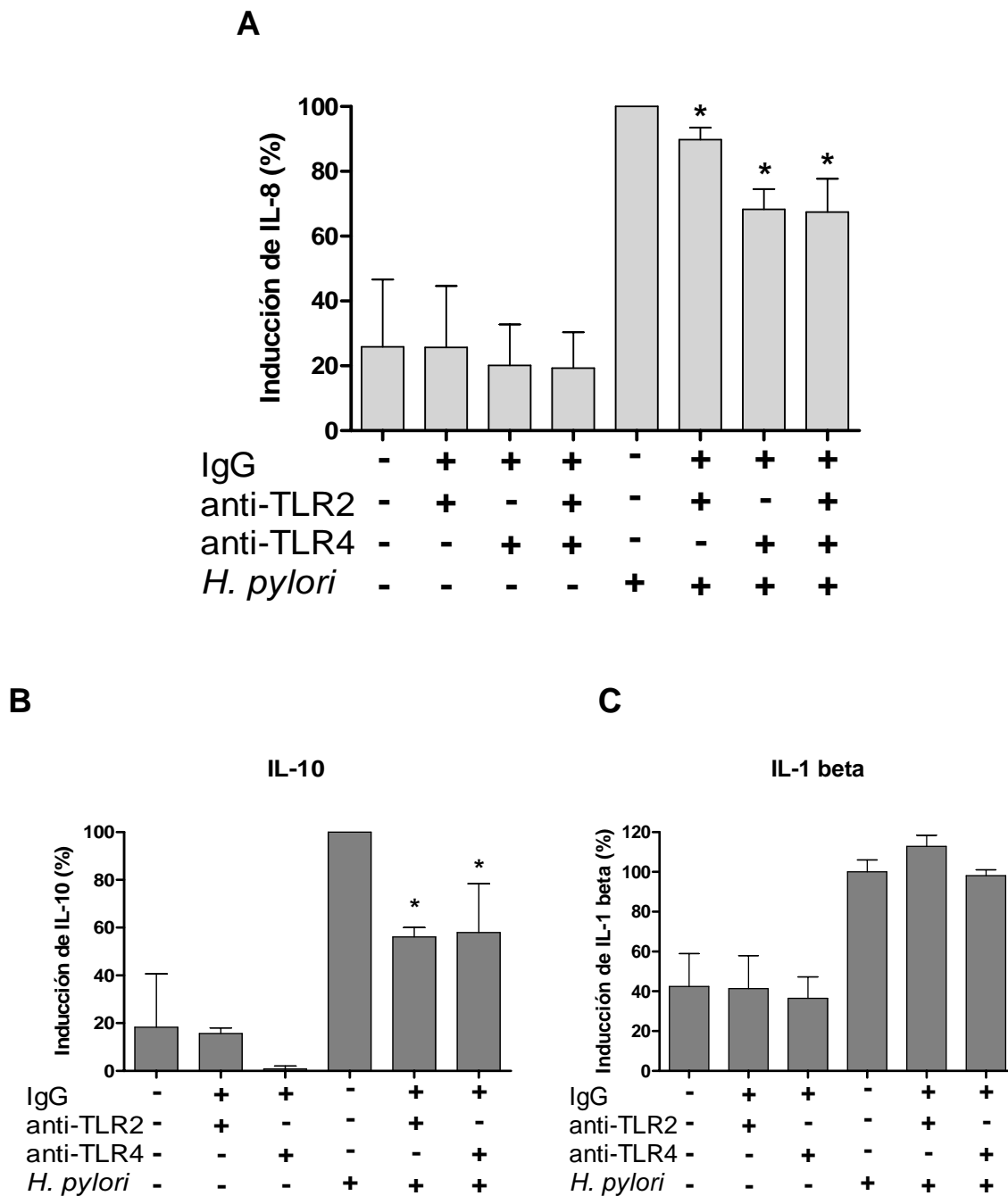


Figura 10. Participación de los TLR2 y TLR4 en la producción de IL-8, IL-10 e IL-1 β en neutrófilos inducida por *H. pylori*. Neutrófilos fueron incubados con IgGs humanas y con anticuerpos neutralizantes específicos para cada TLR y posteriormente estimulados con *H. pylori* durante 24 horas. Se determinó si existe un efecto aditivo en la producción de IL-8 al bloquear simultáneamente al TLR2 y al TLR4 (A). Además, se determinó la participación del TLR2 y TLR4 en la producción de IL-10 (B) e IL-1 β (C). Los resultados están expresados como porcentaje de inducción de IL-8, considerando como el 100% la producción inducida por *H. pylori*. En A y B las barras representan el promedio de al menos dos diferentes experimentos + DE. En C experimento representativo de dos experimentos. * $p < 0.05$

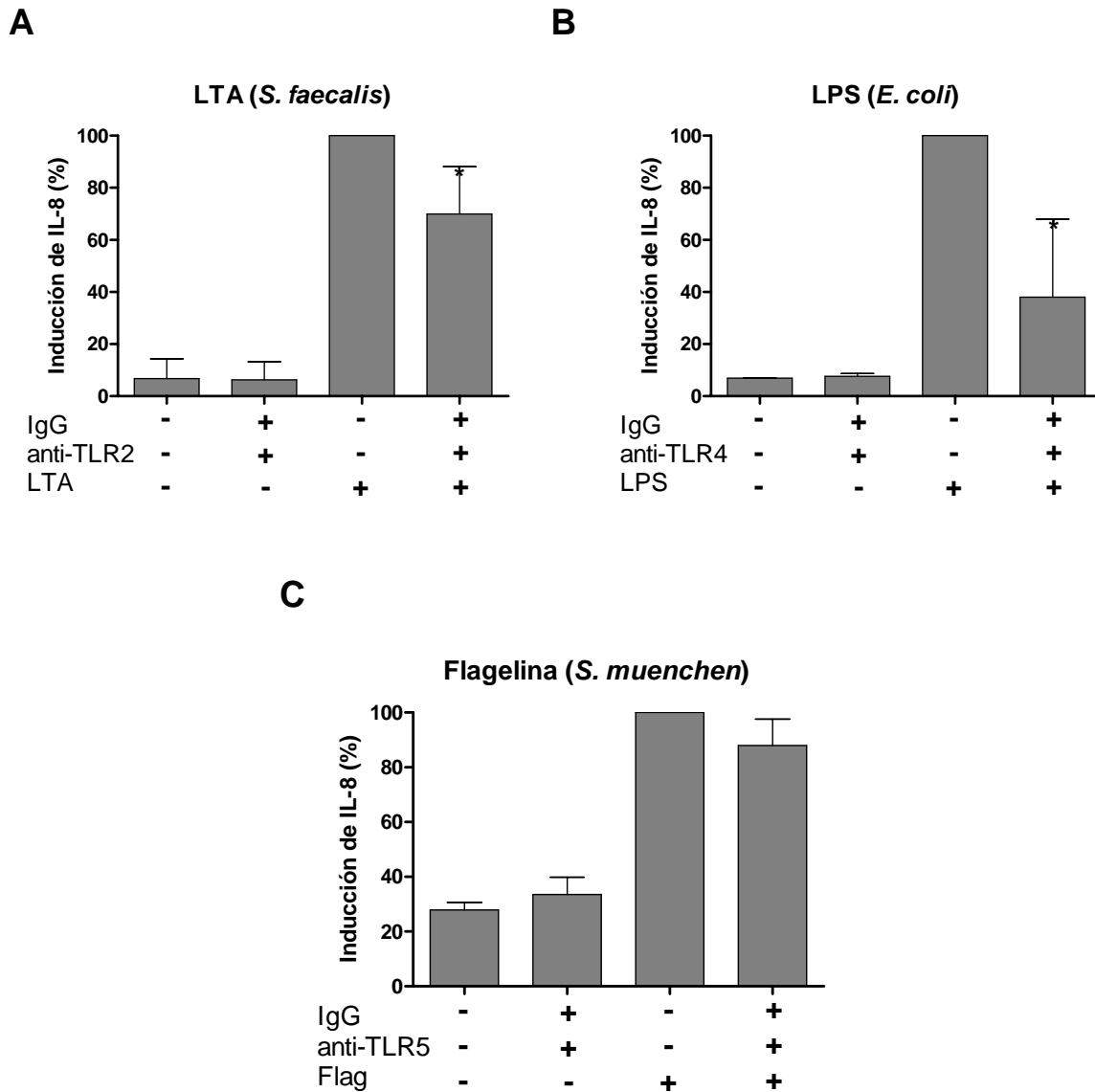


Figura 11. Controles del bloqueo de los TLRs 2, 4 y 5. Neutrófilos fueron incubados con IgGs humanas y con anticuerpos neutralizantes específicos para cada TLR y posteriormente, estimulados con 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LTA de *S. faecalis* (A), 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS de *E. coli* (B) y 100 ng/mL de flagelina de *S. muenchen* (C) durante 24 horas. Los resultados están expresados como porcentajes, considerando como el 100% la máxima inducción de IL-8. Experimentos representativos de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$

8.5 El DNA de *H. pylori* Induce la Expresión y Secreción de IL-8 y un Aumento en la Expresión del TLR9 en Neutrófilos

Para determinar si el DNA de *H. pylori* es capaz de activar al TLR9 en los neutrófilos se aisló y purificó DNA total de la cepa 26695 de *H. pylori*. EL DNA se incubó con polimixina B para inhibir el LPS contaminante. Para comprobar que el DNA obtenido estaba libre de contaminantes se incubó con DNasa y la degradación completa del DNA fue confirmada por electroforesis en un gel de agarosa (**Fig. 12A**). Posteriormente, se determinó la producción de IL-8 y se encontró que aumentó por efecto del DNA de *H. pylori* y que al tratar el DNA con la DNAasa la producción de IL-8 fue igual a la producción de las células sin estímulo (**Fig. 12B**). Con estos resultados se confirma que el aumento de la producción de IL-8 es inducido por el DNA de *H. pylori* y no por posibles contaminantes en la muestra.

Por otro lado, para determinar la concentración óptima de DNA para llevar a cabo los experimentos se realizó una curva con diferentes concentraciones de DNA (0.1, 0.5, 1.0 y 5.0 μg) y se determinó la producción de IL-8. Se observó una respuesta dosis-dependiente y la producción máxima de IL-8 con la mínima concentración de DNA se obtuvo con 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**Fig. 13**). Dicha concentración fue empleada en los experimentos subsecuentes.

A continuación, se determinó la producción de IL-8, IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-10 en los neutrófilos estimulados con el DNA de *H. pylori* a diferentes tiempos. Se observó un incremento en la producción de IL-8 a partir de las 3 horas y hasta las 24 horas de cultivo (**Fig. 14**). Sin embargo, la concentración máxima de IL-8 secretada (6 ng/mL) es mucho menor comparada con la concentración máxima secretada en los neutrófilos estimulados con la bacteria completa (140 ng/mL). No se detectó un aumento en la producción de IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-10 en los neutrófilos estimulados con el DNA de *H. pylori*.

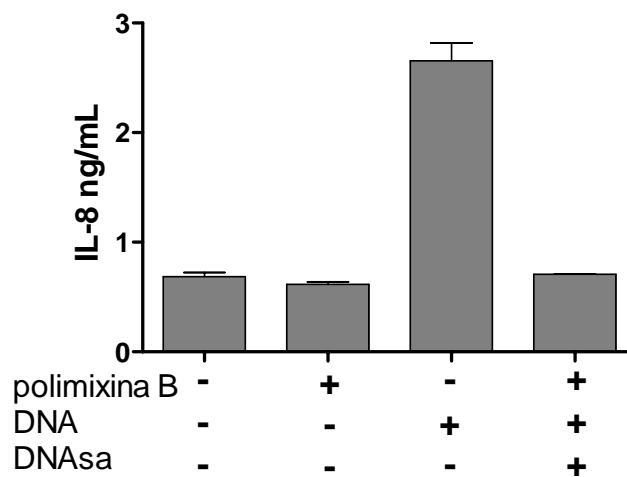
A**B**

Figura 12. DNA total aislado y purificado de *H. pylori*. Se aisló DNA total de la cepa 26695 de *H. pylori*, para eliminar la contaminación con LPS se trató con polimixina B (5 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ de DNA). Posteriormente, el DNA se trató con DNAsa hasta su degradación total y se corroboró en un gel de agarosa al 1.0% (**A**). Neutrófilos (5×10^6) fueron estimulados con DNA (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) tratado con polimixina B y con DNAsa (5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de DNA) y se determinó la producción de IL-8 en el sobrenadante por ELISA (**B**).

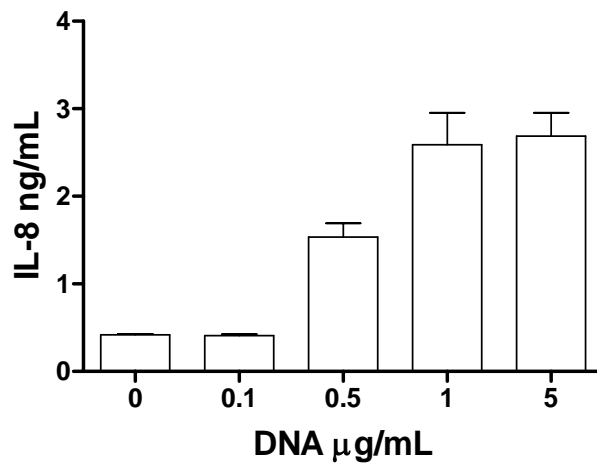


Figura 13. La producción de IL-8 inducida por el DNA de *H. pylori* es dosis-dependiente. Neutrófilos (5×10^6) fueron estimulados con concentraciones crecientes de DNA durante 24 horas y posteriormente se determinó la producción de IL-8 en el sobrenadante. Las barras representan el promedio de tres experimentos independientes + DE.

