



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

EL PAPEL DE LA INFLAMACIÓN DE BAJO GRADO EN EL SINDROME DE
INTESTINO IRRITABLE (SII)

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
MC. OSCAR ANDRÉS RODRÍGUEZ FANDIÑO

DIRECTOR DE TESIS:
DR. MAX J SCHMULSON WASSERMAN
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR:
DRA YOLANDA LOPEZ VIDAL
FACULTAD DE MEDICINA
DR. ANTONMARIA MINZONI ALESSIO
FACULTAD DE CIENCIAS

MÉXICO, D. F. JULIO DE 2014



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.

Dedicado a:

*A mi amada familia Helena, Laura Gabriela y María Camila,
luz en casa y brújula en el camino de la vida,
el motor que alimenta la constancia.*

"Lo que hay no son éxitos imposibles, sino personas inconstantes"

Napoleón Bonaparte

"La gota horada la piedra no por su fuerza, sino por su constancia"

Ovidio

AGRADECIMIENTOS

A México, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología **CONACyT** por el apoyo financiero durante la estancia de estudio (No. 336205); a la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, **DGAPA-UNAM**, por la financiación de la Tesis doctoral y al Hospital General de México O. D. por permitirme tener acceso a los pacientes y controles de la investigación. A todos gracias porque sin la sinergia de las actividades la culminación de las actividades no hubiese sido posible.

Un profundo agradecimiento a mi tutor Dr Max Schmulson, y comité tutorial: Dra Yolanda López Vidal y Dr Antonmaria Minzoni; a todos por su paciencia, direccionamiento y apoyo que permitieron mi construcción como persona desde diversos aspectos de formación académico y humano.

A Helena, Laura Gabriela y María Camila, quienes trabajaron para que lograra culminar ésta etapa tan importante y transformadora, con paciencia y amor; a ellas todo mi corazón.

A todos los investigadores del laboratorio HIPAM (Hígado, Páncreas y Motilidad Intestinal): Dra. Gabriela Gutiérrez, Dr Joselín Hernández, Dra Carolina Guzmán y Dr Galileo Escobedo, quienes además de ser guías en mi proceso, les agradezco la entrega de su invaluable amistad.

A aquellos que me brindaron su amistad: Adolfo, Gibrán, Christian, Dorothy, Zaira, Luz Marina, Norma, José Luis, Eduardo, Lenin, Nicanor, Lety, Hamzeh, Tirsa, Sonia, Gina, Marilyn, Osquitar, Claudia, Marcela, Francisco, Héctor entre muchas otras muy buenas personas.

A todos aquellos doctores que me brindaron su apoyo intelectual y moral, en especial a: Dr Juan Carlos López Alvarenga, Dr Gabriel Villegas, Dr Fabián Vargas y Dr Gonzalo Castillo.

Reconozco que dejo a muchas personas sin nombrar, sin cuya compañía mi experiencia hubiese sido muy diferente, a todos agradezco y recuerdo con afecto.

INDICE

1

i. RESUMEN.....	i
ii. ABSTRACT.....	ii

1

1. INTRODUCCION.....	1
1.1. GENERALIDADES	1
1.2. SUBGRUPOS DE SII DE ACUERDO AL HÁBITO INTESTINAL PREDOMINANTE	2
1.3. FISIOPATOLOGÍA DEL SII.....	2
1.4. LA RESPUESTA INMUNE INVOLUCRADA EN EL SII	2
1.4.1. Inflamación o Activación inmune de bajo grado en SII	2
1.4.2. Los receptores tipo Toll (TLRs) en el SII	3
1.4.3. Las citocinas y quimiocinas en el SII.....	5
1.4.4. Alteraciones en la microbiota	6
1.4.5. El estrés en el SII.....	7

2

2. HIPÓTESIS.....	9
-------------------	---

3

3. OBJETIVOS.....	9
3.1. OBJETIVO GENERAL	9
3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	9

4

4. MATERIALES Y METODOS.....	10
4.1. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS MONONUCLEARES (CMN).....	11

4.2. DESCONGELACIÓN DE LAS CMNs.....	11
4.3. FENOTIPOS CELULARES	12
4.3.1. Linfocitos T	12
4.3.2. Monocitos/Macrófagos	12
4.4. MEDICION DE CITOCINAS Y QUIMIOCINAS.....	13
4.5. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	13
4.6. ASPECTOS ÉTICOS	14

5

5. RESULTADOS	16
5.1. GENERALES.....	16
5.2. FENOTIPO DE LINFOCITOS T.	17
5.3. FENOTIPO DE MACRÓFAGOS	22
5.4. CITOCINAS Y QUIMIOCINAS	24
5.5. ESTRÉS Y EL PERFIL INMUNOLÓGICO.....	24

6

6. DISCUSIÓN.....	26
6.1. FENOTIPO DE LINFOCITOS T.	26
6.2. FENOTIPO DE MACRÓFAGOS	30
6.3. CONCENTRACIÓN DE CITOCINAS y QUIMIOCINAS	32

7

7. CONCLUSIONES	34
-----------------------	----

8

8. BIBLIOGRAFÍA.....	35
----------------------	----

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Diagramas de contorno e histograma representativos de los análisis de direccionamiento, residencia y activación en los linfocitos T. A) la figura ilustra todos los eventos de linfocitos (rojo). La caja superior-derecha enmarca el subgrupo $\alpha 4\beta 7 + CCR5 +$. En el segundo nivel se observa a las subpoblaciones B) CD4 (azul) y C) CD8 (magenta) y en el nivel inferior los histogramas de CD28 en D) CD4 y E) CD8. 15
- Figura 2.** Diagramas de contorno representativos de los análisis de M1/M2 en monocitos/macrófagos. A) Tamaño y complejidad total. B) Selección de la subpoblación CD14+; C) División de monocitos/macrófagos por su expresión de CD11c y CD206 y D) expresión del marcador CX3CR1 en los grupos (e.g. CD11c^{neg}CD206+) 15
- Figura 3.** Gráficos comparativos de edad y nivel de estrés percibido (escala de estrés percibido de Cohen) entre los pacientes con SII y los controles. Las líneas ilustran el promedio \pm EE. 16
- Figura 4. IMF de CCR5 en las células TCD4+ $\alpha 4\beta 7 +$ de los cultivos sin estímulo y estimuladas con LPS.** La intensidad media de fluorescencia del marcador de residencia fue similar entre SII y controles en el cultivo sin estímulo. Mientras que en la estimulación con LPS se observa una disminución en la expresión en pacientes vs controles 19
- Figura 5. IMF de CCR5 en las células TCD8+ $\alpha 4\beta 7 +$ de los cultivos sin estímulo y estimuladas con LPS.** La intensidad media de fluorescencia del marcador de residencia fue similar entre pacientes con SII en comparación con los controles. Mientras que posterior a la estimulación con LPS se observa una disminución en la expresión en los pacientes vs controles. 19
- Figura 6. Porcentaje de las subpoblaciones $\alpha 4\beta 7 + CCR5 +$ en los cultivos estimulados con LPS en SII y controles.** Los cultivos estimulados con LPS muestran un incremento en la proporción de CD8 que expresan el marcador de residencia a tejido CCR5 en SII, pero no en controles, no se observan diferencias para TCD3 o TCD4 entre pacientes con SII y controles. 19
- Figura 7. Porcentaje de las subpoblaciones de células T $\alpha 4\beta 7 + CCR5 +$ en cultivos estimulados con PGN en SII y controles.** Los cultivos estimulados con PGN presentaron porcentajes mayores de células TCD3 expresando el fenotipo de residencia en intestino CCR5 en SII en comparación con controles. No se observaron diferencias en TCD8 20
- Figura 8. Diferencia entre los porcentajes de células estimuladas con LPS y sin estímulo.** El estímulo con LPS para CD3 y CD8 incrementa el número de células en los pacientes en comparación con los controles, donde el estímulo parece sugerir reducción de las subpoblaciones 20
- Figura 9. IMF de CD28 en las células CD4+ $\alpha 4\beta 7 + CCR5 +$ en cultivos sin estímulo y estimulados con LPS en SII y controles.** El nivel de expresión del fenotipo de activación (CD28) fue similar entre pacientes con SII y controles en el tratamiento sin estímulo. Mientras que para la estimulación con LPS se observa una expresión reducida en los pacientes en comparación con los controles. 20
- Figura 10. IMF de CD11c en células CD14+ en cultivos sin estímulos y estimulados con LPS en SII y controles.** La expresión del receptor CD11c se ve significativamente disminuida en las 23

células cultivadas con LPS, tanto en los pacientes con SII como en los controles, pero no se observan diferencias entre SII vs controles.

Figura 11. Porcentajes de monocitos/macrófagos CD11c+CD206+CX3CR1+ estimuladas con LPS y sin estímulo. Se observa como los porcentajes de esta subpoblación son mayores en los cultivos sin estimular en los pacientes en comparación con los controles, pero tal diferencia no se evidencia en los cultivos estimulados. 23

Figura 12. IMF de CD11c en las células CD11c+CD206neg en cultivos sin estímulo y estimulados con LPS en SII y controles. El nivel de expresión del marcador CD11c en los macrófagos con fenotipo M1 fue mayor en las células no estimuladas de los controles en comparación con SII. 23

Figura 13. Análisis de la expresión de CX3CR1 dado por la resta IMF sin estímulo-IMF cultivo LPS. A partir de la operación se sugiere que la expresión de este receptor se ve incrementada en los pacientes en comparación con los controles, haciendo que parezca inverso el comportamiento entre los grupos para el receptor. 23

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características demográficas de los grupos estudiados. 17

Tabla 2. Porcentaje de células T posterior a la estimulación con ligandos de TLR entre pacientes y controles. 21

Tabla 3. Concentración de citocinas y quimiocinas provenientes de los sobrenadantes de los cultivos de CMNs estimuladas o no estimuladas con ligandos de TLR. 25

I. RESUMEN

El síndrome de intestino irritable (SII) es una enfermedad compleja, la cual se ha asociado con una activación inmune alterada, el incremento en la expresión de los TLRs, y el aumento en la difusión de moléculas bacterianas. A partir de lo anterior, se buscó relacionar los factores mencionados, al analizar el fenotipo en células T de: direccionamiento intestinal (integrina $\alpha 4\beta 7$), reclutamiento intestinal (CCR5) y activación (CD28) así como la producción de citocinas y quimiocinas, luego de un cultivo por 24 h en presencia de ligandos de TLR (lipopolisacáridos-LPS, peptidoglicano-PGN y CpG). También se analizó de la polarización de las células CD14⁺ (principalmente monocitos/macrófagos) en el fenotipo proinflamatorio M₁ (CD11c⁺CD206^{neg}) e inmunoregulador M₂ (CD11c^{neg}CD206⁺CX3CR1⁺) en un cultivo a 72 h de estimulación con LPS. Se estudió un total de 21 pacientes SII-Roma II y 19 controles. Las células mononucleares (CMNs) aisladas se cultivaron y estimularon para el estudio de sus fenotipos por medio de citometría de flujo. Adicionalmente, las citocinas y quimiocinas en los sobrenadantes fueron medidas por medio de BioPlex. Se observó en células T estimuladas con LPS que la expresión de CCR5 en las células CD4 no varió en comparación a las no estimuladas en SII, pero en los controles el estímulo produjo una reducción significativa de la expresión del receptor (IMF: 1590±126.9 vs. 2417±88.4, $p < 0.001$). La expresión del receptor en las células CD8 de pacientes con SII (IMF: 4382±287.9 vs 3373±235.2, $p = 0.007$) y en controles (4118±247.0 vs 2680±217.5, $p < 0.001$), mostró una reducción, siendo más significativa en los controles ($p = 0.048$). Adicionalmente, se observaron menores porcentajes en los controles en comparación con SII de las células CD8 $\alpha 4\beta 7 + CCR5 +$ (85.7±1.5 vs. 90.8±0.9%, $p = 0.006$) cultivadas con LPS y las células CD3 $\alpha 4\beta 7 + CCR5 +$ (40.0±1.7% vs. 51.2±1.6%, $p = 0.006$) cultivadas con PGN. Igualmente, en los cultivos con LPS se observó una reducción de la expresión de CD28 en las células CD4 $\alpha 4\beta 7 + CCR5 +$ en SII (IMF: 2337±47.2 vs. 1779±179.2, $p < 0.001$), pero no en los controles. Por otra parte, en las células CD14⁺ (principalmente monocitos/macrófagos) se observó una reducción en la expresión de CD11c en SII (12920 ± 949.2 vs 8766 ± 730.2, $p < 0.001$) y controles (13750 ± 743.1 vs 8233 ± 613.9, $p < 0.001$), pero al comparar entre pacientes y controles no se observaron diferencias. Adicionalmente, la expresión de CD11c en las células con fenotipo M₁ fue significativamente más baja en SII vs controles en los cultivos no estimulados (11540±537.5 vs 13860±893.7, $p = 0.04$). Así mismo, el porcentaje de la subpoblación CD11c⁺CD206⁺CX3CR1⁺ fue mayor en los pacientes al compararse con los controles (9.5±1.5 vs 4.9±1.4; $p = 0.022$). Finalmente, al analizar la expresión de CX3CR1 en las células con fenotipo M₂ no se observaron diferencias entre pacientes y controles, sin embargo, al ver las diferencias entre células estimuladas con LPS y sin estímulo, se sugiere una reducción del receptor de la fractalcina en SII a diferencia de los controles (-151.7±31.2 vs 71.13 ± 89.5; $p = 0.001$). Las concentraciones de citocinas y quimiocinas fueron similares, excepto para IL8/CXCL8 que resultó ser menor en la condición no estimulada de SII en comparación con los controles (4.18, 95%CI: 3.94-4.42 vs. 3.77, 3.59-3.95; $p = 0.006$). En conclusión, la estimulación con patrones moleculares asociados a patógenos de las células T periféricas que expresan el marcador de direccionamiento intestinal en SII vs controles resultó en una regulación negativa fallida de la coexpresión del fenotipo de reclutamiento intestinal así como un estado de activación. Adicionalmente, el fenotipo de monocitos/macrófagos sugiere un estado de maduración mayor en SII en células no estimuladas, pero una respuesta menor luego de la estimulación con LPS. Estos hallazgos apoyan la propuesta de una

interrelación entre una predisposición del sistema inmune innato y moléculas microbianas que pueden desencadenar o exacerbar el SII.