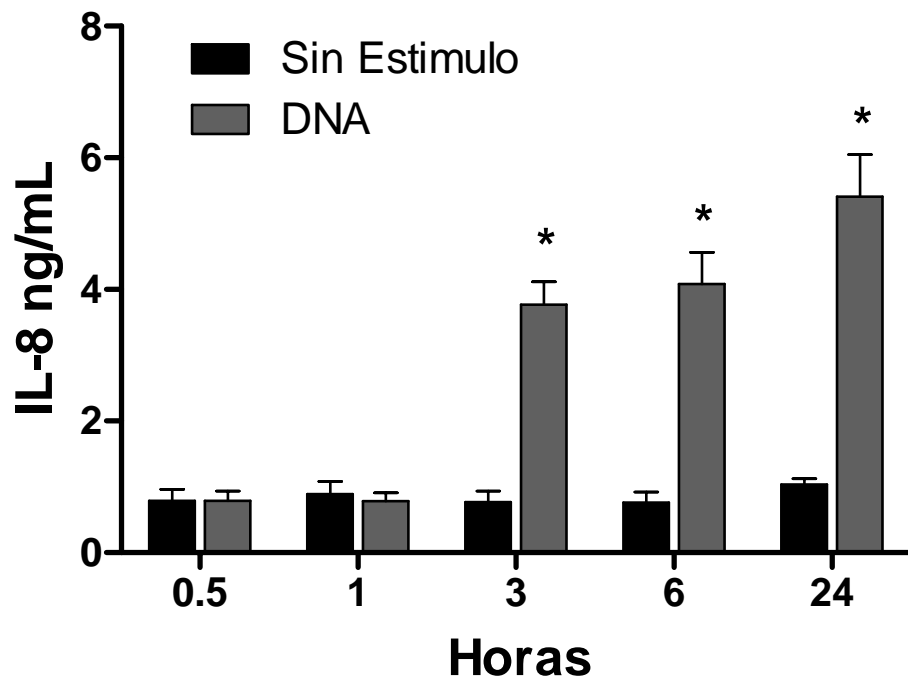


Figura 14. El DNA de *H. pylori* inducen un aumento en la producción de IL-8. Se determinó la producción de IL-8 en el sobrenadante de neutrófilos estimulados con DNA de *H. pylori* ($1.0 \mu\text{g/mL}$). Las barras representan el promedio de tres experimentos independientes + EEM. * $p < 0.05$

Además de inducir la secreción de IL-8 era importante establecer si *H. pylori* y su DNA también inducían la expresión del mRNA de IL-8 en neutrófilos. Para lo cual, se determinó la expresión del mRNA de IL-8 en neutrófilos estimulados con *H. pylori* y con DNA de *H. pylori* durante 0.5, 1.0, 3.0 y 6.0 horas. Se observó un aumento en la expresión de IL-8 en todos los tiempos de cultivo con ambos estímulos. Sin embargo, el aumento inducido por *H. pylori* fue mayor que el aumento inducido por el DNA de la bacteria (Fig. 15).

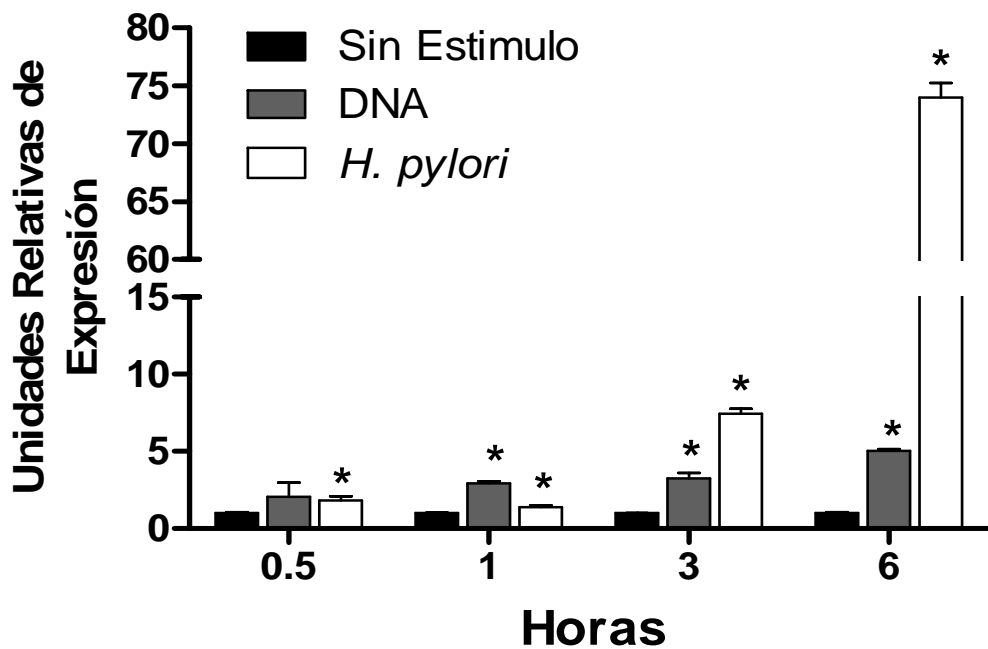


Figura 15. *H. pylori* y su DNA inducen un aumento en la expresión del mRNA de IL-8. Se determinó la expresión del mRNA de IL-8 en neutrófilos (10×10^6) estimulados con DNA de *H. pylori* ($1.0 \mu\text{g/mL}$) y con *H. pylori* (10×10^8) por PCR en tiempo real. Experimento representativo de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$

Asimismo, era importante determinar si el DNA de *H. pylori* modificaba la expresión del mRNA del TLR9 como lo hace la bacteria completa. Neutrófilos fueron estimulados con DNA de *H. pylori* durante 0.5, 1.0, 3.0 y 6.0 horas y se determinó la expresión del TLR9 por PCR en tiempo real. En los resultados obtenidos se puede observar que el DNA induce un aumento significativo de la expresión del TLR9 a las 3.0 horas de estímulo comparada con la expresión del receptor en células sin estimular (Fig. 16).

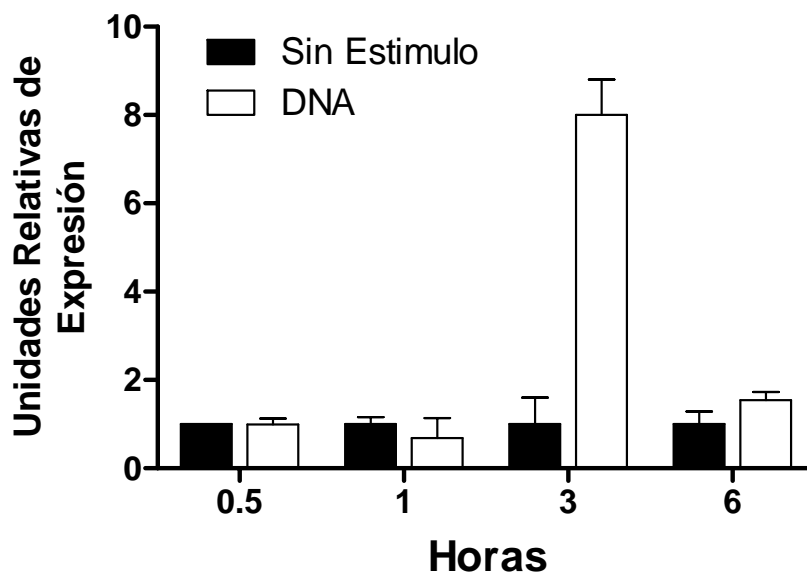


Figura 16. El DNA de *H. pylori* induce un aumento en la expresión del mRNA de TLR9. Se determinó la expresión del mRNA de TLR9 en neutrófilos estimulados con DNA de *H. pylori* (1.0 $\mu\text{g/mL}$) por PCR en tiempo real y se utilizó el gen de *gapdh* para normalizar.

8.6 Participación del TLR9 en la Activación de Neutrófilos Inducida por *H. pylori* y el DNA de *H. pylori*

Los resultados anteriores nos sugirieron una posible participación del TLR9 en la activación de los neutrófilos inducida por el DNA de *H. pylori*. Por lo cual, se utilizó el anticuerpo neutralizante específico para TLR9 y en los resultados obtenidos se puede observar que al bloquear al TLR9 no disminuyó la producción de IL-8, por el contrario aumentó considerablemente (Fig. 17).

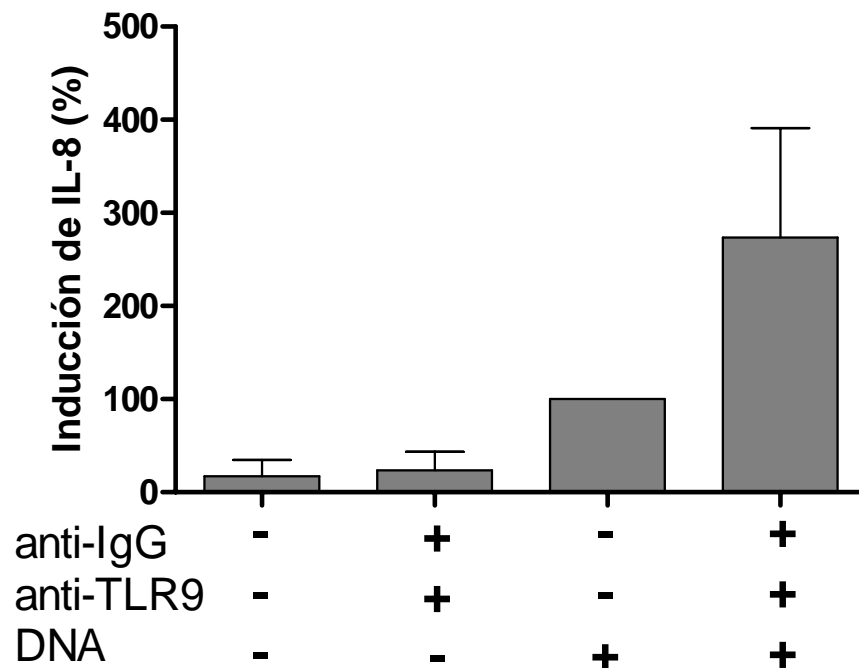


Figura 17. Participación del TLR9 en la producción de IL-8 en neutrófilos inducida por el DNA de *H. pylori*. Neutrófilos fueron incubados con IgGs humanas y con el anticuerpo neutralizante para TLR9 y posteriormente estimulados con DNA de *H. pylori* durante 24 horas. Los resultados están expresados como porcentaje de inducción de IL-8, considerando como el 100% la producción inducida por el DNA. Las barras representan el promedio de tres experimentos independientes + DE.

Por lo tanto, decidimos probar otro sistema que nos permitiera determinar si el TLR9 estaba participando o no en la activación de los neutrófilos inducida por el DNA de *H. pylori*, así como corroborar los resultados obtenidos con la bacteria completa. Empleamos un oligonucleótido sintético inhibidor (ODN) de la activación del TLR9 y cloroquina la cual inhibe la acidificación del fagolisosoma, proceso necesario para que se lleve a cabo la señalización mediada por el TLR9. En los resultados obtenidos se puede observar una disminución significativa en la producción de IL-8 en los neutrófilos que fueron preincubados con el ODN inhibidor y con la cloroquina y que posteriormente fueron estimulados con el DNA de *H. pylori* (**Fig. 18**). Por otro lado, también se observó una disminución significativa en la producción de IL-8 en los neutrófilos que fueron preincubados con el ODN inhibidor y con la cloroquina y posteriormente estimulados con *H. pylori* (**Fig. 19**).

Además, se empleó como control negativo neutrófilos preincubados con cloroquina y posteriormente estimulados con LPS de *E. coli* y los resultados fueron los esperados (**Fig. 19**). Estos resultados nos indican la participación del TLR9 en la producción de IL-8 por neutrófilos inducida tanto por *H. pylori* como por el DNA de *H. pylori*.

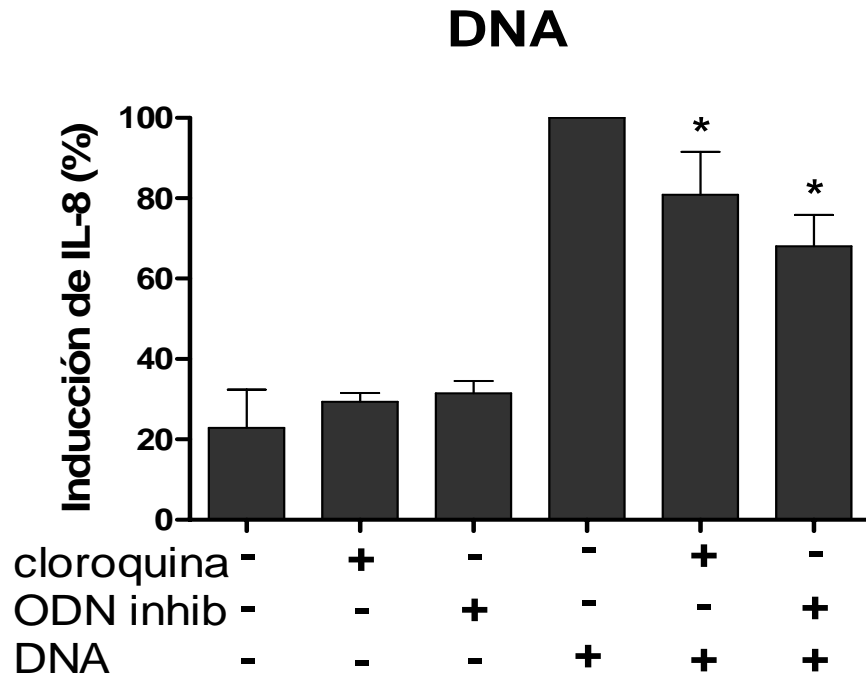
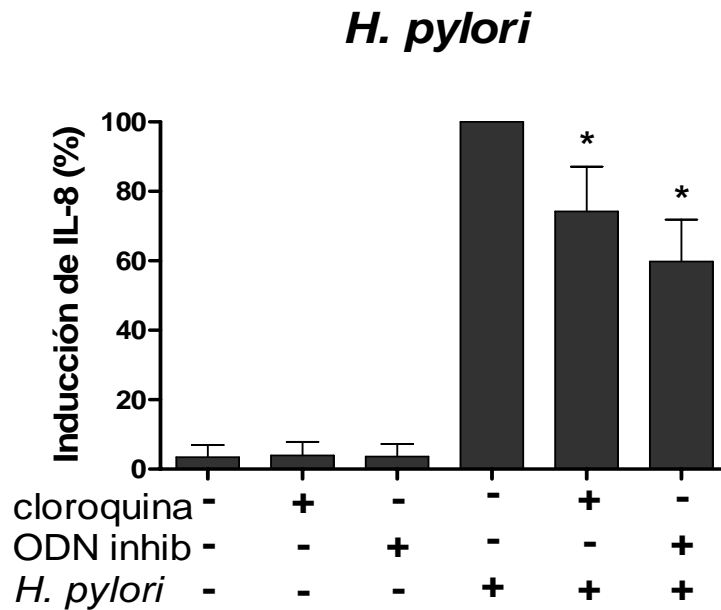


Figura 18. Activación del TLR9 en neutrófilos inducida por el DNA de *H. pylori*. Neutrófilos (5×10^6) fueron preincubados con ODN inhibidor ($1.0 \mu\text{g/mL}$) y con cloroquina ($5 \mu\text{g/mL}$) durante 1 hora y posteriormente estimulados con DNA de *H. pylori* ($1.0 \mu\text{g/mL}$) durante 24 horas al término del tiempo se determinó la producción de IL-8. Los resultados están expresados como porcentaje de inducción de IL-8, considerando como el 100% la producción inducida por el DNA. Las barras representan el promedio de tres experimentos independientes + DE. * $p < 0.05$

A



B

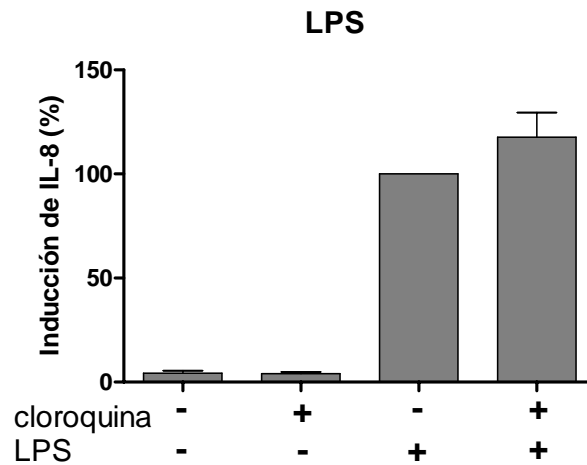


Figura 19. Activación del TLR9 en neutrófilos inducida por *H. pylori*. Neutrófilos (5×10^6) fueron preincubados con ODN inhibidor ($1.0 \mu\text{g/mL}$) o con cloroquina ($5 \mu\text{g/mL}$) durante 1 hora y posteriormente estimulados con *H. pylori* (5×10^8) (**A**) y con LPS de *E. coli* ($1.0 \mu\text{g/mL}$) (**B**) durante 24 horas al término del tiempo se determinó la producción de IL-8. Los resultados están expresados como porcentajes, considerando como el 100% la máxima inducción de IL-8. Las barras representan el promedio de tres experimentos independientes + DE. * $p < 0.05$

8.7 Activación de NF- κ B Inducida por *H. pylori* y por el DNA de *H. pylori*

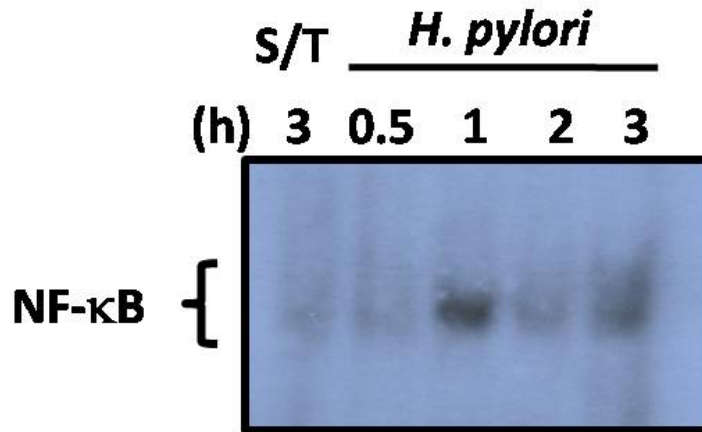
La activación de los TLRs induce la activación de factores de transcripción como el factor NF- κ B. Nosotros determinamos la activación de NF- κ B en los neutrófilos estimulados con *H. pylori* y por el DNA de *H. pylori* mediante EMSA. En nuestros resultados se observó un aumento en la activación de NF- κ B a la 1.0 y a las 3.0 horas en los neutrófilos estimulados con *H. pylori* en comparación con las células que no fueron estimuladas (**Fig. 20**). Por otro lado, al estimular a los neutrófilos con el DNA de *H. pylori* también se observó un aumento en la activación del NF- κ B en todos los tiempos de estimulación pero se pueden observar dos bandas que corresponden a dos diferentes dímeros de NF- κ B, el heterodímero p65/p50 el cual generalmente se asocia a la activación de la transcripción y el homodímero p50/p50 que generalmente se asocia a la inhibición de la transcripción de genes (**Fig. 21**). Esta hipótesis necesita ser confirmada empleando anticuerpos específicos para p50 y p65 y determinar por medio de un super-retardo electroforético la formación de los diferentes dímeros de NF- κ B en nuestras condiciones experimentales.

Para comprobar que el resultado obtenido del EMSA no se debe a uniones inespecíficas se incubaron los extractos nucleares con: 1) una sonda irrelevante simultáneamente con la sonda específica para NF- κ B; 2) se preincubaron con la sonda específica para NF- κ B pero sin marca radioactiva (sonda fría) y posteriormente se incubaron con la sonda específica para NF- κ B marcada radiactivamente y 3) la sonda específica para NF- κ B marcada radiactivamente pero sin extractos nucleares (sonda libre) (**Fig. 21**). Los resultados obtenidos fueron que la marca no desapareció al incubarse con la sonda irrelevante y no aparece al preincubarse con la sonda fría al igual que con la sonda libre. Estos resultados nos indican que no hay uniones inespecíficas.

Posteriormente, se determinó si la producción de IL-8 inducida por *H. pylori* y por su DNA es dependiente de la activación de NF- κ B, empleando dos inhibidores de la activación de NF- κ B: el PDTC que inhibe la activación de la transcripción mediada por

NF- κ B y DHMEQ que inhibe la translocación de NF- κ B al núcleo. Se observó una disminución significativa en la producción de IL-8 en los neutrófilos que fueron preincubados con el PDTC y el DHMEQ y posteriormente estimulados con *H. pylori* (**Fig. 22**). En contraste, cuando los neutrófilos fueron estimulados con el DNA de *H. pylori* no se observó una disminución en la producción de IL-8 al inhibir la activación de NF- κ B con el PDTC y el DHMEQ (**Fig. 22**). Estos resultados nos indican que el NF- κ B participa en la activación inducida por *H. pylori* induciendo la producción de IL-8, sin embargo, el NF- κ B no participa en la producción de IL-8 inducida por el DNA de *H. pylori* en neutrófilos.

A



B

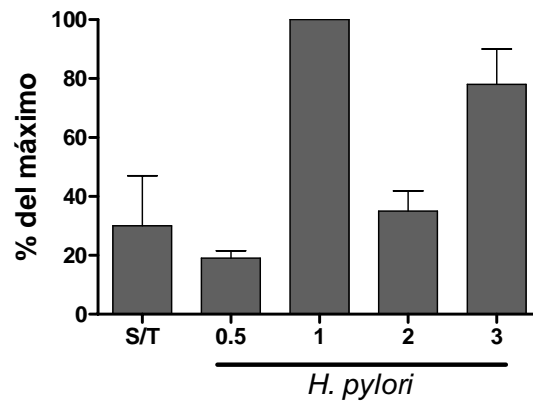
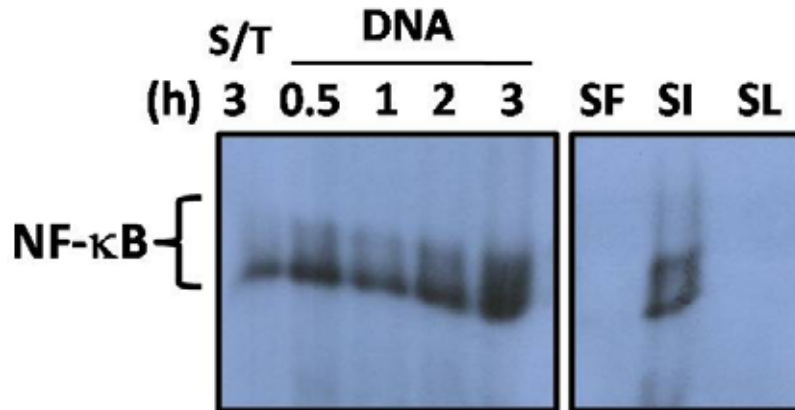


Figura 20. Activación de NF-κB en neutrófilos inducida por *H. pylori*. Extractos nucleares fueron obtenidos de neutrófilos (10×10^6) estimulados con *H. pylori* (10×10^8) durante 0.5, 1.0, 2.0 y 3.0 horas para determinar la activación de NF-κB mediante EMSA (A). Representación gráfica de la activación de NF-κB inducida por *H. pylori* en los neutrófilos (B). Se determinó la densidad óptica (D.O.) de las bandas obtenidas en el EMSA. Las barras representan el promedio de tres experimentos independientes + DE y están expresados como el porcentaje del máximo incremento.

A



B

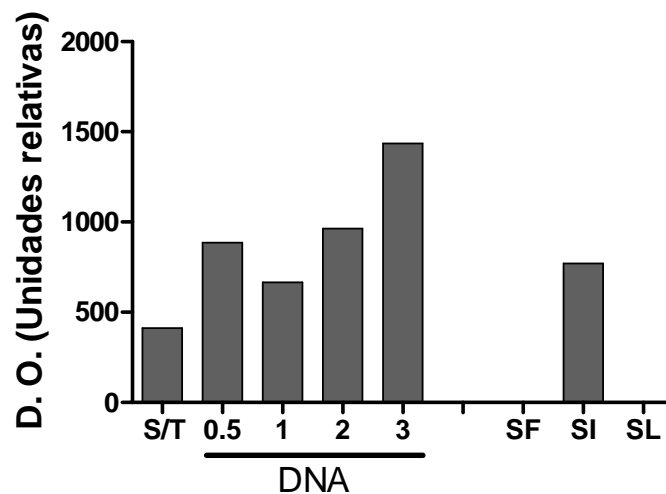
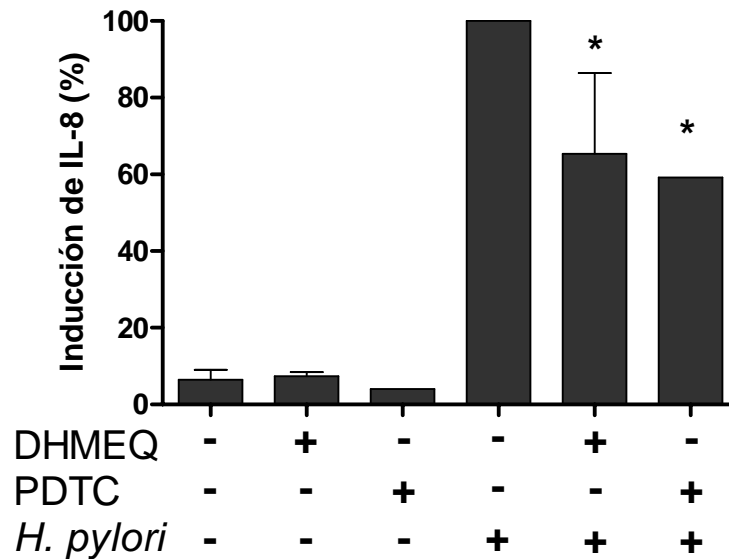


Figura 21. Activación de NF-κB en neutrófilos inducida por DNA de *H. pylori*. Extractos nucleares fueron obtenidos de neutrófilos (10×10^6) estimulados con DNA de *H. pylori* ($1.0 \mu\text{g}/\text{ML}$) durante 0.5, 1.0, 2.0 y 3.0 horas para determinar la activación de NF-κB mediante EMSA (A). Como control de unión inespecífica se empleó la sonda sin marcar con ^{32}P denominada sonda fría, una sonda irrelevante y además la sonda marcada con ^{32}P incubada sin extractos nucleares. Representación gráfica de la activación de NF-κB inducida por el DNA de *H. pylori* en los neutrófilos (B). Las barras representan la densidad óptica (D.O.) de las bandas obtenidas en el EMSA.