II. ABSTRACT

The Irritable Bowel Syndrome (IBS) is a complex disorder in which an altered immune activation, an increased expression of TLRs and an increased gut diffusion of bacterial molecules have been reported. In order to explore this condition in Mexican population we sought to relate these factors by analyzing gut homing (integrin $\alpha 4\beta 7$), intestinal recruiting (CCR5) and activation phenotype in peripheral blood lymphocytes and the cytokine and chemokine concentration after 24 hr of TLR ligands stimulation (Lipopolysaccharide-LPS, Peptidoglycan-PGN and CpG), and by analyzing M₁ pro-inflammatory polarization (CD11c⁺CD206^{neg}) and M₂ immuno-regulatory state (CD11c^{neg}CD206⁺CX3CR1⁺) of mainly monocytes/macrophages (CD14⁺) after 72 h of LPS stimulation. Twenty one IBS-Rome II patients and nineteen controls were studied. Isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients were cultured, stimulated and their phenotypes were investigated by flow cytometry. In addition, supernatant cytokines and chemokines were measured through BioPlex.

It was observed that after LPS lymphocytes stimulation, CCR5 expression in CD4-cells remained unchanged in IBS but decreased significantly in controls to lower levels than in IBS (MFI: 1590 \pm 126.9 vs. 2417 \pm 88.4, $p < 0.001$). Besides, in CD8 cells the CCR5 expression decreased both in IBS (MFI: 4382 \pm 287.9 vs 3373 \pm 235.2, $p = 0.007$) and controls (4118 \pm 247.0 vs 2680 \pm 217.5, $p < 0.001$), showing lower expression levels in controls vs IBS ($p = 0.048$). Also, there were lower CD8 $\alpha 4\beta 7$ +CCR5⁺ cells (85.7 \pm 1.5 vs. 90.8 \pm 0.9%, $p = 0.006$) after LPS and CD3 $\alpha 4\beta 7$ +CCR5⁺ (40.0 \pm 1.7% vs. 51.2 \pm 1.6%, $p = 0.006$) after PGN stimulation in controls. In addition, after LPS stimulation, CD28 was reduced in CD4 $\alpha 4\beta 7$ +CCR5⁺ in IBS (MFI: 2337 \pm 47.2 vs. 1779 \pm 179.2, $p < 0.001$), but not in controls.

On the other hand, in CD14⁺ cells (mainly monocytes/macrophages) after LPS stimulation a significant reduction of CD11c expression in IBS (12920 \pm 949.2 vs 8766 \pm 730.2, $p < 0.001$) and controls (13750 \pm 743.1 vs 8233 \pm 613.9, $p < 0.001$) was detected, but no differences between groups were observed. In addition, the expression of CD11c in M₁ phenotype monocytes/macrophages was significantly lower in IBS vs controls in unstimulated condition (11540 \pm 537.5 vs 13860 \pm 893.7, $p = 0.04$). Also, CD11c+CD206+CX3CR1⁺ cell percentage was higher in patients in comparison to controls (9.5 \pm 1.5 vs 4.9 \pm 1.4; $p = 0.022$). Finally, despite after analyzing the CX3CR1 expression in M₂ phenotype cells, there were no differences between IBS vs controls, when differences between unstimulated and LPS cultures were observed, the fractalkine receptor expression seems to be reduced in IBS M₂ cells and lightly upregulated in controls M₂ cells (-151.7 \pm 31.2 vs 71.13 \pm 89.5; $p = 0.001$).

Cytokines and chemokines were similar, except for lower IL8/CXCL8 in the unstimulated condition in IBS (4.18, 95%CI: 3.94-4.42 vs. 3.77, 3.59-3.95; $p = 0.006$).

In conclusion, the pathogen-associated molecular patterns stimulation of peripheral blood T cells expressing gut homing marker in IBS vs controls results in an unsuccessful down-regulation of the co-expression of intestinal recruiting phenotype and a state of activation. In addition, the monocytes/macrophages response suggests a more mature state in unstimulated IBS, but a lower response after LPS stimulation. These findings support an interaction between innate immune predisposition and microbial triggers, which may unleash or exacerbate IBS.

1. INTRODUCCION

1.1. GENERALIDADES

El síndrome de intestino irritable (SII) es considerado un trastorno crónico, cuyos órganos de origen son el intestino delgado distal y el colon. Se define como trastorno funcional intestinal que se caracteriza por la presencia de dolor o malestar abdominal (ej. distensión abdominal subjetiva) asociado con cambios en el hábito intestinal, es decir diarrea, estreñimiento o alternancia¹. Este síndrome es considerado uno de los más frecuentes en la atención médica primaria y en la consulta al gastroenterólogo, con una prevalencia mundial cercana al 10%². En México la prevalencia es del 16% en estudios poblacionales y hasta del 35% en voluntarios^{3,4}.

Por funcional se enmarca aquel trastorno que no presenta una alteración bioquímica o estructural para explicarlo. No obstante, en los últimos años han surgido evidencias demostrando progresivamente diversas alteraciones, como veremos más adelante. Debido a la ausencia de biomarcadores directos, el diagnóstico de SII se establece a partir de criterios clínicos que están basados en síntomas y la ausencia de indicadores de alarma como pérdida de peso, fiebre o sangrado intestinal¹. Estos criterios han evolucionado desde los iniciales Criterios de Manning hasta los más actuales Criterios de Roma III⁵.

La patogenia del SII es poco conocida y se han implicado diversos factores tales como aspectos psicológicos incluyendo ansiedad y depresión, somáticos como hipersensibilidad visceral, alteraciones de la motilidad gastrointestinal y alteraciones en la comunicación bidireccional en el eje cerebro intestino, incluyendo el sistema nervioso autónomo (SNA) y el sistema nervioso entérico (SNE)⁶. Recientemente, la participación de bacterias patógenas se ha vuelto importante en un subgrupo de pacientes que se denomina SII post-infeccioso (SII-PI)^{7,8}. Así mismo, a pesar de que no se ha podido describir una condición bioquímica o estructural para la totalidad de los pacientes con SII, estudios recientes reportan la presencia de mayor infiltración celular, en especial de linfocitos T y células cebadas en la mucosa intestinal⁹, así como un perfil de citocinas sutilmente diferente (con una tendencia inflamatoria) al hallado en controles¹⁰. A estas alteraciones inmunológicas que no modifican la histología del intestino se le ha denominado "inflamación de bajo grado" o más recientemente "activación inmune de bajo grado"^{11,12}. Es importante resaltar que estas alteraciones inmunológicas no se pueden determinar con estudios histopatológicos de rutina, por lo cual la biopsia colónica endoscópica no se puede utilizar como herramienta diagnóstica de rutina en el diagnóstico del SII. Aunque inicialmente se puso en evidencia esta inflamación de bajo grado en los pacientes con SII-PI, en la actualidad se ha

reportado en pacientes con SII sin el antecedente de infección gastrointestinal previa¹⁰. De forma concordante, en los últimos años se ha reportado en un subgrupo de pacientes con SII un aumento en la permeabilidad intestinal, posiblemente permitiendo un mayor contacto entre las células de la respuesta inmune y moléculas propias de la microbiota residente en el lumen intestinal¹³.

1.2. SUBGRUPOS DE SII DE ACUERDO AL HÁBITO INTESTINAL PREDOMINANTE

A través de los criterios de Roma II se clasifica a los pacientes de acuerdo con el hábito intestinal predominante, en aquellos con estreñimiento (SII-E), que se caracterizan por poseer evacuaciones duras o caprinas, SII con diarrea (SII-D) donde se presentan evacuaciones sueltas o líquidas y SII alternante (SII-A), que presenta ambas manifestaciones¹⁴. Los más recientes criterios de Roma III clasifican a los pacientes en SII-E, SII-D, mixto (más del 25% de las veces evacuaciones duras y más del 25% líquidas) y no clasificables SII-NC. Es de anotar que al momento del inicio del estudio actual, solo había sido traducido y validado para México el Cuestionario Modular de Roma II¹⁵.

1.3. FISIOPATOLOGÍA DEL SII

Se considera al SII como una enfermedad compleja y multidimensional, donde es de central importancia conocer los aspectos fisiopatológicos que subyacen a la enfermedad, los criterios diagnósticos y posibles biomarcadores¹⁶. En tiempo reciente, la participación de la respuesta inmune¹⁷, una microbiota alterada¹⁸ y el aumento de la permeabilidad de la mucosa¹³ han tomado una gran fuerza en la explicación de la enfermedad, al menos en una subpoblación de pacientes¹⁹.

1.4. LA RESPUESTA INMUNE INVOLUCRADA EN EL SII

1.4.1. Inflamación o Activación inmune de bajo grado en SII

Se acuñó el concepto de inflamación de bajo grado en el SII a partir del hallazgo de un leve incremento en el número de las células de la respuesta inmune observadas a partir de biopsias rectales, provenientes de pacientes con SII posterior a una gastroenteritis²⁰, aunque este aumento en el número de células de la respuesta inmune también se ha observado en pacientes sin un historial de gastroenteritis infecciosa^{9,21}. Dentro de los hallazgos, se reporta el aumento en el número de linfocitos intraepiteliales⁹, así como un incremento en el número de células cebadas que se encuentran activadas evidenciado en el porcentaje de células en degranulación²². No obstante, este patrón no ha sido reproducido por otros autores en los

mismos tipos de células de la respuesta inmune como es el caso de la comparación de células cebadas²³ u otros linfocitos²⁴ provenientes tanto de pacientes como de controles, donde incluso se han registrado valores con un patrón inverso, donde los pacientes presentan números menores en sus inmunocitos^{25,26}.

Asimismo, a partir de células mononucleares de sangre periférica (CMNs) se documentó que los linfocitos T y B de los pacientes presentaron un incremento en el porcentaje del marcador de direccionamiento a intestino (integrina $\alpha 4\beta 7$), en condiciones directas de sangre periférica y posterior a estimulación con LPS respectivamente^{12,27}. En los mismos estudios los autores proponen que los dos tipos de células de la respuesta inmune presentan un incremento en el porcentaje de células activadas (medido a partir de CD69 para células T y CD80/86 en linfocitos B) en los pacientes en comparación con los controles^{12,27}. No obstante, el diseño de los estudios anteriores no permite evidenciar si las células coexpresan los marcadores de direccionamiento y activación. Recientemente, otro grupo de investigación evaluó el fenotipo de direccionamiento a intestino delgado en las células T a partir de la coexpresión del receptor de integrina $\alpha 4\beta 7$ con el receptor de la quimiocina 9 (CCR9), en pacientes con enfermedades funcionales digestivas (dispepsia funcional y SII)²⁸, además aunque no se encontraron diferencias en los porcentajes de células de pacientes con SII y los controles, aunque si se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con dispepsia funcional y los controles²⁸.

Hasta hace poco tiempo no se habían reportado alteraciones en monocitos/macrófagos, ni ensayos *in vitro* en estas células en estudios de casos y controles, sin embargo, Öhman *et al.* (2012)¹⁹ registraron una expresión aumentada del receptor tipo-Toll 2 (TLR-2) en este tipo de células provenientes de pacientes con SII en comparación con controles. Aunque el papel de una inmunoregulación alterada es una hipótesis que ha cobrado fuerza en la propuesta inmunológica del SII, estas células no han sido estudiadas a nivel de colon, ni periférico en busca de su estado de activación, lo cual podría estar brindando una aproximación complementaria, debido a su participación en el mantenimiento de la inmunoregulación en el intestino²⁹.

1.4.2. Los receptores tipo Toll (TLRs) en el SII

Aunque se ha discutido que las células de la respuesta inmune sufren un proceso de activación en los pacientes con SII, el mecanismo no ha sido completamente descrito o explicado. En años recientes los grupos de investigación han enfocado sus análisis en la participación de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs por su sigla en inglés), principalmente debido a la asociación que presenta el SII con factores como: la infección por bacterias patogénicas en el SII-PI⁸, el uso de antibióticos como factor de riesgo y más recientemente como

tratamiento^{30,31}, las alteraciones en las poblaciones bacterianas en los pacientes con SII³² y finalmente la participación de una permeabilidad aumentada en los pacientes con SII³³. Los anteriores hallazgos permiten suponer una participación importante de las moléculas bacterianas en relación con las células de la respuesta inmune, lo que ha hecho que los grupos de investigación lleven a cabo estudios más detallados en los receptores que reconocen los patrones bacterianos, como son los TLRs y sus ligandos, los PAMPs aunque en estos últimos no se han estudiado otros receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) no se descarta su posible participación. En este sentido para el estudio de Liebregts *et al.* (2007)³⁴ se estimularon CMNs con lipopolisacáridos (LPS) de *E. coli* en cultivos celulares provenientes de pacientes y controles, con el fin de evaluar diferencias en la producción de las citocinas en el sobrenadante, tales como el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α), Interleucina (IL) -1 β e IL-6. En este estudio se encontró un aumento significativo en los pacientes con SII en la producción de las mencionadas citocinas a un nivel basal, aunque solo IL-6 mostró un aumento significativo en los pacientes posterior a la estimulación con el ligando de TLR 4 (LPS). En un modelo análogo en rata O'Mahony *et al.* (2009)³⁵ registraron un aumento de TNF α e IFN γ a partir de sangre completa estimulada con LPS, en comparación con controles. Posteriormente, McKernan *et al.* (2011)³⁶ estimularon CMNs con ligandos para diferentes TLRs, donde reportaron una concentración mayor en los pacientes en comparación con los controles a nivel basal de: IL-6 e IL-8, y en los sobrenadantes de: IL-8 en cultivo sin estímulo, TNF α en cultivo estimulado con el ligando de TLR 2 HKLM (*Listeria monocytogenes* muertas con calor), IL-8 en células estimuladas con el ligando de TLR3 poli I:C (ácido poli-inosínico/policidílico), IL-1 β y TNF α con estimulación por LPS (ligando de TLR 4), IL-8 al estimular con Imiquimod (ligando de TLR 7) y las cuatro citocinas anteriormente mencionadas al estimular con ssRNA40 (ligando de TLR 8). Adicionalmente, a partir del análisis del estado de activación en monocitos/macrófagos, se encontró un incremento en la expresión de TLR 2, así como de HLA-DR y CD86¹⁹.

A nivel de la mucosa del colon se observó en un modelo en rata similar a SII mediante estrés por separación materna, un aumento en la expresión de TLR 3, 4 y 5³⁷. Adicionalmente, al comparar ratas Wistar-Kyoto (genéticamente susceptibles al estrés) con ratas Sprague-Dawley (genéticamente no susceptibles) se registró un aumento de la expresión de TLR 3, 4, 5, 8 y 9³⁷. Recientemente, Brint *et al.* (2011)³⁸ reportaron un aumento en la expresión de TLR 4 y reducción de la expresión de TLR 7 y 8 en biopsias de pacientes con SII en comparación con los controles. Asimismo, Villani *et al.* (2010)³⁹, asociaron como factores de riesgo dos polimorfismos del TLR 9 (adicional a genes relacionados con la unión cerrada CDH 1, y la citocina proinflamatoria IL-6) con el desarrollo de SII-PI.

1.4.3. Las citocinas y quimiocinas en el SII

Las citocinas son proteínas de señalización intercelular producidas principalmente por células inmunológicas⁴⁰, considerados mediadores importantes en la inflamación intestinal⁴¹, donde algunas de ellas se han relacionado directamente con la patogénesis del SII, como son las citocinas proinflamatorias (IL1 β , 2, 6, 12, 17, 18, 23 y TNF α) e inmunorreguladoras (IL4, 10 y 13)^{34,42}.

A partir de cultivos de células mononucleares (CMNs) de sangre periférica sin estimular, se encontró en pacientes con SII en comparación con controles un desbalance en la relación IL-10/IL-12, con un valor inferior en los pacientes⁴² y una mayor producción de TNF α , IL-1 β e IL-6^{34,43}. Asimismo, a partir de estudios con mucosa de colon se puso en evidencia una reducción en la producción de citocinas inmunorreguladoras y un aumento en las proinflamatorias¹⁰. A partir de las anteriores evidencias se ha sugerido que en SII, las diferentes citocinas pueden estar participando en el desarrollo de alteraciones motoras, dolor visceral y síntomas como lo sugieren Kraneveld *et al.* (2008)⁴⁴, donde enuncian que estas citocinas son producidas por células cebadas, macrófagos, células gliales y linfocitos en proximidad con nervios aferentes primarios no adrenérgicos no colinérgicos (NANC) de la mucosa intestinal, aunque los mecanismos aún están por conocerse. Adicionalmente, se reportó que el subtipo de SII también puede ser un importante factor asociado en la comunicación dada por citocinas en el desarrollo y sensación de dolor⁴⁵.

Por su parte, desde la perspectiva genética se ha reportado una disminución del polimorfismo alto productor de IL-10⁴⁶ y un aumento del alto productor de TNF α ⁴⁷ en pacientes con SII al compararlo con los controles, sugiriendo una susceptibilidad genética proinflamatoria. Para México, se ha encontrado una menor frecuencia del polimorfismo alto productor de IL-10 al comparar mujeres con SII con mujeres controles y hombres con o sin SII^{4,48,49}. Recientemente Romero-Valdovinos *et al.* (2012)⁵⁰ estudiaron los polimorfismos de IL8 e IL10 y encontraron incremento de los polimorfismos IL-8+396 (donde sugieren una condición recesiva del gen G/G), IL-8+781, y el polimorfismo IL-10 -1082 en los pacientes de SII.

No obstante, las asociaciones de los polimorfismos de las citocinas no suelen evaluarse de manera conjunta con su expresión en sangre periférica o en el tejido, y los resultados de la expresión de las citocinas están en constante debate, en especial luego de que los estudios seleccionaron pacientes no PI²⁴. Schmulson *et al.* (2012)⁵¹ evaluaron las concentraciones séricas de IL-10 y TNF α , encontrando diferencias significativas en ambas citocinas, sin embargo, al

controlar estos hallazgos por índice de masa corporal (IMC) se observó como el efecto del TNF α se pierde.

1.4.4. Alteraciones en la microbiota

La participación de la microbiota y sus alteraciones posee una importancia central en la generación o exacerbación del SII. Dentro de las posibles alteraciones, la relación entre padecer una gastroenteritis bacteriana aguda y posteriormente desarrollar SII, evento conocido como SII-PI, involucra cerca de 6-17% en otras regiones del mundo⁷. En el caso particular de México, el porcentaje es ligeramente menor al límite inferior, con un 5.8%⁵². En los sujetos con SII PI se ha identificado un aumento en el número de linfocitos T, así como células enteroendocrinas en biopsias de recto⁵³. Así mismo, se observó a partir de biopsias de pacientes recuperados de enteritis infecciosa un aumento en la expresión de IL-1 β en aquellos individuos que desarrollaron SII en comparación con aquellos que no^{54,55}. Para este estado de activación inmune (considerada según algunos autores de bajo grado), ciertos grupos de investigación sugieren una predisposición genética a producir menores niveles de la citocina inmunoreguladora IL-10⁴⁶, y más recientemente se han propuesto como determinantes genéticos potenciales, genes que codifican para proteínas de la respuesta inmune (TLR9, IL-6) y la permeabilidad intestinal (CDH1)³⁹.

En la actualidad no se conoce la razón por la cual algunos sujetos desarrollan el SII posterior a una infección entérica y otros no, aunque se han implicado factores psicológicos o anormalidades en la mucosa⁵⁶. Diversos estudios han reportado que una mayor duración de la diarrea inicial⁵⁷, presencia de hipocondriasis⁵⁸ y el género femenino⁵⁹, pueden predecir el SII-PI. Así mismo, la infección por *Campylobacter* o *Shigella*, tienen más probabilidad de desencadenar SII que las infecciones por *Salmonella* o virales⁶⁰. Ante estos hallazgos se ha sugerido que la exposición a diversos microorganismos en etapas tempranas de la vida disminuye el riesgo a desarrollar SII, al incrementar la tolerancia⁶¹.

Sin embargo, la compleja microbiota puede verse alterada por muchas condiciones, no solo la presencia de un patógeno. La primera condición estudiada en el SII fue el sobrecrecimiento intestinal bacteriano o SIBO, aunque con resultados dispares^{62,63}, probablemente por el método utilizado (la medición en aliento) ya que aunque es considerado válido para SII⁶⁴, presenta en la actualidad un gran debate⁶⁵.

Es claro que la microbiota está lejos de ser un ensamblaje sencillo, alcanzando valores muy altos de diversidad⁶⁶ y densidad poblacional en el colon⁶⁷, donde se interrelacionan múltiples comunidades de especies que hasta hace muy poco tiempo hacen parte de la concepción de

salud y enfermedad^{68,69}. El microbioma del colon tiene sus peculiaridades para aquellos con SII en comparación con los controles sanos³², sin embargo, se encuentran algunos hallazgos específicos y variaciones entre los estudios, principalmente debido a las poblaciones de estudio, tipo de muestreo y tipo de estudio. En general se observan incrementos o reducciones en las poblaciones bacterianas, en especial para los géneros *Lactobacillus*^{70,71}, *Bifidobacterium*⁷² o *Veillonella*^{70,71}. Estas alteraciones vienen acompañadas de una baja en la estabilidad temporal⁷³, como se observa en otras escalas en ecosistemas complejos⁷⁴ y una reducida capacidad de respuesta ante especies invasoras⁷⁵. Recientemente, Jeffery *et al.*⁷⁶ evaluaron los subgrupos de SII, encontrando que aunque algunos pacientes se comportan de forma similar a los controles, en otros individuos se registran incrementos en los taxones asociados a Firmicutes y una reducción o pérdida de los taxones de Bacteroidetes.

Finalmente, el uso de probióticos ha generado una plétora de evidencias en diversas enfermedades cuya explicación ha sido principalmente inmunomoduladora⁷⁷. Aunque las evidencias en SII involucran mejoras clínicas a nivel de síntomas globales, dolor abdominal y flatulencias (revisado en Whelan & Quigley⁷⁸), las respuestas individuales a nivel de cepa bacteriana deberían ser analizadas individualmente y con cuidado⁷⁸.

1.4.5. El estrés en el SII

Se ha considerado que el estrés puede tener dos formas, exteroceptivo e interoceptivo⁷⁹. El primero hace referencia al estrés percibido o psicológico y el segundo a alteraciones de la homeostasis que puede ser desencadenada por eventos inducidos tales como una infección gastrointestinal o una enfermedad orgánica. Es de anotar que ambos tipos de estrés han sido relacionados con el SII^{80,81}. Para la evaluación del estrés interoceptivo se cuenta con la escala de estrés percibido⁸², que mide el grado en el cual los individuos evalúan las situaciones en su vida como estresantes (cuestionario de estrés de Cohen validado para español México^{83,84}).

Los mecanismos intrínsecos acarreados por el estrés en el SII no son claros, no obstante, algunos grupos de investigación dan a las células cebadas el papel de mediador entre el estrés, el SNC, SNE y la respuesta inmune del organismo. Un ejemplo de ello es la degranulación de las células cebadas y la liberación de mediadores parácrinos como la histamina bajo estímulos como el estrés (tanto psicosocial como físico)⁸⁵. En este sentido, se considera que la liberación de mediadores quimiotácticos para leucocitos puede estar colaborando en el desarrollo de una "inflamación de bajo grado"⁸⁶. Otros señalizan directamente sobre el SNE activando un "programa de alarma" que aumenta la motilidad y secreción coordinada desencadenando síntomas como la diarrea y el dolor abdominal, similar a lo que ocurre en la degranulación de

células cebadas por alergias alimentarias o por enteritis infecciosas para expulsar los antígenos del intestino⁸⁷. Es de resaltar los hallazgos obtenidos por Barbara *et al.*²² donde se correlacionaron la presencia de células cebadas activadas, su proximidad con las neuronas del SNE y la severidad y frecuencia del dolor abdominal, sugiriendo un papel desencadenante y/o propiciador del mantenimiento del síntoma pivote del SII.

2. HIPÓTESIS

A partir de los hallazgos obtenidos por los diferentes grupos de investigación, esperamos que los pacientes con SII presenten una respuesta inmune alterada, con un perfil de activación mayor en Linfocitos T y monocitos/macrófagos de pacientes en comparación con los individuos control ante la estimulación con ligandos de TLRs (LPS, PGN y CpG). Los estados de activación se presentarán en correlación con el estado de estrés percibido de los individuos incluidos en el estudio.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la interrelación entre el fenotipo de los linfocitos y monocitos/macrófagos de pacientes con SII y de controles con la producción de citocinas y quimiocinas resultado de la activación con ligandos de TLRs en las CMNs y con las condiciones de estrés percibido y SII-PI.

3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Analizar el fenotipo de direccionamiento intestinal, residencia y activación de linfocitos T en cultivos de CMNs estimulados con ligandos de TLR (PGN – TLR2; LPS – TLR4 y CpG – TLR9) en pacientes con SII en comparación con controles.
- Evaluar el fenotipo de los monocitos/macrófagos en cultivo de CMNs estimulados con ligandos de TLRs entre los pacientes con SII y controles.
- Evaluar la expresión de las citocinas $TNF\alpha$, $IL1\beta$ e $IL10$ y las quimiocinas CCL5 y $IL8/CXCL8$ a partir de CMNs estimuladas con ligandos de TLR en pacientes con SII y controles.
- Evaluar la correlación entre el estrés percibido en los pacientes y controles con los fenotipos celulares y la producción de citocinas y quimiocinas en los cultivos de CMNs.

4. MATERIALES Y METODOS

Se incluyeron pacientes de la consulta de Coloproctología del Hospital General de México O.D. "Eduardo Liceaga" (HGM). Una vez firmado el consentimiento informado, todos contestaron el Cuestionario Modular de Roma II en Español – México para trastornos funcionales gastrointestinales⁴ con el objeto de determinar el diagnóstico de SII y establecer a cual subgrupo de SII pertenecen (sean estos predominancia de Estreñimiento, Diarrea o Alternante/Mixto: SII-E, SII-D y SII-A/M respectivamente). En caso de no dar diagnóstico positivo a SII, se catalogaron como controles. Adicionalmente, en los pacientes con diagnóstico positivo para SII, se les aplicó el cuestionario de SII-PI⁵³. Posteriormente, los pacientes y controles contestaron las preguntas de la Escala de Estrés Percibido^{83,84}.