A



B

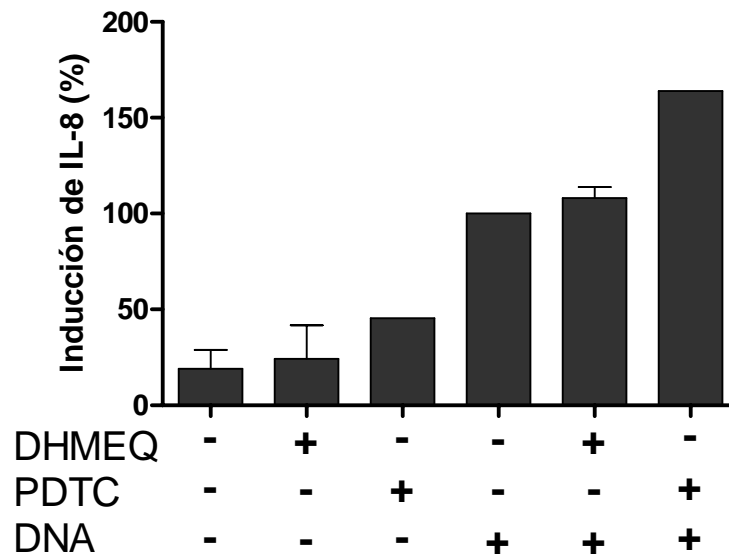


Figura 22. Activación de NF- κ B en neutrófilos inducida por *H. pylori* y por el DNA de *H. pylori*. Neutrófilos (5×10^6) fueron preincubados con DHMEQ ($5 \mu\text{g/mL}$) y con PDTC ($300 \mu\text{M}$) durante 1 hora y posteriormente estimulados con *H. pylori* (5×10^8) (A) y con DNA de *H. pylori* ($1.0 \mu\text{g/mL}$) (B) durante 24 horas al término del tiempo se determinó la producción de IL-8. Los resultados están expresados como porcentaje de inducción de IL-8, considerando como el 100% la producción inducida por *H. pylori* y por el DNA. Las barras representan el promedio de tres experimentos independientes + DE. * $p < 0.05$

9. DISCUSIÓN

La infección por *H. pylori* representa un problema de salud a nivel mundial (Bruce y col., 2008). Los neutrófilos son las primeras células del sistema inmune innato en llegar a la lamina propia de la mucosa gástrica infectada por *H. pylori*. Se ha demostrado que los neutrófilos son esenciales en la resolución de la infección, al menos en el modelo murino (Ismail y cols., 2003). Sin embargo, y a pesar de los avances en los últimos años en el estudio de la respuesta inmunológica en la infección por *H. pylori*, poco se conoce sobre los mecanismos moleculares involucrados en la respuesta inmune innata de los neutrófilos. La mayoría de los trabajos publicados se enfocan al estudio de la interacción entre la célula epitelial y *H. pylori* dejando a un lado la participación de otras células del sistema inmune innato como los neutrófilos. Además, la gran mayoría de los trabajos reportados hasta ahora utilizan como modelos experimentales líneas celulares o modelos murinos. Esto trae como consecuencia que existan discrepancias entre los resultados obtenidos y finalmente un avance pobre en el entendimiento de la respuesta inmunológica que se presenta en la infección por *H. pylori* en el humano.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que *H. pylori* induce un aumento en la producción de citocinas proinflamatorias (IL-8, TNF- α e IL-1 β) y antiinflamatorias (IL-10) en los neutrófilos humanos. Este hallazgo es de gran importancia ya que generalmente no se identifica a los neutrófilos como productores importantes de citocinas. Las citocinas en su papel de mediadores de la inflamación son determinantes en el desarrollo de las enfermedades asociadas a la infección por *H. pylori* (Hellming y cols., 2008). Se ha reportado que una desregulación en la producción de IL-1 β y TNF- α como resultado de polimorfismos presentes en los genes que codifican para dichas citocinas, se asocia al desarrollo del cáncer gástrico debido principalmente a la inflamación crónica que se presenta (El-Omar y cols., 2003). No obstante, se sabe que para erradicar la infección por *H. pylori* es necesaria una fuerte respuesta inflamatoria. Recientemente, se reportó que en ratones infectados con *H.*

pylori y deficientes de IL-10, la infección es erradicada en 7 días post-infección, no así en los ratones silvestres (Matsumoto y cols., 2005).

Consistentemente con estudios previos en los que se reportó un aumento en la expresión de los TLRs en biopsias de pacientes infectados con *H. pylori* y con estudios *in vitro* con células epiteliales gástricas (Su y cols., 2003; Schmauber y cols., 2004), nuestros resultados muestran que *H. pylori* incrementa la expresión del TLR2 y del TLR4 en la superficie de los neutrófilos. Asimismo, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran por primera vez la expresión basal del TLR9 en la superficie de neutrófilos humanos. Este hallazgo es de gran importancia ya que en la actualidad se señala al TLR9 como un receptor intracelular. Sin embargo, existen algunos reportes en los que se describe al TLR9 en la superficie de células epiteliales y en la superficie de células mononucleares de sangre periférica (Eaton-Bassiri y cols., 2004; Saikh y cols., 2004; Andersen y cols., 2006). Además, se observó que *H. pylori* disminuye la expresión del TLR9 en la superficie del neutrófilo. La disminución de la expresión del TLR9 inducida por *H. pylori* podría ser la consecuencia de dos eventos: a) una regulación negativa de la transcripción del mRNA del receptor, ó b) la internalización del receptor después de ser activado. Por tal motivo, se determinó la expresión del mRNA del TLR9 y se encontró que *H. pylori* disminuye la expresión del mRNA del receptor a tiempos cortos y aumenta su expresión a las 3 horas de estímulo. Aún no hay evidencia de si el receptor es internalizado.

En la infección por *H. pylori* una de las citocinas más abundantes y más importantes es la IL-8 por su función como quimioatrayente y su participación en el desarrollo del cáncer gástrico (Suzuki y cols., 2004; Taguchi y cols., 2005; Waugh y col., 2008). Nosotros observamos que la producción de IL-8 inducida por *H. pylori* disminuyó al bloquear los TLRs 1, 2, 4, 5, 6 y 9, evidenciando por primera vez, la participación de estos receptores en la activación de los neutrófilos inducida por *H. pylori*. Además, se observó que tanto el TLR2 como el TLR4 participan en la inducción de IL-10, pero no influyen en la producción de IL-1 β lo que sugiere la existencia de otros mecanismos a través de los cuales se induce la respuesta inflamatoria a *H. pylori*. Estos resultados son

de gran importancia ya que aportan bases elementales para la búsqueda de blancos terapéuticos.

Uno de los ligandos descritos para el TLR9 son los dinucleótidos citosina-fosfatoguanidina (CpGs) no metilados que se encuentran abundantemente en el DNA de bacterias y virus (Hemmi y cols., 2000; Zhang y cols., 2007). Existen reportes previos en los que se describe que el DNA de *E. coli* activa a neutrófilos humanos induciendo la producción de IL-8, IL-6, especies reactivas del nitrógeno y moléculas de adhesión (József y cols., 2004; Álvarez y cols., 2006; Agren y cols., 2006; József y cols., 2004; Fuxman-Bass y cols., 2008). En este trabajo demostramos que el DNA de *H. pylori* activa a neutrófilos humanos induciendo la producción de IL-8, pero no induce la producción de TNF- α , IL-6, IL-1 β o IL-10 como lo hace la bacteria completa, lo que indica que existen componentes o estructuras de la bacteria, diferentes al DNA, necesarios para inducir la producción de citocinas. El DNA de *H. pylori*, además de inducir la secreción de IL-8, también aumenta la expresión del mRNA de la IL-8 en forma tiempo dependiente. Asimismo, aumenta la expresión del mRNA del TLR9 a las 3 horas de estimulación, probablemente de esta forma regula la expresión de su propio receptor como generalmente sucede con otros receptores y sus ligandos.

Por otro lado, nuestros resultados demuestran que el DNA de *H. pylori* induce la producción de IL-8 en neutrófilos humanos a través del TLR9. Es muy probable que esta activación se lleve a cabo principalmente a nivel de la superficie del neutrófilo, debido a que existen reportes previos que demuestran que el DNA bacteriano no requiere ser internalizado para activar a neutrófilos humanos (Fuxman-Bass y cols., 2008), sin embargo se requieren de otros estudios que nos permitan confirmar esta hipótesis.

La accesibilidad del DNA de *H. pylori* es otro factor que contribuye en la relevancia de nuestros hallazgos. En estudios previos se ha sugerido que *H. pylori* además de translocar proteínas a la célula blanco a través del sistema de secreción tipo IV, también podría inyectar DNA (Odenbreit y cols., 2001; Philpott y cols., 2002).

Asimismo, se ha demostrado la presencia de DNA extracelular en cultivos bacterianos como parte del proceso natural de transformación de algunas especies de bacterias y tal es el caso de *H. pylori* (Steinmoen y cols., 2002; Moscoso y cols., 2004; Allesen-Holm y cols., 2006). Por lo que se podría pensar que el DNA de *H. pylori* es un MAMP de gran relevancia en el proceso inflamatorio por su accesibilidad y alta concentración.

La activación de los neutrófilos inducida por el DNA de *H. pylori* a través del TLR9 es un hallazgo de gran relevancia ya que podría explicar uno de los mecanismos por los cuales los neutrófilos pueden contribuir a la amplificación y al mantenimiento de la respuesta inflamatoria al inducir la producción de IL-8, el principal quimioatrayente de neutrófilos. El mantenimiento del proceso inflamatorio trae como consecuencia el incremento al daño generado al epitelio gástrico. No obstante, la participación del TLR9 en la activación del neutrófilo es parcial, lo que indica la existencia de otros receptores y mecanismos que contribuyen a la producción de IL-8 en los neutrófilos inducida por el DNA de *H. pylori*, como podrían ser el receptor DAI y el inflamasoma que se describieron recientemente como receptores citoplasmáticos del DNA bacteriano (Takaoka 2007; Muruve y cols., 2008).

Además, la participación del TLR9 en la activación de los neutrófilos humanos tiene una implicación terapéutica importante, ya que los agonistas sintéticos del TLR9 son considerados como excelentes adyuvantes en el tratamiento de enfermedades infecciosas, alergias y cáncer (Hessel y cols., 2005; Krieg y cols., 2007; Guo y cols., 2007; Jurk y cols., 2007; Kline y cols., 2007). Y nuestros resultados contribuyen al entendimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la respuesta inmunológica mediada por el TLR9 en particular en la infección por *H. pylori*.

Por otro lado, el NF- κ B es un regulador esencial de genes involucrados en la inflamación (Ghosh y col., 2008). Diversos estudios han reportado su participación en la respuesta inmunológica inducida por *H. pylori* (Smith y cols., 2004; Pathak y cols., 2006; Smith y cols., 2006). En el presente estudio se evaluó la activación de NF- κ B inducida por *H. pylori* y por su DNA en neutrófilos humanos. Encontramos que tanto la bacteria completa como su DNA inducen la activación de NF- κ B. Sin embargo, observamos una activación diferencial entre los dímeros que pueden conformar a este factor de

transcripción. Estos resultados nos indican una respuesta específica y diferencial a *H. pylori* y al DNA de *H. pylori* en neutrófilos humanos. Además, se encontró que la producción de IL-8 inducida por *H. pylori* es mediada parcialmente por NF- κ B, pero no la producción de IL-8 inducida por el DNA de la bacteria. Estos hallazgos revelan la posible participación de otros factores de transcripción, como AP-1 y NF-IL-6 ya que se ha reportado previamente la presencia de elementos de respuesta a estos factores de transcripción en el promotor del gen que codifica para la IL-8 (Roebuck KA, 1999).

En resumen, los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran por primera vez, que *H. pylori* activa a los neutrófilos humanos, induciendo la producción de citocinas inflamatorias, modificando la expresión de los TLRs e induciendo la activación del factor de transcripción NF- κ B. Además, se demostró que la producción de IL-8 inducida por *H. pylori* es mediada por los TLRs 1, 2, 4, 6 y 9. También, el TLR2 y el TLR4 participan en la producción de IL-10 inducida por *H. pylori*. La producción de IL-8 inducida por *H. pylori* es mediada parcialmente por el TLR9 y NF- κ B. Se demostró que los neutrófilos humanos expresan TLR9 en su superficie y que el DNA de *H. pylori* induce la producción de IL-8 y la activación de NF- κ B. La producción de IL-8 inducida por el DNA de *H. pylori* es mediada por el TLR9, pero no por NF- κ B. En conjunto estos resultados nos demuestran la función primordial de los neutrófilos y los TLRs en la respuesta inflamatoria en la infección por *H. pylori*.

10. CONCLUSIONES

- *H. pylori* activa a neutrófilos humanos induciendo una respuesta proinflamatoria temprana caracterizada por la producción de IL-8, TNF- α e IL-1 β , seguida de una respuesta antiinflamatoria caracterizada por la producción de IL-10.
- *H. pylori* induce un aumento en la expresión de TLR2 y TLR4 en la superficie de neutrófilos humanos.
- Los neutrófilos humanos expresan TLR9 en su superficie y *H. pylori* disminuye la expresión de este receptor en la superficie y modifica la expresión del mRNA del TLR9.
- Los TLRs 1, 2, 4, 5, 6 y 9 participan en la secreción de IL-8 inducida por *H. pylori* en neutrófilos.
- Los TLRs 2 y 4 participan en la producción de IL-10 pero no de IL-1 β inducida por *H. pylori*.
- El DNA de *H. pylori* induce la producción de IL-8 pero no de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 y un aumento en la expresión del mRNA del TLR9.
- El TLR9 participa en la producción de IL-8 inducida por el DNA de *H. pylori*.
- La producción de IL-8 inducida por *H. pylori* es mediada parcialmente por NF- κ B, pero no participa en la producción de IL-8 inducida por el DNA de *H. pylori*.
- *H. pylori* y su DNA inducen la activación del factor de transcripción NF- κ B, de forma diferencial y específica.