Los pacientes que asistieron al Servicio de Coloproctología del HGM, fueron con una preparación de limpieza del colon distal (enema fleet) ya que de rutina en esta consulta se somete a los pacientes a una rectosigmoidoscopia rígida. Se incluyeron aquellos que presentaron un examen endoscópico sin patología visible (rectosigmoidoscopia normal), a los que se les recolectó muestra de sangre periférica (20 mL) en tubos vacutainer con EDTA y que además se les tomaron 2 biopsias a los 10 cms distales (recto) con pinza estándar para análisis posteriores. Los individuos incluidos en el estudio presentan los siguientes criterios:

Criterios de Inclusión

1. Edad mayor de 18 años y menor de 60 años.
2. Que hayan firmado el Consentimiento Informado.
3. Que hayan contestado el Cuestionario de Roma II: Diagnóstico de SII o negativos para SII (Control).
4. Que hayan contestado el Cuestionario de SII-PI y el Cuestionario de Estrés Percibido.
5. Que hayan sido sometidos a Rectosigmoidoscopia como parte de su consulta de Coloproctología y que se les haya podido recolectar 20 mL de sangre periférica (para un estudio a posterior adicionalmente la toma de 2 biopsias de mucosa colónica).

Criterios de Exclusión

1. Que no hayan firmado el Consentimiento Informado.
2. Que no hayan contestado alguno de los 3 Cuestionarios.
3. Que no hayan sido sometidos a Rectosigmoidoscopia.
4. Que en la Rectosigmoidoscopia se encuentre alguna enfermedad inflamatoria visible endoscópicamente como Colitis Ulcerativa Crónica Idiopática (CUCI), Enfermedad de Crohn,

Colitis Infecciosa o Colitis Endoscópica de cualquier tipo, Abscesos rectales o cualquier otro proceso supurativo.

5. Que tuvieran contraindicación para toma de biopsias por estar en tratamiento con anticoagulantes o antiagregantes plaquetarios.
6. Que los pacientes o controles estuvieran tomando (o en los pasados 3 meses) medicamentos con agentes procinéticos o inmunosupresores.

4.1. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS MONONUCLEARES (CMN)

Se obtuvieron las CMNs a partir de centrifugación diferencial de la sangre en ficoll/hypaque para su posterior cultivo en medio RPMI suplementado con suero fetal bovino (SFB) por 24 horas a una concentración de 2×10^6 células/mL. Los números de células se determinaron individualmente a partir de conteos en cámara de Neubauer con tinción de azul tripano para la medición de su viabilidad. Los cultivos se hicieron a 37°C y 5% CO₂.

Las células se cultivaron en placas de 24 pozos (Corning®) por 24 y 72 hrs con el cultivo sin estímulo (SE) y con concentraciones de 50 ng/mL de LPS de *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO); 1µg/mL de peptidoglicano de *Staphylococcus aureus* (PGN), (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO) y 6.5 µg/mL de oligodeoxinucleótidos sintéticos de Citocina-fosfato-Guanina Hu/Ms CpG-C (CpG), (Hycult Biotech, Uden, Países Bajos).

Posterior al periodo de cultivo, las células fueron cosechadas por enfriamiento en hielo por 10 min y un suave reflujó para la separación de las células del sobrenadante por centrifugación. Las CMNs se almacenaron en una suspensión de 0.3 mL de medio de cultivo complementado y 10% dimetilsulfóxido (DMSO) a -80°C para su posterior análisis. Igualmente los sobrenadantes fueron preservados a -80°C para la posterior medición de las citocinas y quimiocinas.

4.2. DESCONGELACIÓN DE LAS CMNS

Los viales preservados a -80°C fueron descongelados usando una modificación de la técnica descrita por Disis *et al.* 2006⁸⁸ y Germann *et al.* 2011⁸⁹. En resumen, las muestras fueron rápidamente descongeladas en baño de agua caliente (37°C) hasta que se observaba un hielo pequeño nadando en el medio. Inmediatamente las muestras se diluyeron en PBS filtrado (en una relación 1:10 de volumen) en dos pasos, adición de 1 mL y luego se completó el volumen en 9 mL, para ser centrifugadas a 2000 rpm por 5 min y resuspendidas en 50 µL de PBS, para su posterior marcaje. Es de resaltar que el número y viabilidad de las células que se obtiene (como

se menciona en los artículos originales) en el proceso de descongelación depende en gran medida de la rapidez con que se logre el procedimiento.

4.3. FENOTIPOS CELULARES

4.3.1. Linfocitos T

Se marcaron las células con el fin de medir el estado de direccionamiento intestinal, residencia y activación de las subpoblaciones de linfocitos T. En este sentido se seleccionaron los siguientes marcadores:

1. subpoblaciones de linfocitos T: anti-**CD3**-APC-Cy7; Anti-**CD4**-PE-Cy7; Anti-**CD8**-PE-Cy5
2. Fenotipo funcional: anti-**integrina $\beta 7$** -PE; Anti-**CCR5**-APC and Anti-**CD28**-FITC

Las células se dejaron incubar con los 6 marcadores un periodo de 15 min, para luego ser fijados en 1% de paraformaldehído. Las células fijadas se preservaron a 4°C hasta su lectura, el mismo día de su descongelación. El procedimiento de citometría de flujo se desarrolló en un citómetro BD FACSanto II (BD Pharmigen, San José, CA).

Un número mínimo de 100.000 linfocitos fue analizado para cada muestra, donde inicialmente el grupo se definió a partir de la complejidad y el tamaño "forward vs side scatter", para luego su caracterización entre las diferentes subpoblaciones (Figura 1). Los datos de intensidad media de fluorescencia (IMF) y porcentajes celulares fueron analizados con el uso del software FACSDiva 6.0 (BD Biosciences, San José, CA)

4.3.2. Monocitos/Macrófagos

El procesamiento de los monocitos/macrófagos fue igual al de los linfocitos en los procesos de descongelación, marcaje, preservación, lectura y análisis. No obstante, los marcadores celulares presentan diferencias propias del tipo celular. La elección del grupo fue inicialmente planteada por tamaño y complejidad, sin embargo para tener una mayor precisión, la selección del grupo (conteo mínimo de 10.000 células) se basó en la presencia del marcador CD14, presente en los monocitos (Figura 2). A los monocitos/macrófagos se les hizo un marcaje para determinar si presentaban un sesgo M1/M2⁹⁰ a partir de los siguientes marcadores:

1. M1: CD11c
2. M2: receptor de manosa (CD206)

Se midió el receptor de fractalcina (CX3CR1) en la superficie de los monocitos/macrófagos, debido a que se ha relacionado la presencia de este receptor con un estado de recuperación del

tejido o inmunoregulación en tejidos como el hígado⁹¹, y recientemente se ha reportado una subpoblación de monocitos específica de CX3CR1^{hi} encargada del transporte de bacterias del lumen intestinal a los nódulos linfáticos mesentéricos (NLM), y en la generación de una respuesta de IgA posterior a alteraciones en la microbiota debida al uso de antibióticos⁹².

Los anticuerpos fueron: 1.) TruStainFcx™: Receptor Fc; 2.) antiCD45-FITC; 3.) antiCD14-PE-Cy-7; 4.) antiCD11c-PE-Cy-5; 5.) antiCD206-APC-Cy-7 y 6.) antiCX3CR1-Alexa Fluor 647.

Es de aclarar que no era el objetivo del estudio evidenciar el fenotipo del monocito/macrófago aislado, por lo que las células no sufrieron el tratamiento convencional de maduración a macrófago (factor estimulador de colonias de macrófagos: M-CSF)^{93,94} y al igual que los resultados con linfocitos, en los cultivos conviven las CMN.

4.4. MEDICION DE CITOCINAS Y QUIMIOCINAS

Los sobrenadantes de los cultivos se preservaron a -80°C hasta su medición. De 50 µL de sobrenadante (cultivos de 24 hrs) se cuantificó la concentración de TNF α , IL-1 β , IL-10, IL-17, IL-8/CXCL8, ligando-5 de la quimiocina tipo C-C (CCL5), proteína quimiotáctica de los monocitos 1 (MCP1) y las proteínas inflamatorias del macrófago 1 alfa (MIP1 α) y 1 beta (MIP1 β). Las mediciones se llevaron a cabo por un ensayo Bio-Plex (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) de acuerdo con las instrucciones de fábrica. El manejo de los datos se realizó con Bio-Plex Manager software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) para luego ser exportado a Excel. La lectura de las placas se realizó con una curva estándar de 8 puntos, con las muestras de 50 µL en duplicado. Las medidas repetidas fueron realizadas en cada placa para determinar la consistencia del ensayo. Las mediciones de variación intra e inter ensayo fueron realizadas.

4.5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

El primer paso del análisis fue el cálculo del tamaño de la muestra, obtenido a partir del estudio de Liebrechts *et al.*²⁸ donde se hizo un estudio por citometría de flujo de los marcadores direccionamiento (CCR9) y residencia intestinal (α 4 β 7) en linfocitos T en sangre completa, comparando pacientes con dispepsia funcional y controles (5.6 \pm 3.5% vs. 1.6 \pm 1.0%), lo que resulta en la comparación de mínimo dos grupos de 18 individuos para poder obtener un poder estadístico de 90%. Este cálculo de tamaño de muestra se obtuvo a partir del software libre Epidat 3.1 (OPS/OMS, Coruña, España, 2006). No obstante, el análisis de cálculo de tamaño de muestra presenta serios limitantes, en especial debido a la idoneidad de un estudio sobre el cual

basarse. Por lo anterior, se llevó a cabo un análisis *post hoc* para evaluar el poder estadístico de la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para la comparación de medias independientes obtenidas entre los pacientes con SII y los controles (con el uso del software libre G*power 3.1.5. Institut für Experimentelle Psychologie, Christian-Albrechts-Universität, Kiel, Alemania), encontrando un poder superior a 0.99 en aquellas comparaciones donde se observaron diferencias estadísticamente significativas.

Las variables continuas se expresan como media \pm DE (desviación estándar). Los resultados provenientes de los análisis de citometría de flujo de las CMNs fueron comparados entre pacientes y controles a partir de la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para muestras independientes. Por su parte, debido a que la distribución de los datos de la concentración de citocinas y quimiocinas presentaron una distribución log-normal, fueron normalizados a logaritmo (log) para su comparación por medio de un análisis de varianza ortogonal, pero los datos se registran en su escala original. Se buscaron correlaciones entre las diferentes variables a partir del coeficiente de correlación de Pearson, en especial buscando asociaciones entre las medidas inmunológicas y de activación celular en relación con el estrés percibido de los individuos. Se consideró un valor de $p < 0.05$ como significativo. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software SPSS v.17.0, SPSS. México.

4.6. ASPECTOS ÉTICOS

El protocolo de investigación fue aprobado por la Comisión de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), al igual que por los comités de Investigación y Ética del Hospital General de México O.C.. A todos los participantes del estudio se les explicó claramente las actividades y derechos antes de una firma libre del consentimiento informado.

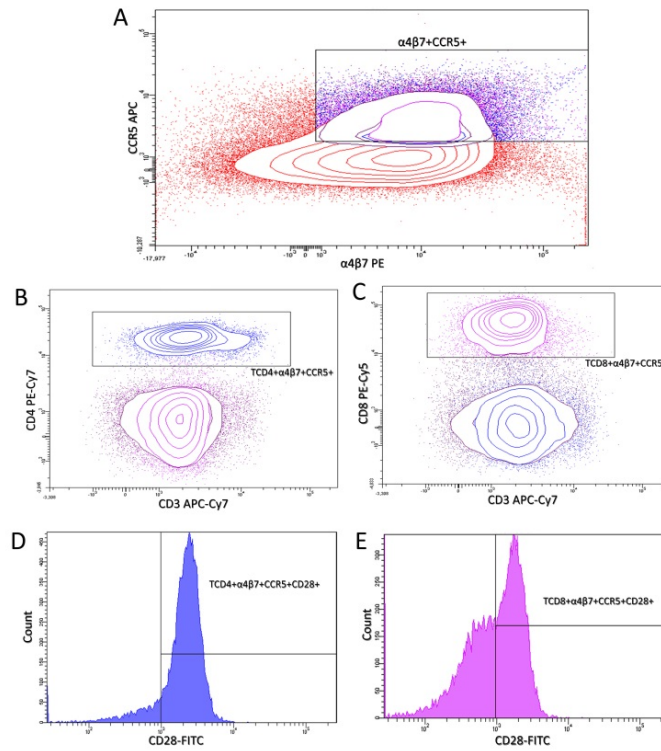


Figura 1. Diagramas de contorno e histograma representativos de los análisis de direccionamiento, residencia y activación en los linfocitos T. A) la figura ilustra todos los eventos de linfocitos (rojo). La caja superior-derecha enmarca el subgrupo $\alpha 4\beta 7 + CCR5 +$. En el segundo nivel se observa a las subpoblaciones B) CD4 (azul) y C) CD8 (magenta) y en el nivel inferior los histogramas de CD28 en D) CD4 y E) CD8.

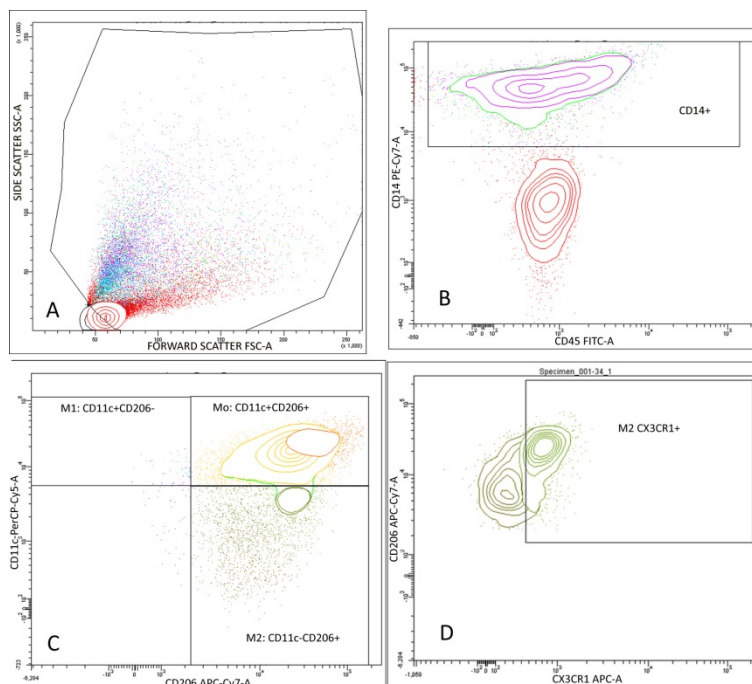


Figura 2. Diagramas de contorno representativos de los análisis de M1/M2 en monocitos/macrófagos. A) Tamaño y complejidad total. B) Selección de la subpoblación CD14+; C) División de monocitos/macrófagos por su expresión de CD11c y CD206 y D) expresión del marcador CX3CR1 en los grupos (e.g. CD11c^{neg}CD206+)

5. RESULTADOS

5.1. GENERALES

Los individuos incluidos en el estudio fueron reclutados en el periodo de mayo a octubre de 2011. Los pacientes llegaron a la consulta en la unidad de coloproctología principalmente al reportar síntomas de SII (33%), estreñimiento (8%) o para un seguimiento o control de consultas previas, entre ellas historial de enfermedad hemorroidal (23%), sangrado intestinal, fistula anal no relacionada con EII (8% cada uno), prurito anal, colgajo cutáneo (5% cada uno).

Así mismo, es necesario resaltar que aquellos individuos que presentaron síntomas diferentes a los dados por SII o estreñimiento, no presentaron síntomas o actividad de la enfermedad para el periodo de la consulta.

A partir de lo anterior, 21 pacientes cumplieron con los criterios dados por Roma II mientras que 19 individuos fueron categorizados como controles, posterior a la implementación de la encuesta. En la Tabla 1 se describen las características generales de los grupos. Los grupos de pacientes con SII y los controles no presentaron diferencias significativas en su distribución de edad y género (Figura 3). Cerca de la mitad de los pacientes fue clasificado como SII-A/M (48%), mientras que la otra mitad fue distribuida en SII-E (38%) y SII-D (14%). Únicamente un paciente fue categorizado como SII-PI.

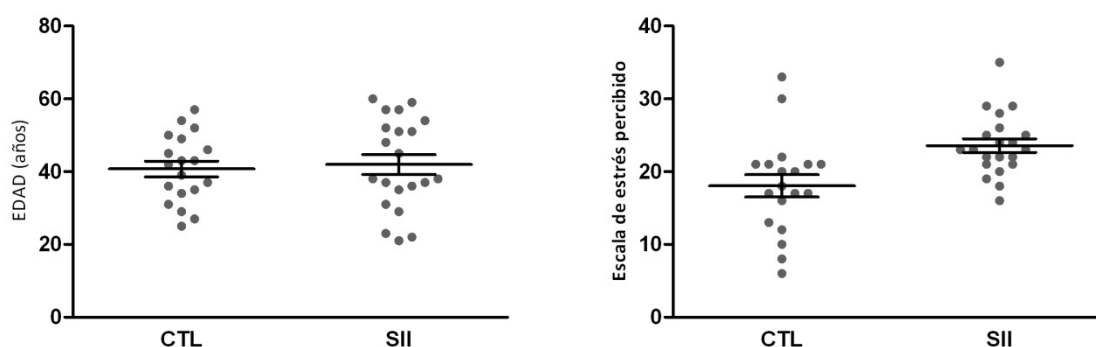


Figura 3. Gráficos comparativos de edad y nivel de estrés percibido (escala de estrés percibido de Cohen) entre los pacientes con SII y los controles. Las líneas ilustran el promedio \pm EE.

Posterior a la implementación de la encuesta de Estrés Percibido de Cohen, se observó cómo los pacientes con SII presentan un estado de estrés psicológico significativamente mayor al observado en los controles (Figura 3).

Tabla 1. Características demográficas de los grupos estudiados.

		SII N=21	Controles N=19	P
Género	N: Mujer/Hombre	16/5	13/6	0.733
Edad	Años±DS	41.9 ± 12.3	40.7 ± 9.8	
Subtipo de SII	N: E/D/A*	8/3/10		
SII-PI	N: +/-	1/20		
Estrés Percibido		23.6 ± 4.7	18.0 ± 6.7	0.001

*E: Estreñimiento(SII-E), D: Diarrea (SII-D), A: Alternante/Mixto (SII-M/A).

5.2. FENOTIPO DE LINFOCITOS T.

Se midió una selección de marcadores de superficie para estudiar el fenotipo de los linfocitos T. Entre ellos el primer acercamiento fue a través del análisis del nivel de expresión del marcador de direccionamiento intestinal, integrina $\alpha 4\beta 7$, el cual no presentó diferencias estadísticamente significativas en los diferentes niveles de estudio (tratamientos: Sin estímulo, o estimulación por ligandos de TLR; subpoblaciones de linfocitos: CD3, CD4 o CD8).

De igual manera, al comparar a los pacientes con SII con los controles no se observaron diferencias estadísticamente significativas para los porcentajes de células que expresan este marcador de superficie (Tabla 2).

Como se comentó previamente, en el estudio se profundizó en el análisis fenotípico mediante la evaluación del nivel de expresión de moléculas relacionadas con la residencia en tejido (CCR5) o la activación celular (CD28) co-expresadas en las células T con direccionamiento intestinal (Figura 1). A pesar de que bajo estas condiciones no se encontraron diferencias significativas en los fenotipos de las subpoblaciones de células cultivadas sin estímulo entre los grupos de pacientes con SII y controles, el patrón de comportamiento varió de forma clara posterior a la estimulación con algunos ligandos de TLR (cada ligando usado desencadenó una respuesta específica), en especial posteriormente a la estimulación con LPS. En este respecto, la expresión de CCR5 en las células T CD4 $\alpha 4\beta 7+$ permaneció sin cambio en los pacientes con SII (IMF: 2397 ± 72.41 vs 2417 ± 88.4 , $p=0.780$), mientras que se redujo significativamente en los controles (IMF: 2293 ± 214.2 vs 1590 ± 126.9 , $p=0.002$), desembocando en una expresión inferior a la vista en pacientes (Figura 4). Por su parte, la expresión de CCR5 en las células T CD8 $\alpha 4\beta 7+$ se

redujo en ambos grupos, tanto en las células provenientes de pacientes con SII (IMF: 4382 ± 287.9 vs 3373 ± 235.2 , $p=0.007$), como en aquellas provenientes de controles (IMF: 4118 ± 247.0 vs 2680 ± 217.5 , $p<0.001$). Esta condición fue considerablemente mayor en los controles, por lo cual al comparar la expresión entre SII y controles estimulados, fue significativamente menor en los controles que en SII ($p=0.048$) (Figura 5).

Por otra parte, al cuantificar el porcentaje de células T que expresan el receptor CCR5 en los cultivos no estimulados, se observaron resultados similares entre pacientes con SII y controles. Sin embargo, el porcentaje celular luego de estimulación con ligandos de TLR se encontró significativamente elevado en algunas subpoblaciones de linfocitos provenientes de cultivos de pacientes con SII en comparación con aquellos de controles para las células: células T CD8 cultivadas en estimulación con LPS (90.8 ± 0.9 vs. $85.7 \pm 1.5\%$, $p=0.006$) y ante la estimulación con PGN: TCD3 (51.2 ± 4.3 vs. $40.0 \pm 1.7\%$, $p=0.006$) (Figuras 6 y 7, Tabla 3).

Los datos sugieren un patrón de reducción del porcentaje de células marcadas ante el estímulo en los controles más que en los pacientes, por lo que se hizo la sustracción de la proporción celular del pozo estimulado en relación con el pozo control. Al comparar los datos provenientes de esta operación de los cultivos estimulados con LPS se observó cómo marginalmente los linfocitos CD3 ($-0.8 \pm 1.0\%$ vs. -4.7 ± 1.6 , $p=0.048$) y la subpoblación CD8 ($-0.9 \pm 0.8\%$ vs. -4.5 ± 1.2 , $p=0.02$) fueron significativamente menores en los controles al compararlos con los pacientes con SII (Figura 8), lo que sugiere que la estimulación con LPS lleva a una reducción en el número de células T en los controles pero, permanece sin cambio en los pacientes con SII. El mismo análisis se realizó para los estímulos de PGN y CpG, pero no se observó el mismo patrón, ni diferencias entre los grupos.

A partir de la subpoblación con fenotipo de direccionamiento intestinal y residencia en tejido, se estudió el estatus de activación por medio de la presencia del marcador CD28 en la superficie celular. De forma similar a los resultados previos, al comparar a los pacientes con SII con los controles en el tratamiento sin ligando de TLR, no se observaron diferencias en los niveles de expresión del marcador de activación en ninguna de las subpoblaciones de células T. No obstante, en respuesta a la estimulación con LPS, se observó una reducción significativa en el nivel de expresión de CD28 en las células $CD4+\alpha4\beta7+CCR5+$ en los pacientes con SII (IMF: 2397 ± 70.9 vs 1779 ± 179.2 , $p<0.001$), pero no en los controles (2330 ± 59.4 vs 2337 ± 47.2 , $p=0.962$). Así mismo, la expresión en SII fue significativamente menor en SII vs controles ($p<0.001$) (Figura 9). En el caso de los otros ligandos de TLR y los porcentajes celulares no se observaron diferencias significativas entre pacientes y controles.

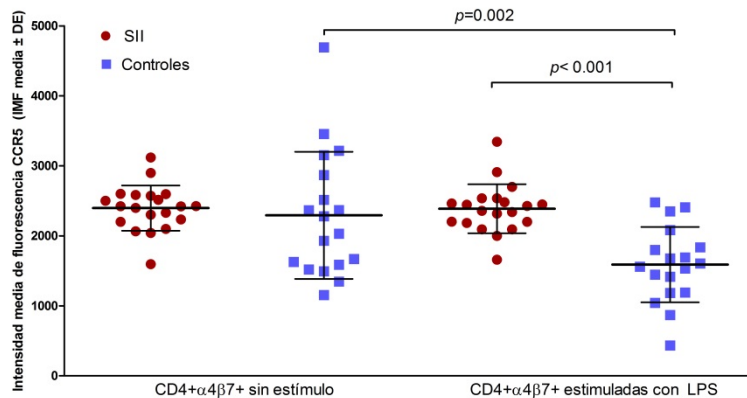


Figura 4. IMF de CCR5 en las células TCD4+α4β7+ de los cultivos sin estímulo y estimuladas con LPS. La intensidad media de fluorescencia del marcador de residencia fue similar entre SII y controles en el cultivo sin estímulo. Mientras que en la estimulación con LPS se observa una disminución en la expresión en pacientes vs controles.

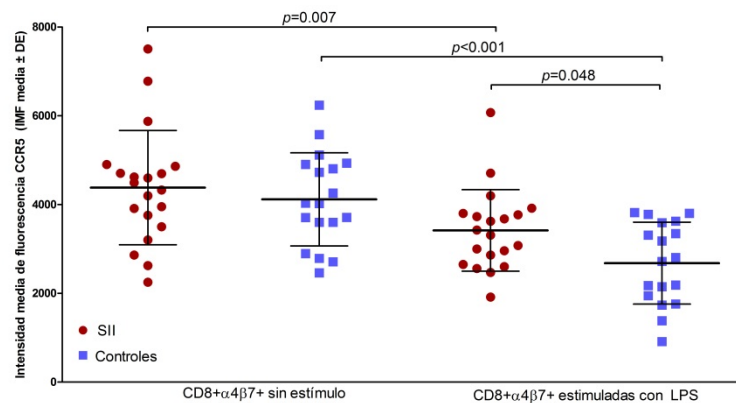


Figura 5. IMF de CCR5 en las células TCD8+α4β7+ de los cultivos sin estímulo y estimuladas con LPS. La intensidad media de fluorescencia del marcador de residencia fue similar entre pacientes con SII en comparación con los controles. Mientras que posterior a la estimulación con LPS se observa una disminución en la expresión en los pacientes vs controles.

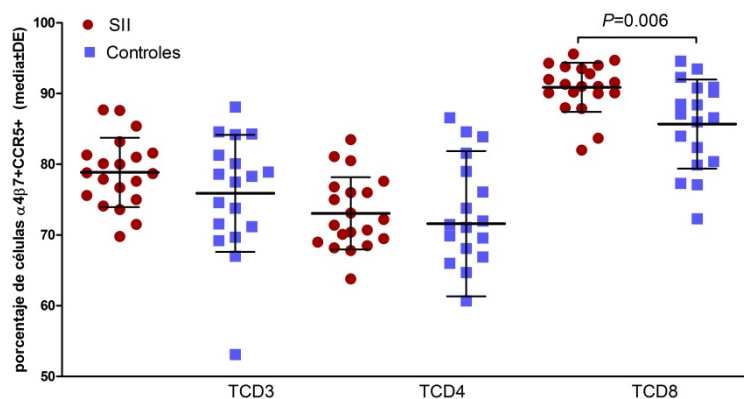


Figura 6. Porcentaje de las subpoblaciones α4β7+CCR5+ en los cultivos estimulados con LPS en SII y controles. Los cultivos estimulados con LPS muestran un incremento en la proporción de CD8 que expresan el marcador de residencia a tejido CCR5 en SII, pero no en controles, no se observan diferencias para TCD3 o TCD4 entre pacientes con SII y controles.