11. REFERENCIAS

- **Aderem A**, and Ulevitch R. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*. 2000, 406:782-787.
- **Agren J**, Thiernemann C, Foster SJ, Wang JE, and Aasen AO. Cytokine responses to CpG DNA in human leukocytes. *Scand J Immunol*. 2006, 64(1):61-68.
- **Akira S**, and Takeda K. Toll-like receptor signaling. *Nature Rev*. 2004, 4:499-511.
- **Akira S**. Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem*. 2003, 278:38105-38108.
- **Alexopoulou L**, Holt AC, Medzhitov R, and Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. 2001, 413:372-738.
- **Allen LA**, Beecher BR, Lynch JT, Rohner OV, and Wittine LM. *Helicobacter pylori* disrupts NAPDH oxidase targeting in human neutrophils to induce extracellular superoxide release. *J Immunol*. 2005, 174:3658-3667.
- **Allesen-Holm M**, Barken KB, Yang L, Klausen M, Webb JS, Kjelleberg S, Molin S, *et al*. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol*. 2006, 59(4):1114-28.
- **Alvarez ME**, Fuxman Bass JI, Geffner JR, Calotti PX, Costas M, Coso OA, Gamberale R, *et al*. Neutrophil signaling pathways activated by bacterial DNA stimulation. *J Immunol*. 2006, 177(6):4037-4046.
- **Andersen JM**, Al-Khairy D, and Ingalls RR. Innate immunity at the mucosal surface: role of toll-like receptor 3 and toll-like receptor 9 in cervical epithelial cell responses to microbial pathogens. *Biol Reprod*. 2006, 74(5):824-831.
- **Aravalli RN**, Hu S, Rowen TN, Palmquist JM, and Lokensgard JM. TLR2-mediated proinflammatory cytokines and chemokine production by microglial cells in response to herpes simplex virus. *J Immunol*. 2005, 175:4189-4193.
- **Atherton JC**, Peek RM, Tham KT, Cover TL, and Blaser MJ. Clinical and pathologic importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol*. 1997, 112:92-99.

- **Backert S**, and Selbach M. Role of type secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Cell Microbiol.* 2008, 10(8):1573-1581.
- **Bellocchio S**, Moretti S, Perruccio K, Fallarino F, Bozza S, Montagnoli C, Mosci P, *et al.* TLRs govern neutrophil activity in aspergillosis. *J Immunol.* 2004, 173(12):7406-7415.
- **Błach-Olszewska Z.** Innate immunity: cells, receptors, and signaling pathways. *Arch Immunol Ther Exp.* 2005, 53(3):245-253.
- **Bruce MG**, and Maaros HI. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 2008, 13 Suppl 1:1-6.
- **Cloutier A**, Ear T, Blais-Charron E, Dubois CM, and McDonald PP. Differential involvement of NF- κ B and MAP kinase pathways in the generation of inflammatory cytokines by human neutrophils. *J Leukoc Biol.* 2007, 81:567-577.
- **Colotta F**, Re F, Polentarutti N, Sozzani S, and Mantovani A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood.* 1992; 80:2012-2020.
- **Crabtree JE.** Immune and inflammatory responses to *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1996, 215:3-10.
- **D’Elios M**, Amedei A, Benagiano M, Azurri A, and Del Petre G. *Helicobacter pylori*, T cells and cytokines: the “dangerous liaisons”. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005, 44(2):113-119.
- **D’Elios M**, Amedei A, Cappon A, Del Prete G, and Bernard M. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* (HP-NAP) as an immunomodulating agent. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007, 50:157–164.
- **Eaton-Bassiri A**, Dillon SB, Cunningham M, Rycyzyn MA, Mills J, Sarisky RT, and Mbow ML. Toll-like receptor 9 can be expressed at the cell surface of distinct populations of tonsils and human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun.* 2004, 72:7202-7211.
- **Elios MD**, Amedei A, and Del Prete G. Host response to *Helicobacter pylori* infection: the TH1 balance. *Clin Microbiol Infect.* 1999, 5:42-.
- **El-Omar EM**, Rabkin CS, Gammon MD, Vaughan T, Risch H, Schoenberg J, *et al.* Increased risk of noncardia gastric cancer associated with

proinflammatory cytokine gene polymorphisms. *Gastroenterology*. 2003, 124:1193–1201.

- **Faurschou M**, and Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect*. 2005, 5:1317–1327.
- **Fitzgerald KA**, Rowe DC, Barnes BJ, Caffrey DR, Visintin A, Latz E, Monks B, *et al*. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF- κ B involves the Toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med*. 2003, 198:1043-1055.
- **Fontham ETH**, Ruiz B, and Perez A. Determinants of *Helicobacter pylori* infection and chronic gastritis. *Am J Gastroenterology*. 1995; 90:1094-101.
- **François S**, El Benna J, Dang PM, Pedruzzi E, Gougerot-Pocidallo MA, and Elbim C. Inhibition of neutrophil apoptosis by TLR agonists in whole blood: involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt and NF- κ B signaling pathways, leading to increased levels of Mcl-1, A1, and phosphorylated Bad. *J Immunol*. 2005, 174(6):3633-3642.
- **Fuxman Bass JI**, Gabelloni ML, Alvarez ME, Vermeulen ME, Russo DM, Zorreguieta A, Geffner JR, and Trevani AS. Characterization of bacterial DNA binding to human neutrophil surface. *Lab Invest*. 2008, 88(9):926-937.
- **Ghosh S**, and Hayden MS. New regulators of NF- κ B in inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2008, 8(11):837-848.
- **Guo YJ**, Wu D, Wang KY, and Sun SH. Adjuvant effects of bacillus Calmette-Guerin DNA or CpG-oligonucleotide in the immune response to *Taenia solium* cysticercosis vaccine in porcine. *Scand J Immunol*. 2007, 66:619-27.
- **Hacker H**, Redecke V, Blagoev B, Kratchmarova I, Hsu LC, Wang GG, Kamps MP, *et al*. Specificity in Toll-like receptor signaling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature*. 2006, 439:204-207.
- **Hattermann K**, Picard S, Borgeat M, Leclerc P, Pouliot M, and Borgeat P. The Toll-like receptor 7/8-ligand resiquimod (R-848) primes human neutrophils for leukotriene B₄, prostaglandin E₂ and platelet-activating factor biosynthesis. *FASEB J*. 2007, 21(7):1575-1585.
- **Hayashi F**, Means TK, and Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*. 2003, 102:2660-2669.

- **Hellmig S**, Bartscht T, Fischbach W, Fölsch UR, and Schreiber S. Interleukin-10 (-819 C/T) and TNF-A (-308 G/A) as risk factors for *H. pylori*-associated gastric MALT-lymphoma. *Dig Dis Sci*. 2008, 53(7):2007-2008.
- **Hemmi H**, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, *et al.* A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*. 2000, 408(6813):740-745.
- **Hessel EM**, Chu M, Lizcano JO, Chang B, Herman N, Kell SA, Wills-Karp M, and Coffman RL. Immunostimulatory oligonucleotides block allergic airway inflammation by inhibiting Th2 cell activation and IgE-mediated cytokine induction. *J Exp Med*. 2005, 202:1563-1573.
- **Hoebe K**, and Beutler B. TRAF3: a new component of the TLR-signaling apparatus. *Trends Mol Med*. 2006, 12:187-189.
- **Hultmark D**. Macrophage differentiation marker MyD88 is a member of the Toll-IL-1 receptor family. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994, 199:144-146.
- **Imanishi T**, Hara H, Suzuki S, Suzuki N, Akira S, and Saito T. TLR2 directly trigger Th1 effector functions. *J Immunol*. 2007, 178:6715-6719.
- **Inohara N**, Koseki T, del Peso L, Hu Y, Yee C, Chen S, Carrio S, *et al.* Nod1, and Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kB. *J Biol Chem*. 1999, 274:1456-14567.
- **Ismail H**, Fick P, Zhang J, Lynch R, and Berg D. Depletion of Neutrophils in IL-10^{-/-} Mice Delays Clearance of Gastric *Helicobacter* Infection and Decreases the Th1 Immune Response to *Helicobacter*. *J. Immunol*. 2003, 170:3782–3789.
- **József L**, Khreiss T, and Filep JG. CpG motifs in bacterial DNA delay apoptosis of neutrophil granulocytes. *FASEB J*. 2004, 18(14):1776-1778.
- **Jurk M**, and Vollmer J. Therapeutic applications of synthetic CpG oligodeoxynucleotides as TLR9 agonists for immune modulation. *BioDrugs*. 2007, 21:387-401.
- **Kaisho T**, and Akira S. Toll-like receptor function and signalling. *J Allergy Clin Immunol*. 2006, 117:979-87.
- **Kawahara T**, Teshima S, Oka A, Sugiyama T, Kishi K, and Rokutan K. Type I *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide stimulates Toll-like receptor 4 and

- activates mitógeno oxidase 1 in gastric pit cells. *Infect Immun*. 2001, 69:4382-4389.
- **Kirschning CJ**, Wesche H, Merrill T, and Rothe M. Human Toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med*. 1998, 188: 2091-2097.
 - **Kline JN**. Immunotherapy of asthma using CpG oligodeoxynucleotides. *Immunol Res*. 2007, 39:279-86.
 - **Krieg AM**. Development of TLR9 agonists for cancer therapy. *J Clin Invest*. 2007, 117: 1184–1194.
 - **Lee SK**, Stack A, Katzowitsch E, Aizawa SI, Suerbaum S, and Josenhans C. *Helicobacter pylori* flagellins have very low intrinsic activity to stimulate human gastric epithelial cells via TLR5. *Microbes Infect*. 2003, 15:1345-1356.
 - **Lemaitre B**, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, and Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996, 86:973-983.
 - **Liu G**, and Zhao Y. Toll-like receptors and immune regulation: their direct and indirect modulation on regulatory CD4⁺ CD25⁺ T cells. *Immunology*. 2007, 122:149-156.
 - **Lord JM**, Butcher S, Killampali V, Lascelles D, and Salmon M. Neutrophil ageing and immunosenescence. *Mech Ageing Dev*. 2001, 122:1521-1535.
 - **Mai U**, Perez-Perez G, Allen J, Wahl S, Blaser M, and Smith P. Surface proteins from *Helicobacter pylori* exhibit chemotactic activity for human leukocytes and are present in gastric mucosa. *J Exp Med*. 1992, 175:517-525.
 - **Mandell L**, Moran AP, Cocchiarella A, Houghton J, Taylor N, Fox JG, Wang TC, and Kurt-Jones EA. Intact gram-negative *Helicobacter pylori*, *Helicobacter felis*, *Helicobacter hepaticus* bacteria activate innate immunity via Toll-like receptor 2 but not Toll-like receptor 4. *Infect Immun*. 2004, 72:6446-6454.
 - **Matsumoto Y**, Blanchard TG, Drakes ML, Basu M, Redline RW, Levine AD, and Czinn SJ. Eradication of *Helicobacter pylori* and resolution of gastritis in the gastric mucosa of IL-10-deficient mice. *Helicobacter*. 2005, 10(5):407-415.

- **Matsushima N**, Tanaka T, Enkhbayar P, Mikami T, Taga M, Yamada K, and Kuroki Y. Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors. *BMC Genomics*. 2007, 8:124.
- **McDonald P**, Bald A, and Cassatella. Activation of the NF- κ B pathway by inflammatory stimuli in human neutrophils. *Blood*. 1997; 9:3421-3433.
- **McNamara D**, El-Omar E. *Helicobacter pylori* infection and the pathogenesis of gastric cancer: a paradigm for host-bacterial interactions. *Dig Liver Dis*. 2008, 40(7):504-509.
- **Meylan E**, Burns K, Hofmann K, Blancheteau V, Martinon F, Kelliher M, and Tschopp J. RIP is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF- κ B activation. *Nat Immunol*. 2004, 5:503-507.
- **Mitra S**, and Abraham E. Participation of superoxide in neutrophil activation and cytokine production. *Biochim Biophys Acta*. 2006, 1762:732-741.
- **Montecucco C**, and Rappuoli R. Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001, 2(6):457-466.
- **Moscoso M**, and Claverys JP. Release of DNA into the medium by competent *Streptococcus pneumoniae*: kinetics, mechanism and stability of the liberated DNA. *Mol Microbiol*. 2004, 54(3):783-94.
- **Muñoz L**, Camorlinga M, Hernández R, Giono S, Ramón G, Muñoz O, and Torres J. Immune and proliferative cellular responses to *Helicobacter pylori* infection in the gastric mucosa of Mexican children. *Helicobacter*. 2007, 12(3):224-230.
- **Muruve DA**, Petrilli V, Zaiss AK, White LR, Clark SA, Ross PJ, Parks RJ, and Tschopp J. The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature*. 2008, 452:103-108.
- **Muzio M**, Bosisio D, Polentarutti N, D'amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, van't Veer C, *et al*. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol*. 2000, 164(11):5998-6004.
- **Nagase H**, Okugawa S, Ota Y, Tomizawa H, Matsushima K, and Hira K. Expression and function of Toll-like receptors in eosinophils: activation by Toll-like receptor 7 ligand. *J Immunol*. 2003, 171:3977-3982.

- **Noach LA**, Bosma NB, Jansen J, Hoek FJ, van Deventer SJH, and Tytgat GNJ. Mucosal tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8 production in patients with *Helicobacter pylori* infection. *Scand Gastroenterol.* 1994, 29:425-.
- **Obonyo M**, Sabet M, Cole SP, Ebmeyer J, Uematsu S, Akira S, and Guiney DG. Deficiencies of myeloid differentiation factor 88, Toll-like receptor 2 (TLR2), or TLR4 produce specific defects in macrophage cytokine secretion induced by *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.* 2007, 75:2408-2414.
- **Odenbreit S**, Gebert B, Püls J, Fischer W, and Haas R. Interaction of *Helicobacter pylori* with professional phagocytes: role of the cag pathogenicity island and translocation, phosphorylation and processing of CagA. *Cell Microbiol.* 2001, 3(1):21-31.
- **Parker LC**, Prince LR, and Sabroe I. Translational mini-review series on Toll-like receptors: networks regulated by Toll-like receptors mediate innate and adaptive immunity. *Clin Exp Immunol.* 2007, 147:199-207.
- **Pathak SK**, Basu S, Bhattacharyya A, Pathak S, Banerjee A, Basu J, and Kundu M. TLR4-dependent NF-kappaB activation and mitogen- and stress-activated protein kinase 1-triggered phosphorylation events are central to *Helicobacter pylori* peptidyl prolyl cis-, trans-isomerase (HP0175)-mediated induction of IL-6 release from macrophages. *J Immunol.* 2006, 177(11):7950-7958.
- **Perez-Perez G**, Rothenbacher D and Brenner H. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 2004, 9:1-6.
- **Perez-Perez G**, Shepherd VL, Morrow JD, and Blaser MJ. Activation of human THP-1 cells and rat bone marrow-derived macrophages by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Infect Immun.* 1995, 63:1183-7.
- **Peterson SV**, Thiel S, and Jensenius JC. The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. *Mol Immunol.* 2001, 38:133-149.
- **Petkovic M**, Vocks A, Schiller J, and Arnhold J. Oxidative activity of human polymorphonuclear leukocytes stimulated by the long-chain phosphatidic acids. *Physiol Res.* 2005, 54:105-113.

- **Poltorak A**, Smirnova I, He X, Liu MY, Van Huffel C, McNally O, Birdwell D, *et al.* Genetic and physical mapping of the Lps locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood Cells Mol Dis.* 1998, 24:340-55.
- **Power C**, Wang J, Maning B, Malcolm RK, Aherne NF, Wu Q, and Redmond HP. Bacterial lipoprotein delays apoptosis in human neutrophils thorough inhibition of caspase-3 activity: regulatory roles for CD14 and TLR2. *J Immunol.* 2004, 173:5229-5237.
- **Prince LR**, Allen L, Jones EC, Hellewell PG, Dower SK, Whyte M, and Sabroe I. The role of interleukin-1 in direct and Toll-like receptor 4-mediated neutrophil activation and survival. *Am J Pathol* 2004; 165:1819-1826.
- **Pujol N**, Link E, Liu L, Kurz C, Alloing G, Tan K, Ray K, *et al.* A reverse genetic analysis of components of the Toll signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol.* 2001, 11:809-821.
- **Robinson K**, Argent R, and Atherton JC. The inflammatory and immune response to *Helicobacter pylori* infection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2007, 21(2):237-259.
- **Roebuck KA**. Regulation of interleukin-8 gene expression. *J Interferon Cytokine Res.* 1999, 19(5):429-438.
- **Saikh KU**, Kissner TL, Sultana A, Ruthel G, and Ulrich RG. Human monocytes infected with *Yersinia pestis* express cell surface TLR9 and differentiate into dendritic cells. *J Immunol.* 2004, 173(12):7426-7434.
- **Schmausser B**, Andrulis M, Endrich S, Lee SK, Josenhans C, Müller-Hermelink HK, and Eck M. Expression and subcellular distribution of toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on the gastric epithelium in *Helicobacter pylori* infection. *Clin Exp Immunol.* 2004, 136(3):521-526.
- **Schmausser B**, Josenhans C, Endrich S, Suerbaum S, Sitaru C, Andrulis M, Brändlein S, *et al.* Downregulation of CXCR1 and CXCR2 expression on human neutrophils by *Helicobacter pylori*: a new pathomechanism in *H. pylori* infection. *Infect Immun.* 2004, 72(12):6773-6779

- **Sieveking D**, Mitchell HM, and Day AS. Gastric epithelial cell CXC chemokine secretion following *Helicobacter pylori* infection *in vitro*. J Gastroenterol Hepatol. 2004, 19(9):982-987.
- **Smith MF Jr**, Novotny J, Carl VS, and Comeau LD. *Helicobacter pylori* and toll-like receptor agonists induce syndecan-4 expression in an NF-kappaB-dependent manner. Glycobiology. 2006, 16(3):221-229.
- **Smith MF**, Mitchell A, Li G, Ding S, Fitzmaurice AM, Ryan K, Crowe S, and Goldberg JB. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but no TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells. J. Biol. Chem. 2003, 278:2552-32560.
- **Steinmoen H**, Knutsen E, and Håvarstein LS. Induction of natural competence in *Streptococcus pneumoniae* triggers lysis and DNA release from a subfraction of the cell population. Proc Natl Acad Sci USA. 2002, 99(11):7681-6.
- **Stoicov C**, Safari R, Cai X, Hasyagar C, and Houghton J. Molecular biology of gastric cancer: *Helicobacter pylori* infection and gastric adenocarcinoma: bacterial and host factors responsible for altered growth signaling. Gene. 2004, 341:1-17.
- **Strapagiel D**, Grebowska A, Rozalska B, Bak-Romaniszyn L, Czhwianiana E, Planeta-Melecka I, Rechcinski T, *et al.* Natural mannose-binding lectin (MBL) down-regulates phagocytosis of *Helicobacter pylori*. Pol J Microbiol. 2006, 55:95-101.
- **Su B**, Ceponis PJ, Lebel S, Huynh H, and Sherman PM. *Helicobacter pylori* activates Toll-like receptor 4 expression in gastrointestinal epithelial cells. Infect Immun. 2003, 71(6):3496-3502.
- **Suzuki T**, Ina K, Nishiwaki T, Tsuzuki T, Okada T, Furuta R, Nobata K, *et al.* Differential roles of interleukin-1beta and interleukin-8 in neutrophil transendothelial migration in patients with *Helicobacter pylori* infection. Scand J Gastroenterol. 2004, 39(4):313-321.
- **Taguchi A**, Ohmiya N, Shirai K, Mabuchi N, Itoh A, Hirooka Y, Niwa Y, and Goto H. Interleukin-8 promoter polymorphism increases the risk of atrophic

gastritis and gastric cancer in Japan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005, 14:2487-2493.

- **Takaoka A**, Wang Z, Choi MK, Yanai H, Negishi H, Ban T, Lu Y, *et al.* DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature.* 2007, 448(7152):501-505.
- **Torres J**, Leal-Herrera Y, Perez-Perez G, Gomez A, Camorlinga-Ponce M, Cedillo-Rivera R, Tapia-Conyer R, and Muñoz O. A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in México. *J Infect Dis.* 1998, 178(4):1089-94.
- **Torres J**, Perez-Perez G, Goodman KJ, Gold BD, Harris PR, Garza AM, Guarner J, and Muñoz O. Comprehensive review of the natural history of *Helicobacter pylori* infection in children. *Arch Med Res.* 2000, 31:431-469.
- **Tosi M.** Innate immune responses to infection. *J Allergy Clin Immunol.* 2005, 116:241-249.
- **van Doorn LJ**, Figueredo C, Sanna R, Plaisier A, Schneeberger P, de Boer W, and Quint W. Clinical relevance of the *CagA*, *VacA*, and *IceA* status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology.* 1998, 115:58-66.
- **Viala J**, Chaput C, Boneca IG, Cardona A, Girardin SE, Moran AP, Athman R, *et al.* Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol.* 2004, 5(11):1166-1174.
- **Warren JR**, and Marshall BJ. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet.* 1983, 1:1273-1275
- **Waugh DJ**, and Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res.* 2008, 14:6735-6741.
- **Wen S**, and Moss SF. *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. *Cancer Lett.* 2008 Dec 24. En prensa.
- **Wen S**, Felley CP, Bouzourene H, Reimers M, Michetti P, and Pan-Hammarstrom Q. Inflammatory gene profiles in gastric mucosa during *Helicobacter pylori* infection in humans. *J Immunol.* 2004, 174:2595-25606.
- **Wisplinghoff H**, Cornely OA, Moser S, Bethe U, Stutzer H, Salzberger B, Fatkenheuer G, *et al.* Outcomes of nosocomial bloodstream infections in adult

neutropenic patients: prospective cohort and matched case-control study. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2003, 24:905-911.

- **Wong CK**, Cheung PF, Ip WK, and Lam CW. Intracellular signaling mechanisms regulating Toll-like receptor-mediated activation of eosinophils. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007, 37:85-96.
- **Xing L**, and Remick DG. Neutrophils as firemen, production of anti-inflammatory mediators by neutrophils in a mixed cell environment. *Cell Immunol.* 2004, 231:126-132.
- **Yamamoto M**, Sato S, Hemmi H, Uematsu S Hoshino K, Kaisho T, Takeuchi O, *et al.* TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signalling pathway. *Nat Immunol.* 2003, 4:1144-1150.
- **Yamaoka Y**, Kita M, Kodama T, Sawai N, Tanahashi T, Kashima K, and Imanishi J. Chemokines in the gastric mucosa in *Helicobacter pylori* infection. *Gut.* 1998, 42:609-617.
- **Yang D**, Biragyn A, Hoover DM, Lubkowski J, and Oppenheim JJ. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu Rev Immunol.* 2004, 22:181-215.
- **Zarembern A**, and Godowski P. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptors mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol.* 2002, 168:554-561.
- **Zhang SY**, Jouanguy E, Sancho-Shimizu V, von Bernuth H, Yang K, Abel L, Picard C, *et al.* Human Toll-like receptor-dependent induction of interferons in protective immunity to viruses. *Immunol Rev.* 2007, 220:225-326.

12. ANEXO PUBLICACIÓN

Activation of human neutrophils with *Helicobacter pylori* and the role of Toll-like receptors 2 and 4 in the response

Lourdes Alvarez-Arellano, Margarita Camorlinga-Ponce, Carmen Maldonado-Bernal & Javier Torres

Infectious Diseases Research Unit, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional SXXI, IMSS, Mexico City, México

Correspondence: Carmen Maldonado-Bernal, Infectious Diseases Research Unit, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional SXXI, IMSS, Mexico City, México. Tel.: +52 56 276940; fax: +52 56 276949; e-mail: cmaldobe@yahoo.com

Received 8 December 2006; revised 12 June 2007; accepted 21 July 2007.
First published online 24 September 2007.

DOI:10.1111/j.1574-695X.2007.00327.x

Editor: Johannes Kusters

Keywords

Helicobacter pylori; human Toll-like receptor 2; human Toll-like receptor 4; human neutrophil activation.

Abstract

The innate immune response to *Helicobacter pylori* infection is beginning to be understood and recent works support a role for Toll-like receptors (TLRs). Our aim was to study the response of human neutrophils to *H. pylori* and to elucidate the role of TLR2 and TLR4. Neutrophils from healthy *H. pylori*-negative volunteers were cocultured with *H. pylori* 26695 strain. The release of IL-8, IL-1 β , tumor necrosis factor (TNF)- α and IL-10 was measured. The role of TLR2 and TLR4 was investigated with blocking assays using monoclonal antibodies against TLRs. Neutrophils produced a significant increase of IL-8, IL-1 β and TNF- α after 3, 6 and 24 h of *H. pylori* challenge, respectively, whereas IL-10 increased after 24 h. *Helicobacter pylori* challenge increased TLR2 and TLR4 expression; and antibodies against TLR2 and TLR4 diminished significantly the *H. pylori*-induced production of IL-8 and IL-10. In human neutrophils, *H. pylori* induces an early inflammatory response, partially mediated via TLR2 and TLR4 activation.

Introduction

Helicobacter pylori is a gram-negative bacterium that colonizes the gastric mucosa of about 50% of the human population. Bacterial colonization elicits inflammation in the underlying mucosa with infiltration of polymorphonuclear leukocytes and macrophages, leading to a chronic gastritis with migration of T- and B-lymphocytes and plasma cells in the lamina propria. This chronic active gastritis is characterized by neutrophils infiltrating the lamina propria, the epithelial layer and the foveolar lumen (Schmausser *et al.*, 2004). This chronic inflammation increases the risk of developing peptic ulcer disease, gastric adenocarcinoma and primary non-Hodgkin's lymphoma (MALTomas) (Crowe, 2005). The initial inflammatory response is elicited by the production of pro-inflammatory cytokines and chemokines from epithelial cells (Shimizu *et al.*, 2004), including IL-8 and Gro- α , which regulate neutrophil migration to the gastric epithelium (Eck *et al.*, 2000). Also, bacterial products such as neutrophil-activating protein (HP-NAP) and the cecropin-like peptide Hp (2–20) promote neutrophil migration to the site of infection (Satin *et al.*, 2000).

Neutrophils sense the presence of bacteria and its products by expressing Toll-like receptors (TLRs) on their surface, enabling for an effective antimicrobial response (Hayashi *et al.*, 2003). TLRs are a group of transmembrane proteins that function as pattern-recognition receptors (PRRs) for detecting and responding to microbial ligands denominated pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) present on bacteria and bacterial products (Takeda & Akira, 2005). At present, 11 different TLRs have been discovered in human cells, and are described as type 1 transmembrane receptors that contain a N-terminal extracellular region. Signaling via TLRs leads to the activation of multiple genes encoding pro- and anti-inflammatory cytokines, chemokines, adhesion and costimulatory molecules, whose participation in the initial immune response determines the outcome of an infection. The activated signaling cascade and genes would depend on the different TLRs and coreceptors activated, resulting in differences in the intensity and quality of the response (Takeda & Akira, 2005).

Recent reports suggest a role for TLRs in the initial response to *H. pylori* colonization, although some of the results are contradictory. Some studies show that *H. pylori* lipopolysaccharide activates TLR4 in gastric epithelial cells

(Su *et al.*, 2003), while others suggest that lipopolysaccharide activate TLR2 but not TLR4 (Smith *et al.*, 2003). These controversies might be explained by differences in the cell lines or in the *H. pylori* strains used. Trace contaminants in the lipopolysaccharide preparation, such as peptidoglycan or lipopeptides, might signal via TLR2 too. Live *Helicobacter* bacteria activate immune response via TLR2 but not via TLR4 (Mandell *et al.*, 2004). Macrophages from wild-type and TLR4-deficient mice produce IL-6 and Monocyte chemo attractant protein (MCP-1) when stimulated with *Helicobacter*, while macrophages from TLR2-deficient mice were unresponsive to intact bacteria, failing to secrete cytokines (Mandell *et al.*, 2004). Thus, while TLR2 may be the dominant innate immune receptor for recognition of *Helicobacter*, the involvement of TLR4 is still unclear.