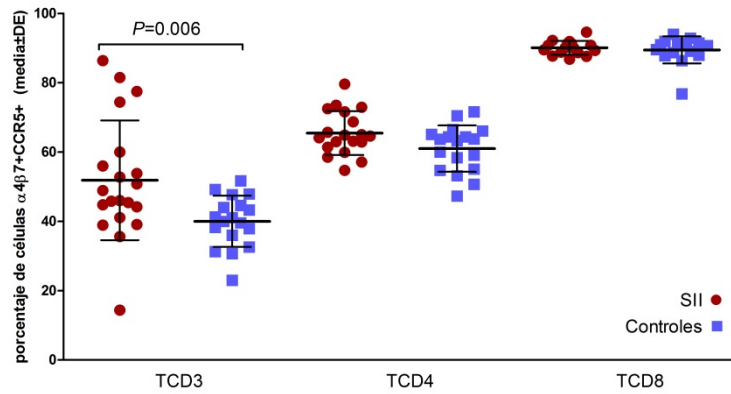


Figura 7. Porcentaje de las subpoblaciones de células $\alpha 4\beta 7 + CCR5 +$ en cultivos estimulados con PGN en SII y controles. Los cultivos estimulados con PGN presentaron porcentajes mayores de células TCD3 expresando el fenotipo de residencia en intestino CCR5 en SII en comparación con controles. No se observaron diferencias en TCD8

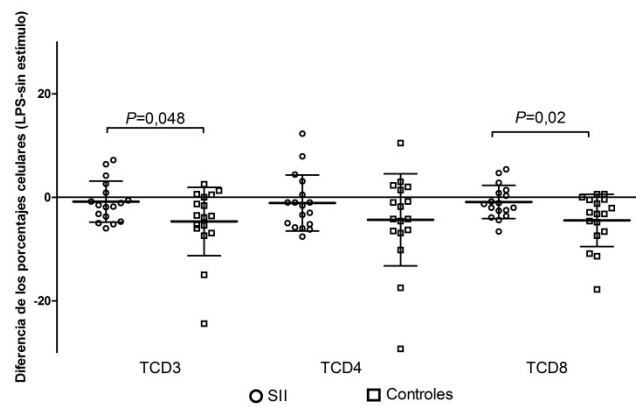


Figura 8. Diferencia entre los porcentajes de células estimuladas con LPS y sin estímulo. El estímulo con LPS para CD3 y CD8 incrementa el número de células en los pacientes en comparación con los controles, donde el estímulo parece sugerir reducción de las subpoblaciones

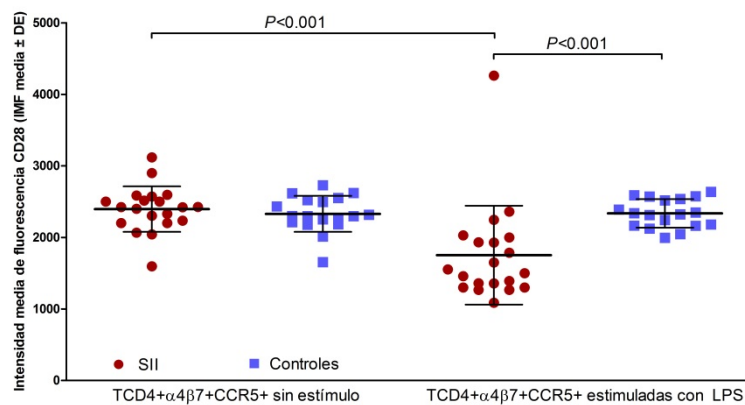


Figura 9. IMF de CD28 en las células $CD4 + \alpha 4\beta 7 + CCR5 +$ en cultivos sin estímulo y estimulados con LPS en SII y controles. El nivel de expresión del fenotipo de activación (CD28) fue similar entre pacientes con SII y controles en el tratamiento sin estímulo. Mientras que para la estimulación con LPS se observa una expresión reducida en los pacientes en comparación con los controles.

Tabla 2. Porcentaje de células T posterior a la estimulación con ligandos de TLR entre pacientes y controles.

Sin estímulo		Ligandos de TLR					
		LPS		PGN		CpG	
SII	Controles	SII	Controles	SII	Controles	SII	Controles
CD3+α4β7+							
74.6±1.4	69.6±3.6	76.2±1.4	71.4±2.9	66.5±3.2	60.1±3.1	65.3±3.0	63.8±2.0
CD4+α4β7+							
57.2±2.2	52.5±3.0	56.4±2.3	52.7±1.9	55.3±2.6	52.2±1.9	54.2±2.8	54.5±1.6
CD8+α4β7+							
27.2±2.1	29.2±1.4	29.8±2.4	30.9±1.3	23.7±1.8	28.6±2.1	27.0±2.9	28.3±1.8
CD3+ α4β7+CCR5+							
79.7±1.6	80.1±1.3	78.9±1.3	75.9±1.9	51.2±4.3 ^a	40.0±1.7	66.7±2.8	76.1±5.0
CD4+α4β7+CCR5+							
74.1±1.9	75.2±1.7	73.0±1.3	71.6±2.4	65.6±1.6 ^b	61.0±1.6	52.4±2.2	58.1±3.3
CD8+α4β7+CCR5+							
91.8±0.9	90.1±0.8	90.8±0.9 ^c	85.7±1.5	76.3±1.5	75.8±1.7	75.3±1.6	78.8±2.1
CD3+ α4β7+CCR5+CD28+							
31.7±1.8	35.5±2.0	28.4±1.6	30.7±1.8	33.7±2.1	35.4±1.8	29.9±1.8	29.1±1.6
CD4+α4β7+CCR5+CD28+							
68.1±2.1	71.9±1.5	73.0±1.3	71.6±2.4	69.3±1.6	71.8±1.5	60.5±1.7	64.8±2.6
CD8+α4β7+CCR5+CD28+							
53.6±2.9	57.5±1.6	52.2±3.3	55.1±1.7	52.1±1.4	60.0±4.3	51.3±1.4	54.2±2.6

Porcentajes celulares expresados en media ± EE. a: $p=0.024$; b: $p=0.048$, c: $p=0.006$

5.3. FENOTIPO DE MACRÓFAGOS

Para todo el grupo de células CD14⁺ (principalmente monocitos/macrófagos), se registró una reducción significativa en la expresión de CD11c al comparar los cultivos sin estímulo con aquellos estimulados con LPS (SII: 12920 ± 949.2 vs 8766 ± 730.2 , $p < 0.001$; controles: 13750 ± 743.1 vs 8233 ± 613.9 , $p < 0.001$) (figura 10), no obstante no se observan diferencias entre los pacientes con SII y controles.

Posteriormente, se categorizaron los grupos CD11c y CD206 en sus posibles combinaciones. De forma general se observó una mayor proporción de células correspondientes a CD11c⁺CD206⁺, seguidas por aquellas CD11c^{neg} CD206⁺ (M₂) y en menor proporción CD11c⁺CD206^{neg} (M₁). Finalmente aquellas doble negativas, cuando presentes, presentaron porcentajes cercanos a cero.

Al analizar la subpoblación CD11c⁺CD206⁺ se observó que el porcentaje de células CD11c⁺CD206⁺CX3CR1⁺ fue mayor en los pacientes con SII en comparación con los controles (9.5 ± 1.5 vs 4.9 ± 1.4 ; $p = 0.022$) (Figura 11).

A partir de los cultivos sin estímulo se observó un valor mayor en la intensidad media de fluorescencia del marcador CD11c en las células con fenotipo M₁ presentes en los cultivos provenientes en los controles en comparación con SII (11540 ± 537.5 vs 13860 ± 893.7 , $p = 0.04$) (Figura 12).

Por su parte, al analizar las intensidades medias de fluorescencia y los porcentajes celulares en los cultivos estimulados con LPS, no se observaron diferencias significativas entre pacientes con SII y controles, no obstante la comparación entre cultivos (a través de la resta del IMF de cultivos estimulados al IMF en los cultivos sin estímulo), sugiere que la expresión del receptor se incrementa en los pacientes y disminuye en los controles ante el estímulo (-151.7 ± 31.2 vs 71.13 ± 89.5 ; $p = 0.001$) (Figura 13).

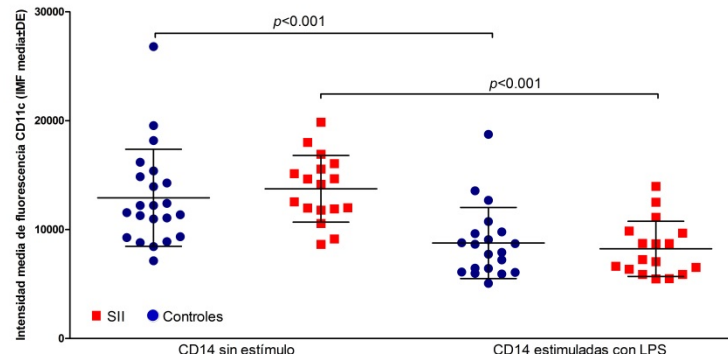


Figura 10. IMF de CD11c en células CD14+ en cultivos sin estímulos y estimulados con LPS en SII y controles. La expresión del receptor CD11c se ve significativamente disminuida en las células cultivadas con LPS, tanto en los pacientes con SII como en los controles, pero no se observan diferencias entre SII vs controles.

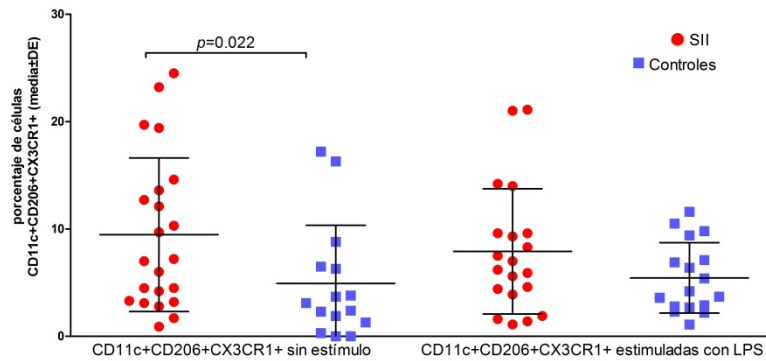


Figura 11. Porcentajes de monocitos/macrófagos CD11c+CD206+CX3CR1+ estimuladas con LPS y sin estímulo. Se observa como los porcentajes de esta subpoblación son mayores en los cultivos sin estimular en los pacientes en comparación con los controles, pero tal diferencia no se evidencia en los cultivos estimulados.

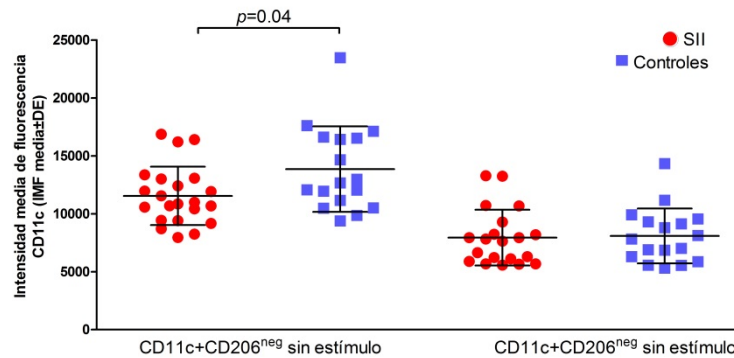


Figura 12. IMF de CD11c en las células CD11c+CD206^{neg} en cultivos sin estímulo y estimulados con LPS en SII y controles. El nivel de expresión del marcador CD11c en los macrófagos con fenotipo M1 fue mayor en las células no estimuladas de los controles en comparación con SII.

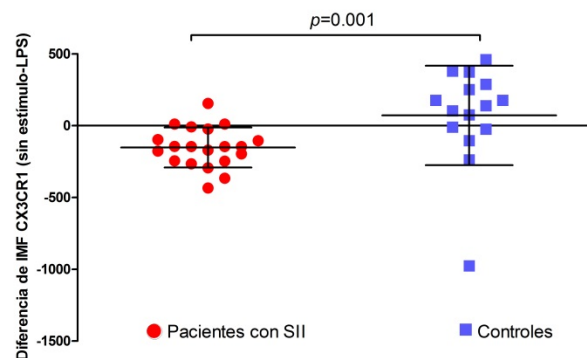


Figura 13. Análisis de la expresión de CX3CR1 dado por la resta IMF sin estímulo-IMF cultivo LPS. A partir de la operación se sugiere que la expresión de este receptor se ve incrementada en los pacientes en comparación con los controles, haciendo que parezca inverso el comportamiento entre los grupos para el receptor.

5.4. CITOCINAS Y QUIMIOCINAS

Como se puede observar en la Tabla 3, la concentración de citocinas y quimiocinas presente en el sobrenadante de las células cultivadas sin ligandos de TLR fueron bajas y similares entre los pacientes con SII y los controles, excepto para el valor Log de IL-8/CXCL8 donde se registró una concentración menor en los pacientes con SII en comparación con los controles: 3.77, 95% IC: 3.59-3.95 vs. 4.18 95% IC: 3.94-4.42, $p=0.006$.