Flagellins of several bacterial species activate TLR5; however, a role for TLR5 in *Helicobacter* activation is not clear. Both *H. pylori* flagellins (FlaA and FlaB) appeared to lack immuno-stimulatory activity on human gastric cells; however, gastric epithelial cells in culture express low amounts of TLR5. In fact, when the HEK293 cell line was transfected with TLR5, it did respond to challenge with *H. pylori* flagellin (Gewirtz *et al.*, 2004).

The ability of purified TLR agonist to activate neutrophil functions strongly suggests that TLRs in neutrophils are important PRRs (Hayashi *et al.*, 2003). Although it has been shown that neutrophils express most TLRs, few studies exist on the role of TLRs in the inflammatory activity of these cells (Kurt-Jones *et al.*, 2002; Hayashi *et al.*, 2003; Sabroe *et al.*, 2003; Power *et al.*, 2004). In spite of the important role of neutrophils in response to *H. pylori* infection, no studies have addressed the role of TLRs in the activation of human neutrophils by *H. pylori*. The aim of the present work was to study the activation of human neutrophils after challenge with *H. pylori* and to assess the participation of TLR2 and TLR4 in the induction of the inflammatory response.

Materials and methods

Isolation of human neutrophils

Peripheral venous blood was drawn from thirteen healthy blood donors, *H. pylori* seronegative (*H. pylori* Rapid Test, DIAGNOMEX S.A. DE C.V.). Buffy coat was obtained and neutrophils were isolated as described previously (Boyum, 1968); in brief, blood was layered over a density gradient (Lymphoprep, Nycomed, Oslo, Norway) and centrifuged at 800 g for 30 min at room temperature. The polymorphonuclear cells were collected and the erythrocytes were removed by hypotonic lysis. The neutrophils were washed, resuspended and cultured in six- or 12-well microplates at

5×10^6 cells mL⁻¹ in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 media (Life Technologies, Gaithersburg, MD) supplemented with 2% fetal bovine serum (Gibco BRL) and penicillin–streptomycin 100 UI–100 µg mL⁻¹ at 37 °C. Cell viability was determined by the trypan blue exclusion test and neutrophils' purity was determined by flow cytometry (FACScan, BD Biosciences, San Jose, CA). *Helicobacter pylori* status of the donors was confirmed serologically as described previously (Camorlinga-Ponce *et al.*, 1998).

Helicobacter pylori culture

Helicobacter pylori 26695 strain was cultured on 5% defibrinated sheep blood agar base plates containing vancomycin (3 µg mL⁻¹), trimethoprim (5 µg mL⁻¹), nalidixic acid (10 µg mL⁻¹) and amphotericin (2 µg mL⁻¹) at 37 °C in a 9% CO₂ atmosphere. Bacteria were harvested after 24 h and resuspended in 0.9% saline solution (SS). The OD of the suspension was determined at 550 nm and adjusted to a final absorbance of 0.750 in SS, corresponding to 1×10^9 bacteria mL⁻¹.

Helicobacter pylori challenge

In order to select the appropriate multiplicity of infection (MOI), human neutrophils (1×10^7) were cocultured for 3 h at 37 °C and 5% CO₂, with 2×10^7 , 1×10^8 or 2×10^8 *H. pylori* cells, representing a MOI of 2, 10 and 20, respectively. To determine the kinetics of response, neutrophils were cocultured with *H. pylori* for 0.5, 1, 3, 6, 24 and 48 h at 37 °C in 5% CO₂.

Cytokines quantification

After *H. pylori* challenge, cell-free culture supernatants were harvested and the concentrations of IL-1β, tumor necrosis factor (TNF)-α, TNF-RI, IL-10 and IL-8 were measured by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Opt-EIA™, BD Pharmingen, San Diego, CA) according to the manufacturer's instructions. The detection limit for each assay was 1 pg mL⁻¹ for IL-1β, 4 pg mL⁻¹ for TNF-α, 15.6 pg mL⁻¹ for TNF-R1, 7 pg mL⁻¹ for IL-10 and 4 pg mL⁻¹ for IL-8. In each experiment, every test was run in duplicate and the results are the average of at least three assays run in separate days.

TLR2 and TLR4 expression

Neutrophils were treated with *H. pylori* for 1, 3, 6 and 24 h, and the expression of TLR2 and TLR4 was determined by flow cytometry. Briefly, treated neutrophils were resuspended at 1×10^6 cells mL⁻¹ in blocking buffer [phosphate-buffered saline (PBS) containing 2% FBS, 2% rabbit serum, 5 mM EDTA and 0.1% sodium azide] and incubated on ice for 1 h. The cells' suspension was centrifuged and stained

with phycoerythrin-conjugated anti-human TLR2 or TLR4 monoclonal antibodies; phycoerythrin-conjugated IgG2a was used as an isotype control (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). The cells were incubated for 15 min in the dark, washed twice with fluorescence-activated cell sorting (FACS) buffer and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS (pH 7.2) for 30 min. Cells were analyzed with a FACScan flow cytometer using a software FACS DIVA (BD, Biosciences). The mean fluorescence intensity (MFI) was determined by the acquisition of at least 20 000 events gated for each study variable. Results are expressed as the mean of three experiments run in different days.

Blocking TLR2 and TLR4 activation

For antibody blocking experiments, neutrophils were first pretreated with anti-human IgG antibody ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Aventis Behring GmbH, Marburgo, Alemania) for 1 h at 37°C , in order to saturate Fc receptors and to avoid unspecific attachment of anti-TLRs mAbs. Next, neutrophils were treated with anti-TLR2 (clone TL2.1) or anti-TLR4 (clone HTA125) monoclonal antibodies (Imgenex, Biocarta US, San Diego, CA) at 5.0 and $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ for 1 h at 37°C , followed by a 24 h *H. pylori* challenge. As an additional antibody control, neutrophils were treated with anti-human IgG antibodies and challenged with *H. pylori* as described above. As positive controls of TLRs activation, after treatment with anti-TLR2 or anti-TLR4 monoclonal antibodies ($5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$) neutrophils were treated with lipopolysaccharide from *Escherichia coli* Serotype 0111:B4 (100 ng mL^{-1}) (Sigma-Aldrich CO., St Louis, MO) and with LTA from *Streptococcus faecalis* ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Sigma-Aldrich CO.). As negative controls, neutrophils were incubated with medium alone, or with anti-human IgG, or with anti-TLR2 and -TLR4 monoclonal antibodies, but without *H. pylori* challenge. After each experiment, cell-free supernatants were collected and tested for IL-8 and IL-10. Results are expressed as the mean of at least three experiments run in different days.

Statistical analysis

The data are presented as mean \pm SEM or SD of three independent experiments. Comparison between groups was performed by the Students *t*-test and Mann-Whitney test. Differences were considered to be statistically significant at a $P < 0.05$. SIGMA STAT (Jan del Scientific Software, CA) was used for analysis. TLR2 or TLR4 expression in human neutrophils after challenge with *H. pylori* was analyzed by a linear model that included donor and time effects.

Results

Kinetics of proinflammatory and antiinflammatory cytokine induction in human neutrophils after challenge with *H. pylori*

Neutrophils were challenged with *H. pylori* for 3 h at different MOIs (2, 10 and 20). After incubation, the culture supernatants were collected and the IL-8 and IL-10 concentrations were determined by ELISA. Cytokine induction (IL-8 and IL-10) was found to be dose dependent with increasing MOIs (data not shown). Based on these results, further experiments were performed using an MOI of 10.

The kinetics of IL-8, IL-1 β , TNF- α , TNF-RI and IL-10 induction by neutrophils challenged with *H. pylori* was studied. IL-8 was detected as soon as 1 h after challenge and it continued to increase after 3, 6 and 24 h of challenge (Fig. 1a). The amount of IL-8 produced by neutrophils from different donors in response to *H. pylori* varied considerably. In spite of this, in all individual experiments IL-8 production showed similar response kinetics.

IL-1 β production increased significantly after 6 h of stimulation with *H. pylori* and reached a maximum value after 24 h of challenge (Fig. 1b). The production of TNF- α began after 6 h, but the increase reached statistical significance after 24 h (Fig. 1c). In contrast, although the levels of TNF-RI were high ($733\text{--}847 \text{ pg mL}^{-1}$) at all the times tested, the values were not significantly different from those obtained with nonstimulated neutrophils (data not shown). These results suggest that the induction of TNF-RI production by neutrophils was not specifically induced by *H. pylori*. Increase of IL-10 production was evident only after 24 h of stimulation and significant after 48 h (Fig. 1d).

TLR2 and TLR4 expression in human neutrophils after challenge with *H. pylori*

The expression of TLR2 and TLR4 in human neutrophils after *H. pylori* challenge was studied. The results showed an increase in basal TLR2 and TLR4 expression induced by *H. pylori* challenge, compared with untreated neutrophils, at all the times tested (Fig. 2). TLR2 expression increased about 10% (Fig. 2a) and TLR4 expression about 20% (Fig. 2b) after *H. pylori* challenge. The magnitude in the expression of TLR2 and TLR4 before and after stimulation with *H. pylori* varied considerably from donor to donor. However, the results showed the same kinetic of response in all cases; TLR2 and TLR4 expression increased significantly after 1 h of stimulation with *H. pylori*, and reached a maximum value after 6 h of challenge. These results suggest that challenge with *H. pylori* up-regulates TLR2 and TLR4 expression in human neutrophils activating the innate immune system.

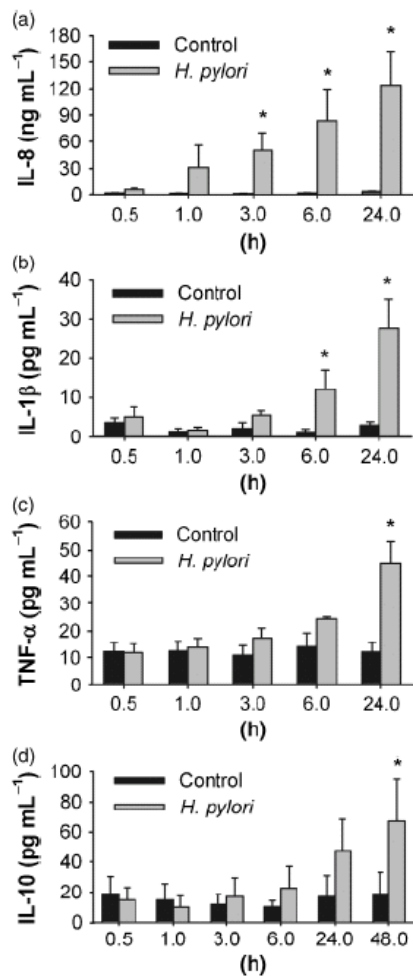


Fig. 1. Induction of IL-8, IL-1 β , TNF- α and IL-10 secretion from human neutrophils in response to *Helicobacter pylori*. A total of 10^7 neutrophils were incubated with *H. pylori* (MOI of 10) for 0.5, 1, 3, 6, 24 and 48 h. The IL-8 (a), IL-1 β (b), TNF- α (c) and IL-10 (d) concentrations were determined by EUSA in the cell-free culture supernatants. All assays were performed in duplicate and mean values \pm SEM of three independent experiments are shown. * $P < 0.05$ (Mann-Whitney test).

IL-8 and IL-10 induction by *H. pylori* is dependent on TLR2 and TLR4

We studied the possible role of TLR2 and TLR4 in the induction of IL-8 and IL-10 in human neutrophils after *H. pylori* challenge. Preincubation of neutrophils with anti-TLR2 and anti-TLR4 monoclonal antibodies resulted in a decrease of IL-8 and IL-10 expression in response to *H. pylori*. IL-8 induction decreased about 10% with anti-TLR2, 40% with anti-TLR4 (Fig. 3a) and 30% with a mixture of the two Abs (data not shown). IL-10 induction decreased about

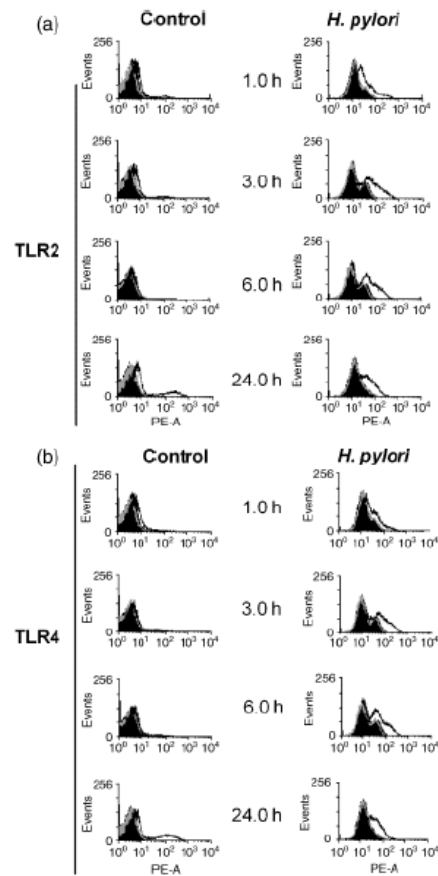


Fig. 2. Up-regulation of TLR2 and TLR4 expression in human neutrophils in response to *Helicobacter pylori*. Neutrophils (5×10^6) were treated with *H. pylori* (MOI of 10) for 1, 3, 6 and 24 h. Cells were stained with phycoerythrin-conjugated mAb against TLR2 or TLR4 (black line); an isotype control (gray histograms) and unstained neutrophils were included (black histograms), and analyzed by FACS. This figure represents one of three experiments performed. (a) TLR2 expression; (b) TLR4 expression.

50% with anti-TLR2 and 70% with anti-TLR4 (Fig. 3b). These results suggest that the production of IL-8 and IL-10 in response to *H. pylori* is partially dependent on TLR2- and TLR4-specific signal transduction. Simultaneously, standard agonists (LTA from *S. faecalis* and lipopolysaccharide from *E. coli* 0111:B4) were also included and blocking assays with anti-TLR antibodies were performed. Incubation with anti-TLR2 and anti-TLR4 resulted in a decrease of IL-8 induction of 30% and 50%, respectively, and a decrease in IL-10 induction of 38% and 31%, respectively (data not shown).