A diferencia de lo anterior, las concentraciones de citocinas y quimiocinas presentaron un aumento notable en aquellos cultivos con estimulación por los ligandos de TLR: LPS y PGN, mientras que la estimulación por CpG no generó el mismo patrón de respuesta, presentando valores similares a los hallados en el pozo sin estímulo, **excepto para la concentración de MIP1 α** . Aunque la estimulación por ligandos de TLR extracelulares presentaron una clara respuesta en los cultivos, en general no se observaron diferencias significativas en la concentración de las citocinas y quimiocinas en los sobrenadantes entre pacientes y controles. La comparación de dichos valores solo sugirió una tendencia para una menor concentración de MCP1 α en los pacientes con SII en comparación con los controles en células estimuladas con PGN (3.0, 95% IC: 2.84-3.22 vs. 3.2, 95% IC: 3.08-3.40, $p=0.088$).

5.5. ESTRÉS Y EL PERFIL INMUNOLÓGICO

Finalmente, luego de evidenciar las alteraciones inmunológicas en los cultivos de los pacientes se puso a prueba si los hallazgos de estrés percibido en los individuos correlacionan con los resultados de los cultivos celulares, sin embargo no se observaron correlaciones entre los niveles de activación, porcentajes celulares (linfocitos T y monocitos/macrófagos) o concentraciones de citocinas en los sobrenadantes de los cultivos con los valores obtenidos de la escala de estrés de Cohen.

Tabla 3. Concentración de citocinas y quimiocinas provenientes de los sobrenadantes de los cultivos de CMNs estimuladas o no estimuladas con ligandos de TLR.

Molécula	SII	Controles	SII-LPS	Controles-LPS	SII-PGN	Controles-PGN	SII-CpG	Controles-CpG
TNF-α	19.4 \pm 5.5	23.0 \pm 6.1	1535.0 \pm 854.0	979.1 \pm 567.5	555.9 \pm 231.6	284.9 \pm 103.1	15.5 \pm 1.9	25.0 \pm 9.5
IL-1β	10.9 \pm 4.2	23.7 \pm 16.2	38.9 \pm 10.6	47.8 \pm 19.3	47.0 \pm 9.2	48.2 \pm 23.2	11.5 \pm 4.7	23.2 \pm 19.0
IL-10	30.2 \pm 7.4	34.7 \pm 7.0	789.6 \pm 137.0	763.7 \pm 83.0	719.4 \pm 95.5	1053.1 \pm 236.2	34.9 \pm 5.8	108.2 \pm 61.2
IL-17α	32.6 \pm 3.0	35.9 \pm 3.6	63.7 \pm 7.9	62.5 \pm 3.7	180.0 \pm 37.7	153.8 \pm 20.8	42.0 \pm 4.3	42.2 \pm 4.8
IL8/CXCL8	7847.3 \pm 1399.4*	11120.9 \pm 1872.2*	15200.0 \pm 2012.3	13380.0 \pm 1381.9	15200.1 \pm 2012.0	13380.1 \pm 1381.0	10500.2 \pm 1638.6	10240.7 \pm 1077.5
CCL5	1302.1 \pm 181.5	1562.0 \pm 277.2	2153.1 \pm 390.6	2682.1 \pm 442.4	2694.9 \pm 279.6	3359.3 \pm 429.6	1925.3 \pm 267.3	1911.8 \pm 248.3
MCP1	2116.0 \pm 478.7	2306.1 \pm 466.1	2565.8 \pm 277.5	3050.0 \pm 421.4	1499.7 \pm 219.4	2256.0 \pm 363.4	1923.2 \pm 133.1	1986.2 \pm 103.8
MIP1α	61.6 \pm 27.62	119.4 \pm 70.07	15550.1 \pm 6522.7	14350 \pm 3725	2284.2 \pm 1692	1699.2 \pm 826.1	1423.1 \pm 870.8	3806.3 \pm 2337.8
MIP1β	527.8 \pm 111.0	695.8 \pm 314.5	2730.6 \pm 627.6	3742.1 \pm 809.7	2647.7 \pm 335.8	2967.3 \pm 322.1	946.3 \pm 204.3	858.4 \pm 202.3

Las concentraciones de los sobrenadantes de citocinas y quimiocinas están expresadas en pg/mL, promedio \pm DE.

* Se encontró diferencia estadísticamente significativa posterior a la transformación logarítmica.

6. DISCUSIÓN

6.1. FENOTIPO DE LINFOCITOS T.

Es de resaltar que en sangre periférica un alto porcentaje de células posee el marcador $\alpha 4\beta 7$ – en especial en células T de memoria⁹⁵ y su fenotipificación recomienda el uso de otros comarcadores como receptores de quimiocinas (en especial CCR9 y CCR4 han sido relacionados con la residencia en el intestino)⁹⁶ que puedan dar luz de su posterior comportamiento, ya sea al establecerse o activarse a nivel local, como también se ha sugerido con el receptor de la quimiocina 5 (CCR5). CCR5 ha sido descrito como un receptor que recluta y mantiene a las células en el intestino⁹⁷, expresado por prácticamente todas las células T residentes en los tejidos intestinales⁹⁸, tanto en la lámina propia como en el epitelio intestinal⁹⁹. Adicionalmente, el nivel de expresión de CCR5 se ha asociado de forma directa con el nivel de activación de las células, en estudios de VIH¹⁰⁰ y líneas celulares¹⁰¹, pero podría estar sucediendo en otras condiciones, como es el caso del presente estudio. De otra parte, la decisión de periodo de tiempo de cultivo fue basado en el actual conocimiento de la capacidad por parte de las células T de reconocer de forma directa los PAMPs vía TLRs^{102,103}.

El diseño experimental se enmarca racionalmente en la necesidad de imitar en condiciones *ex vivo*, la posible interacción entre el sistema inmune y los PAMPs de origen bacteriano, un contacto que se considera común y de una importancia central en la homeostasis del intestino¹⁰⁴. La factibilidad de esta interrelación está mediada por el gran número de células inmunológicas y la incontable diversidad y abundancia de microorganismos que compone la microbiota en el lumen del tracto gastrointestinal^{32,105}, donde se desarrolla una fina respuesta inmunológica, que es tolerogénica en relación a los microorganismos comensales, al mismo tiempo que es fuertemente efectora respecto a los posibles agentes bacterianos patogénicos¹⁰⁶.

Teniendo presente lo anterior, posterior a la estimulación de las CMNs con ligandos de TLR extracelulares bacterianos, se observó un mayor nivel de expresión de los marcadores de residencia/reclutamiento a tejido y activación; respuestas que a su vez fueron significativamente más altas en los cultivos provenientes de pacientes con SII en comparación con los controles. Adicionalmente, cuando las células fueron estimuladas con CpG, no se observaron diferencias en los fenotipos de las células T en comparación con las células no estimuladas

Direccionamiento Intestinal: Recientemente Öhman *et al.* reportaron un porcentaje mayor de células T que expresan el marcador de direccionamiento intestinal, integrina $\beta 7$ en pacientes con

SII en comparación con controles¹². Los autores explican los resultados en un marco de estado inflamatorio subclínico en los pacientes con SII, que puede ser construido con reportes de otros hallazgos que muestran mayores valores de porcentaje de células T en la mucosa colónica de los pacientes con SII en comparación con los controles^{9,21}. No obstante, este patrón de inflamación, llamada inflamación de bajo grado, presenta valores controversiales con otros grupos e investigaciones^{24,26}. Es de resaltar que en el mismo documento, Öhman *et al.* hacen un comarcaje de las células T CD4 y CD8 con integrina $\beta 7$ y HLA-DR, aunque no se explica esta elección de marcadores, ni las implicaciones de este comarcaje son analizadas salvo por el elemento de direccionamiento intestinal. Es de resaltar que el marcaje de HLA-DR se ha utilizado en las células T como marcador de activación de los linfocitos ante un evento inflamatorio^{107,108}; no obstante, la expresión de este marcador en células no presentadoras profesionales está relacionada con un cuadro de estimulación principalmente por INF γ ¹⁰⁹, que no ha sido descrito para SII. Por lo anterior, el hallazgo no es claro ni concluyente, y el resultado del comarcaje no habla de una condición en particular, como pretenden mostrar los autores.

Adicionalmente, Öhman *et al.* observaron un aumento en el porcentaje de células T activadas de forma temprana, a partir del marcador CD69¹¹⁰, en los pacientes con SII en comparación con los controles. Aunque el presente estudio concuerda con una condición de un mayor estado de activación, los diseños de los experimentos son considerablemente distintos: i) el fenotipo del estudio de Öhman *et al.* está basado en sangre fresca, en comparación con cultivo celular; ii) los marcadores se observaron por separado y no se tuvo en cuenta el comarcaje, en comparación con el diseño aquí reportado, donde las cuantificaciones se hacen justamente sobre los subconjuntos y iii) los análisis de resultados nos llevan a pensar en un mecanismo de respuesta ante un estímulo bacteriano, más que un estado o condición perenne de inflamación de bajo grado en los pacientes. Esta condición de contacto también se explica con particular interés en los pacientes con SII, donde se ha descrito un aumento en la permeabilidad epitelial¹³, donde las moléculas o fragmentos bacterianos pueden estar difundiendo a través de la mucosa intestinal, modificando la compleja respuesta inmunológica³³, lo que podría resultar en la generación o exacerbación del SII.

Residencia/Reclutamiento: Liebrechts *et al.* reportaron un porcentaje incrementado de linfocitos T provenientes de CMN de sangre periférica que expresan el fenotipo de direccionamiento a intestino y residencia en el tejido ($\alpha 4\beta 7 + CCR9 +$) en pacientes con dispepsia funcional, aunque no encontraron el mismo patrón entre los pacientes con SII y los controles²⁸. De forma particular, en el presente estudio se evaluó el fenotipo de direccionamiento a intestino y residencia en tejido ($\alpha 4\beta 7 + CCR5 +$), donde encontramos un mayor nivel de expresión del CCR5 en los pacientes

con SII en comparación con los controles. Kunkel *et al.* reportaron que el fenotipo CCR5+ se asocia con linfocitos que infiltran el tejido y se relaciona con el posicionamiento y retención de los linfocitos posteriormente a ingresar al intestino^{97,98}. A partir de las mediciones de IMF la expresión del receptor CCR5 se ve disminuida en las células CD8 (en un grado menor en las células CD4 de controles) sin estímulo y estimuladas con LPS en los sujetos (SII y controles), pero de una forma más marcada en los controles. Aunque al comparar el estudio de Liebrechts *et al.* con el presente (con las salvedades entre los marcadores de superficie) los resultados son concordantes ya que no se encontraron diferencias en los fenotipos de los linfocitos T entre pacientes con SII y controles en los cultivos celulares sin estimular, sino solamente posterior al reto por ligandos de TLR.

Aunque no se ha encontrado hasta la actualidad un experimento *ad hoc* o una explicación del mecanismo biológico involucrado, Langrish *et al.* al analizar la susceptibilidad de neonatos a infecciones, comparó células dendríticas derivadas de monocitos provenientes de sangre de cordón umbilical y sangre de adultos y estimuló con LPS¹¹¹. A partir de ese experimento los autores reportan que las células dendríticas adoptaron un fenotipo maduro a partir de la regulación negativa de la expresión de CCR5, mientras que aquellas provenientes de cordón umbilical no maduraron¹¹¹. Basado en lo anterior, se podría llegar a especular que en SII, las células T presentan una respuesta de maduración ante el estímulo bacteriano menor o incluso nula en comparación con los controles. A claras luces esta condición debe ser objeto de estudio en un futuro, para comprender cuál es el mecanismo que lleva al control de la expresión del receptor en superficie (internalización vs reciclaje y síntesis de nuevos receptores¹¹²) y si esta condición inmadura puede estar representando una respuesta inmune mayor en SII, ya que el nivel de expresión de CCR5 ha sido asociado con una mayor respuesta inmunológica como se ha reportado previamente^{100,101}, lo que estaría en concordancia con la propuesta de activación inmune de bajo grado sugerida por diversos grupos de investigación.

Activación: La molécula CD28 se encuentra normalmente expresada en los linfocitos T, aunque su expresión decrece posterior a la activación por ligandos de TLR^{113,114} o en presencia de TNF α en condiciones proinflamatorias^{115, 116}. En el presente estudio se encontró una proporción de células T CD28+ similar entre pacientes y controles, lo cual es concordante con el estudio de Kindt *et al.* donde no encontraron ninguna diferencia en el porcentaje de células CD3+CD28+ en pacientes con enfermedades funcionales digestivas (SII, dispepsia funcional y dolor de pecho no cardíaco) vs controles ¹¹⁵. Sin embargo, para los pacientes con SII se observó que el nivel de expresión de CD28 es inferior en los pacientes con SII para los cultivos celulares estimulados con ligandos de TLR, a lo que uno puede especular que existe una predisposición al desarrollo

de una respuesta más rápida o más fuerte ante la estimulación por ligandos de TLR en SII que en controles y por lo tanto se decrece la expresión de CD28 en los cultivos de SII. Así mismo, se ha descrito que la subpoblación CD8+ CD28^{neg} presenta niveles menores de proliferación, mayor longevidad y la capacidad de sintetizar citocinas y quimiocinas¹¹⁶. Lo anterior sugiere una cinética y una respuesta funcional de las células distinta de aquellas CD28+, que podría participar en el mantenimiento de un estado inflamatorio crónico en SII.