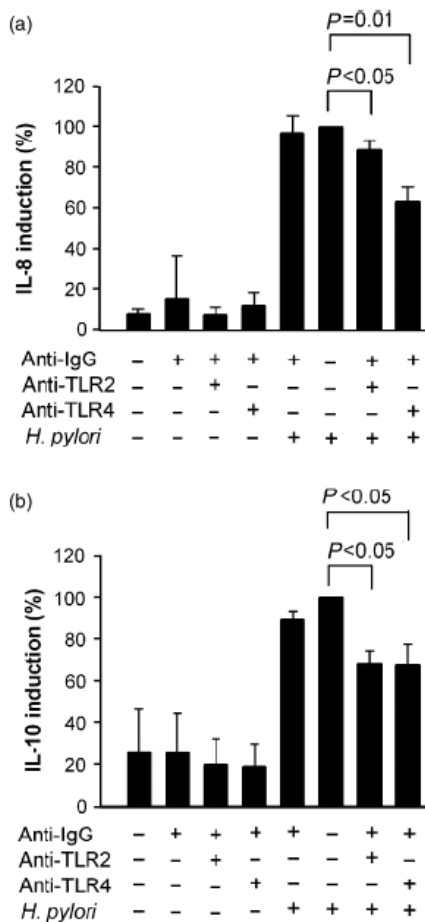


Fig. 3. Induction of IL-8 and IL-10 secretion from human neutrophils. *Helicobacter pylori* challenge is dependent on TLR2 and TLR4. Human neutrophils were incubated with *H. pylori* (MOI of 10) for 24 h with or without pretreatment with anti-TLR2 or anti-TLR4 monoclonal antibodies. IL-8 and IL-10 concentrations were measured in the cell-free culture supernatants by ELISA. The concentration of IL-8 (a) and IL-10 (b) induced by *H. pylori* in the absence of antibodies was considered to be 100%, and the corresponding induction in the presence of blocking antibodies was calculated referring to this value. The mean values \pm SD of four (a) or of two experiments (b) are shown.

Discussion

Type I *H. pylori* strains induce the release of IL-8 from epithelial cells, a chemokine that is involved in the massive infiltration of polymorphonuclears into the gastric submucosa of infected patients. Alteration of the gastric epithelium may allow the bacteria to come in contact with numerous phagocytes, such as neutrophils and macrophages. These phagocytes, especially neutrophils, are able to reach the

surface of epithelial cells, as demonstrated in previous studies (Noach *et al.*, 1994).

Neutrophil activation via TLR2 and TLR4 by a specific stimuli yields diverse results; *E. coli* lipopolysaccharide cause IL-8 and superoxide production (Kurt-Jones *et al.*, 2002), whereas highly purified lipoteichoic acid activates neutrophil granulocytes and delays their spontaneous apoptosis via CD14 and TLR2 (Power *et al.*, 2004). Lipopolysaccharide is an activator of neutrophils, causing mitogen-activated protein kinase activation and increased shedding of L-selectin, CD11b expression, respiratory burst and release of cytokines (Hayashi *et al.*, 2003; Sabroe *et al.*, 2003). Zymosan activates neutrophils via mechanisms that include TLRs but may also include CD11b/CD18, generation of an auto-crine platelet-activating factor and production of IL-8 (Au *et al.*, 1994).

The initial phases of the inflammatory response to *H. pylori* infection by the gastric mucosa are now beginning to be unravelled. Recent works had shown an important role of TLRs in the initial response to *Helicobacter* colonization (Kawahara *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2003; Su *et al.*, 2003; Mandell *et al.*, 2004). However, there is no consensus as to which TLR is the most important, or which cell type plays a major role in the cellular activation. In this work, the activation of human neutrophils in response to *H. pylori* challenge and the possible role of TLR2 and 4 in this response was studied.

It was found that human neutrophils secrete the proinflammatory cytokines IL-8, IL-1 β and TNF- α and the anti-inflammatory cytokine IL-10 in response to challenge with *H. pylori*. Several studies have identified gastric epithelial cells as a source of IL-8 production (Jung *et al.*, 1997); here, it is shown that neutrophils produce significant IL-8 in response to challenge with *H. pylori*. Previous studies have shown that IL-1 β is up-regulated in the presence of *H. pylori* and is important in initiating and amplifying the inflammatory response to this infection (Jung *et al.*, 1997); it is also a powerful inhibitor of gastric acid secretion (Beales & Calam, 1998). We also documented TNF- α production with a maximum level after 24 h of *H. pylori* infection, showing that its production is not as early as that observed for IL-8 and IL-1 β . It has also been documented that TNF- α play a protective role in *H. pylori* infection (Yamamoto *et al.*, 2004). On the other hand, *H. pylori* challenge did not induce the production of TNF-RI, which is consistent with a previous work reporting that there was no difference in the intensity or activity of gastritis in TNF-RI-deficient mice when they were compared with wild-type mice (Thalmaier *et al.*, 2002).

The kinetics of secretion varied among the different cytokines, with the proinflammatory cytokines, IL-8, IL-1 β and TNF- α , being produced earlier than the anti-inflammatory cytokine IL-10. The delayed response of IL-10 might suggest

an indirect induction mechanism, perhaps triggered by the proinflammatory microenvironment (Samarasinghe *et al.*, 2006). IL-10 is a potent anti-inflammatory and immunoregulatory cytokine that may counteract the proinflammatory response to *H. pylori* challenge. By down-regulating *H. pylori*-induced gastric inflammatory response, IL-10 apparently confers a survival advantage to *H. pylori*, allowing a more effective colonization of gastric mucosa (Chen *et al.*, 2001). These results would suggest a feedback-regulatory mechanism of activation in neutrophils and would also suggest an important role for neutrophils in the regulation of the inflammatory response to *H. pylori* infection, which has not been reported previously.

Although neutrophils express almost all known TLRs (Hayashi *et al.*, 2003), the role of TLR2 and TLR4 in the inflammatory response of these cells to *H. pylori* challenge is still unknown. *H. pylori* induces NF- κ B activity via TLR2 and TLR5 in human epithelial cells (Smith *et al.*, 2003) and via TLR4 in gastric pit cells (Kawahara *et al.*, 2001), resulting in the production of diverse cytokines. The results of the present study show that *H. pylori* up-regulate TLR2 and TLR4 in human neutrophils and also that the production of cytokines (IL-8 and IL-10) in response to *H. pylori* challenge was partially blocked by anti-TLR2 and anti-TLR4 antibodies. This suggests that neutrophil stimulation is partially dependent on TLR2 and TLR4 activation. It should be noticed, however, that in this study inhibition of IL-8 induction by anti-TLR2 was lower than that obtained with anti-TLR4, which suggests a more important role for TLR4 in the induction of IL-8. Regarding IL-10 induction, blocking experiments demonstrated a significant inhibition with both anti-TLR2 and anti-TLR4, suggesting that both TLR2 and TLR4 play an important role in the induction of this anti-inflammatory cytokine.

In conclusion, it was demonstrated that challenge of human neutrophils with *H. pylori* induced the production of proinflammatory cytokines IL-8, IL-1 β and TNF- α early after challenge and the production of anti-inflammatory cytokine IL-10 at later times. These kinetics of cytokines production suggest that the response of neutrophils against *H. pylori* includes an initial proinflammatory response, followed by an anti-inflammatory response. Importantly, the present results show that *H. pylori* up-regulate TLR2 and TLR4 expression and suggest that the IL-8 and IL-10 responses might be mediated via TLR2 and 4 activation.

Acknowledgements

The authors thank Dr Juan Burgueño for his excellent help in statistical analysis. This work was supported by the Coordinación de Investigación en Salud, IMSS, Mexico.

References

- Au BT, Williams TJ & Collins PD (1994) Zymosan-induced IL-8 release from human neutrophils involves activation via the CD11b/CD18 receptor and endogenous platelet-activating factor as an autocrine modulator. *J Immunol* **152**: 5411–5419.
- Beales IL & Calam J (1998) Interleukin 1 beta and tumour necrosis factor alpha inhibit acid secretion in cultured rabbit parietal cells by multiple pathways. *Gut* **42**: 227–234.
- Boyum A (1968) Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* **97**: 77–89.
- Camorlinga-Ponce M, Torres J, Perez-Perez G, Leal-Herrera Y, Gonzalez-Ortiz B, Madrazo de la G, Gomez A & Munoz O (1998) Validation of a serologic test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and the immune response to urease and CagA in children. *Am J Gastroenterol* **93**: 1264–1270.
- Chen W, Shu D & Chadwick VS (2001) *Helicobacter pylori* infection: mechanism of colonization and functional dyspepsia reduced colonization of gastric mucosa by *Helicobacter pylori* in mice deficient in interleukin-10. *J Gastroenterol Hepatol* **16**: 377–383.
- Crowe SE (2005) Helicobacter infection, chronic inflammation, and the development of malignancy. *Curr Opin Gastroenterol* **21**: 32–38.
- Eck M, Schmausser B, Scheller K, Toksoy A, Kraus M, Menzel T, Muller-Hermelink HK & Gillitzer R (2000) CXC chemokines Gro(alpha)/IL-8 and IP-10/MIG in *Helicobacter pylori* gastritis. *Clin Exp Immunol* **122**: 192–199.
- Gewirtz AT, Yu Y, Krishna US, Israel DA, Lyons SL & Peek RM Jr (2004) *Helicobacter pylori* flagellin evades Toll-like receptor 5-mediated innate immunity. *J Infect Dis* **189**: 1914–1920.
- Hayashi F, Means TK & Luster AD (2003) Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* **102**: 2660–2669.
- Jung HC, Kim JM, Song IS & Kim CY (1997) *Helicobacter pylori* induces an array of pro-inflammatory cytokines in human gastric epithelial cells: quantification of mRNA for interleukin-8, -1 alpha/beta, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, monocyte chemoattractant protein-1 and tumour necrosis factor-alpha. *J Gastroenterol Hepatol* **12**: 473–480.
- Kawahara T, Kuwano Y, Teshima-Kondo S, Kawai T, Nikawa T, Kishi K & Rokutan K (2001) Toll-like receptor 4 regulates gastric pit cell responses to *Helicobacter pylori* infection. *J Med Invest* **48**: 190–197.
- Kurt-Jones EA, Mandell L, Whitney C, Padgett A, Gosselin K, Newburger PE & Finberg RW (2002) Role of Toll-like receptor 2 (TLR2) in neutrophil activation: GM-CSF enhances TLR2 expression and TLR2-mediated interleukin 8 responses in neutrophils. *Blood* **100**: 1860–1868.
- Mandell L, Moran AP, Cocchiarella A, Houghton J, Taylor N, Fox JG, Wang TC & Kurt-Jones EA (2004) Intact gram-negative *Helicobacter pylori*, *Helicobacter felis*, and *Helicobacter hepaticus* bacteria activate innate immunity via Toll-like

- receptor 2 but not Toll-like receptor 4. *Infect Immun* **72**: 6446–6454.
- Noach LA, Rolf TM & Tytgat GN (1994) Electron microscopic study of association between *Helicobacter pylori* and gastric and duodenal mucosa. *J Clin Pathol* **47**: 699–704.
- Power CP, Wang JH, Manning B, Kell MR, Aherne NF, Wu QD & Redmond HP (2004) Bacterial lipoprotein delays apoptosis in human neutrophils through inhibition of caspase-3 activity: regulatory roles for CD14 and TLR-2. *J Immunol* **173**: 5229–5237.
- Sabroe I, Prince LR, Jones EC, Horsburgh MJ, Foster SJ, Vogel SN, Dower SK & Whyte MK (2003) Selective roles for Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span. *J Immunol* **170**: 5268–5275.
- Samarasinghe R, Tailor P, Tamura T, Kaisho T, Akira S & Ozato K (2006) Induction of an anti-inflammatory cytokine, IL-10, in dendritic cells after Toll-like receptor signaling. *J Interferon Cytokine Res* **26**: 893–900.
- Satin B, Del Giudice G, Della BV, Dusi S, Laudanna C, Tonello E, Kelleher D, Rappuoli R, Montecucco C & Rossi F (2000) The neutrophil-activating protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a protective antigen and a major virulence factor. *J Exp Med* **191**: 1467–1476.
- Schmausser B, Josenhans C, Endrich S, Suerbaum S, Sitaru C, Andrusis M, Brandlein S, Rieckmann P, Muller-Hermelink HK & Eck M (2004) Downregulation of CXCR1 and CXCR2 expression on human neutrophils by *Helicobacter pylori*: a new pathomechanism in *H. pylori* infection? *Infect Immun* **72**: 6773–6779.
- Shimizu T, Haruna H, Ohtsuka Y, Kaneko K, Gupta R & Yamashiro Y (2004) Cytokines in the gastric mucosa of children with *Helicobacter pylori* infection. *Acta Paediatr* **93**: 322–326.
- Smith MF Jr, Mitchell A, Li G, Ding S, Fitzmaurice AM, Ryan K, Crowe S & Goldberg JB (2003) Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells. *J Biol Chem* **278**: 32552–32560.
- Su B, Ceponis PJ, Lebel S, Huynh H & Sherman PM (2003) *Helicobacter pylori* activates Toll-like receptor 4 expression in gastrointestinal epithelial cells. *Infect Immun* **71**: 3496–3502.
- Takeda K & Akira S (2005) Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* **17**: 1–14.
- Thalmaier U, Lehn N, Pfeffer K, Stolte M, Vieth M & Schneider-Brachert W (2002) Role of tumor necrosis factor alpha in *Helicobacter pylori* gastritis in tumor necrosis factor receptor 1-deficient mice. *Infect Immun* **70**: 3149–3155.
- Yamamoto T, Kita M, Ohno T, Iwakura Y, Sekikawa K & Imanishi J (2004) Role of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in *Helicobacter pylori* infection. *Microbiol Immunol* **48**: 647–654.