Al igual que con los demás receptores, existen otros marcadores de activación de las células T que merecen ser investigados como posibles candidatos para la evaluación del estado de activación como CD25 o CD69, sin embargo estos marcadores son transitorios para algunas subpoblaciones celulares^{117,118}. Otro marcador de activación es el CD137, aunque, este marcador requiere un periodo de tiempo más largo para poder cambiar su nivel de expresión y su activación es dependiente de antígeno¹¹⁹.

Igualmente, se debe estar consciente de que el estudio posee limitantes. El pequeño tamaño de muestra no permite una comparación entre los pacientes SII con respecto a aquellos SII-PI o entre los diferentes subtipos de SII. Sin embargo, el proyecto fue desarrollado en población mexicana donde un reporte previo retrospectivo concuerda con la prevalencia de SII-PI registrada en el presente documento⁵². Adicionalmente, en México, la prevalencia del SII-D (15%) es comparativamente menor en relación a SII-A (41%) o SII-C (44%)¹²⁰. Por lo tanto los 3 pacientes con SII-D (14.3%) en el presente estudio, podrá representar una estimación de la prevalencia de este subgrupo en la población. Aunque no se puede generar ninguna conclusión a partir de los subgrupos de SII según su hábito de evacuación, el hecho de que la mayoría de los pacientes estudiados fueran SII-A (47.6%), seguidos por SII-C (38.1%), sugieren que los hallazgos de activación inmune en el SII, no son características exclusivas de pacientes con SII-D. Un diseño de estudio más grande es necesario a la hora de hacer comparaciones entre los grupos. Adicionalmente el presente estudio no contó con la posibilidad del análisis de biopsias de mucosa colónica y con ello evidenciar la presencia de inflamación de bajo grado y complementar y fortalecer los resultados.

Sin embargo, el estudio fue inicialmente pensado para el acercamiento a una condición de interacción de las células de la respuesta inmune con PAMPs de origen bacteriano. Adicionalmente, no se espera encontrar diferencias en los conteos de células, debido a que la mayoría de los pacientes estudiados no son SII-PI, que puedan dar la contraparte de la presencia de una gastroenteritis infecciosa o el cambio de las poblaciones de la microbiota intestinal con el posible estado de predisposición inmune que sugiere nuestro estudio para las células de la respuesta inmune.

6.2. FENOTIPO DE MACRÓFAGOS

El modelo utilizado con monocitos/macrófagos de la periferia en un cultivo, no pretende imitar las condiciones de una respuesta dada por los macrófagos residentes en la lámina propia de los individuos. No obstante, la literatura propone que los macrófagos residentes de la lámina propia se componen exclusivamente de monocitos reclutados de sangre¹²¹, incorporados potentemente por la producción del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) e IL-8 producido por las células epiteliales intestinales¹²². Muy recientemente Bain *et al.* y Tamoutounour *et al.* plantearon paralelamente a partir de modelo murino, que las condiciones del intestino llevan a un desarrollo del macrófago a modo de "cascada"^{123,124}, un concepto lineal donde un estado normal de la lámina propia permite un desarrollo completo del macrófago hasta un estado tolerante, mientras que un estado de inflamación hace que el macrófago no complete el proceso y se establezca un macrófago con respuesta proinflamatoria^{123,124}. Aunque el modelo se encuentra en debate, es complementario para el intestino a la propuesta de activación clásica vs activación alternativa de los macrófagos (conocidos como M₁ vs M₂), donde aquellos clásicamente activados son asociados con la secreción de citocinas proinflamatorias, mientras que aquellos alternativamente activados presentan un fenotipo anti-inflamatorio¹²⁵.

Basados en la propuesta del desarrollo unidireccional, se podría sugerir que la presencia de los diferentes marcadores de membrana nos permiten ir evidenciando el proceso de desarrollo en las células en cultivo, de los monocitos/macrófagos entre los pacientes y los controles. En este sentido, los marcadores CD11c¹²⁶, CD206¹²³ y CX3CR1¹²⁶ no se encuentran expresados en los monocitos periféricos, sino que son expresados en un estado residente, que en el presente estudio se debe relacionar con las condiciones del cultivo celular. En el intestino, los macrófagos expresan el marcador CD11c en concentraciones nula a intermedia¹²⁶. Aunque la presencia de este marcador se encuentra en células completamente diferenciadas, en general no se encuentra asociado con las células con un fenotipo M₂-like (subpoblación mayoritaria en intestino), cuyas funciones son principalmente de regulación de la inflamación¹²⁷ dada por la respuesta mediada por células T¹²⁸. De forma paralela, la expresión de los marcadores CD206+ y CX3CR1+ se hacen mayores a medida que la célula se desarrolla en el intestino y se asocian igualmente con el fenotipo M₂-like. Por lo anterior, la subpoblación CD206+CX3CR1+ (en nivel de activación y porcentaje) puede estar asociada con la que alcanzó un mayor estado desarrollo, mientras que aquella con CD206^{neg}CX3CR1^{neg} es la menos avanzada en su proceso. Por lo

tanto la observación general de la baja en la expresión de CD11c ante el cultivo con LPS sugiere un proceso de maduración ante la presencia del estímulo, en la dirección comentada previamente. Por su parte, se observó como la IMF de CD11c en las células M₁ está significativamente más alta en los cultivos sin estimular de los controles, lo que nos podría sugerir que en las condiciones iniciales las células de los controles se encuentran menos desarrolladas que en los pacientes, aunque este proceso debe ser estudiado a mayor profundidad, empezando por el valor basal sin cultivo.

Finalmente, para la subpoblación "M₂" se observa un mayor nivel de expresión del receptor CX3CR1 en los pacientes con SII en las células estimuladas con LPS. Sin embargo, la resta de la expresión del receptor CX3CR1 de las células CD11c^{neg}CD206⁺ estimuladas con LPS con aquellas sin estímulo sugiere una reducción en la expresión de CX3CR1 en SII, mientras que en los controles la respuesta es inversa. Lo anterior es concordante con la hipótesis previa de estados diferentes en un punto inicial (en este caso sin estímulo) entre pacientes y controles, que posterior a la estimulación con LPS se igualan. Probablemente la respuesta de los controles hacia un estado tolerante es más rápida ante el ligando de TLR, a pesar de estar "atrasada" en el estado sin estímulo.

En otras palabras, aunque los datos sin estímulo sugieren que los pacientes se pueden encontrar en un estado de activación superior, en presencia de LPS los valores se equilibran o incluso se ven reducidos en SII en comparación con los controles.

De forma complementaria, los resultados sugieren que los macrófagos probablemente poseen un estado de activación previo a los cultivos, pero que luego de ser estimuladas por ligandos de TLR (y probablemente por citocinas producto de los linfocitos en cocultivo) esta diferencia entre pacientes y controles se diluye, lo que nos sugiere que una activación inmunológica por PAMPs es capaz de modular esta activación inmune de bajo grado (como se ha sugerido en macrófagos en pacientes con SII recientemente¹⁹). Así mismo, esta modulación por PAMPs y TLRs puede estar relacionada con los mecanismos por los cuales los probióticos¹²⁹ y el uso de antibióticos¹³⁰ lumbinales presentan efectos de mejoría en los síntomas.

A futuro puede ser importante generar un cultivo convencional de maduración de monocitos a macrófagos, donde se puedan plantear unas condiciones más parecidas a aquellas del tejido blanco de la enfermedad y las respuestas puedan ser más cercanas a lo que ocurre *in vivo*.

Es importante enlazar los datos con observaciones en el tracto digestivo, donde una medida interesante es la presencia de macrófagos CD14⁺, ya que como se conoce tiempo atrás los macrófagos de la mucosa colónica no presentan este marcador, por lo que su presencia en mucosa puede estar significando un proceso de reclutamiento de nuevos macrófagos de

periferia¹³¹, que puede estar mediado por una migración endotelial facilitada, como se ha observado en otros estados inflamatorios¹³², pero hasta la fecha no se conoce su estudio en pacientes con SII. Igualmente, la utilización del marcador CD64 puede ser importante, ya que se asocia principalmente con macrófagos y los separa de células dendríticas¹²⁴.

6.3. CONCENTRACIÓN DE CITOCINAS Y QUIMIOINAS

La estimulación de las CMNs con LPS y PGN dio como resultado un incremento en la concentración de las citocinas y quimiocinas en el sobrenadante de los cultivos, aunque sin diferencias significativas entre los pacientes con SII y los controles, mientras que la estimulación con CpG no llevó a la amplificación de estas moléculas solubles en comparación con los cultivos no estimulados. La falta de diferencias en las citocinas y quimiocinas entre los grupos luego de ser estimulados con LPS y PGN es intrigante y difiere de otros estudios que han reportado mayores niveles de algunas de estas citocinas en los pacientes con SII bajo condiciones de cultivo similares^{34,36}. Consideramos que el periodo de incubación (24 horas) es un periodo conveniente para medir la respuesta a estos estímulos, como ya lo hicieron McKernan *et al.* donde registraron mayores niveles de citocinas en pacientes con SII en comparación con controles³⁶. Probablemente los resultados presentan estas discordancias debido a diferencias de tipo poblacional además de una N más grande, por lo que se requieren estudios adicionales en este respecto.

De otra parte, el patrón de secreción posterior a la estimulación con CpG fue en parte esperado, ya que en estudios previos se registran valores muy bajos para algunas citocinas (*e.g.* IL-10) en células en cultivo estimuladas con este ligando intracelular en particular^{133,134}. Villani *et al.*³⁹ reportaron la asociación entre dos polimorfismos de TLR-9 (receptor de CpG) como factores de riesgo genéticos para el desarrollo de SII-PI. Sin embargo, TLR-9 no ha sido asociado con SII-no PI, como es el caso de la gran mayoría de los pacientes estudiados, lo que nos sugiere que los mecanismos involucrados probablemente son diferentes entre SII PI y SII no PI³⁹. Es importante mencionar que la baja prevalencia encontrada (5.0%) es muy similar a aquella previamente reportada para México (5.8%⁵²), lo que sugiere que el desarrollo de una gastroenteritis infecciosa probablemente no es el mecanismo central para el desarrollo de SII en la población mexicana, probablemente debido a que no se posee una predisposición genética o porque se posee un contacto microbiano mayor y más complejo durante el periodo de la infancia. Sin embargo, basados en nuestros resultados, podemos especular que los pacientes con SII no PI deben tener una predisposición inmunológica al momento de reaccionar ante cambios en la

microbiota o la presencia de una gastroenteritis infecciosa que puede exacerbar el SII. Adicionalmente, hallazgos recientes involucran la interrelación entre las células de la respuesta inmunológica y las bacterias comensales en procesos de entrenamiento y desarrollo de las células y la respuesta tolerogénica¹³⁵, que deben ser estudiados más a fondo para evaluar su participación en el SII.

7. CONCLUSIONES

El resultado del estudio de los fenotipos celulares indican un estado o respuesta inmunológica distinta entre pacientes y controles, en especial en presencia de ligandos bacterianos extracelulares; no obstante, esta respuesta al parecer no se asocia con la producción de citocinas o quimiocinas, ni con el estado de estrés percibido de los individuos objeto de estudio.

Para el caso de las células T, la respuesta celular se vio enmarcada comparativamente en el desarrollo de un menor grado de madurez –observado en la menor capacidad de regular de forma negativa el CCR5–, con un más alto grado de activación –nivel de expresión de CD28–, ante la estimulación con LPS. Mientras que los monocitos/macrófagos de pacientes se encuentran en un mayor grado de activación en comparación con los controles –sugerido por los marcadores CD11c y CD206.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, Houghton LA, Mearin F, Spiller RC. Functional bowel disorders. *Gastroenterology* 2006;130:1480-91.
2. Choung RS, Locke GR, 3rd. Epidemiology of IBS. *Gastroenterology clinics of North America* 2011;40:1-10.
3. Lopez-Colombo A, Bravo-González D, Corona-Lopez A, et al. First community-based study of functional gastrointestinal disorders (FGID) in México using the Rome II modular questionnaire. *Gastroenterology* 2006;130:A-508(T1254).
4. Schmulson M, Ortiz O, Santiago-Lomeli M, et al. Frequency of functional bowel disorders among healthy volunteers in Mexico City. *Dig Dis* 2006;24:342-7.
5. Henderson PK, DiPalma JA. Diagnosing irritable bowel syndrome: a changing clinical paradigm. *Southern medical journal* 2011;104:195-9.
6. Schmulson M. Síndrome de intestino irritable. In: Schmulson M, ed. *Clínicas de Gastroenterología de México, Motilidad y Trastornos Funcionales Digestivos*. México DF: Editorial Alfil, S.A. de C.V. ; 2008:109-28.
7. Spiller R, Garsed K. Postinfectious irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2009;136:1979-88.
8. Spiller R, Lam C. An Update on Post-infectious Irritable Bowel Syndrome: Role of Genetics, Immune Activation, Serotonin and Altered Microbiome. *Journal of neurogastroenterology and motility* 2012;18:258-68.
9. Cremon C, Gargano L, Morselli-Labate AM, et al. Mucosal immune activation in irritable bowel syndrome: gender-dependence and association with digestive symptoms. *The American journal of gastroenterology* 2009;104:392-400.
10. Macsharry J, O'Mahony L, Fanning A, et al. Mucosal cytokine imbalance in irritable bowel syndrome. *Scandinavian journal of gastroenterology* 2008;43:1467-76.
11. Bercik P, Verdu EF, Collins SM. Is irritable bowel syndrome a low-grade inflammatory bowel disease? *Gastroenterology clinics of North America* 2005;34:235-45, vi-vii.
12. Ohman L, Isaksson S, Lindmark AC, et al. T-cell activation in patients with irritable bowel syndrome. *The American journal of gastroenterology* 2009;104:1205-12.
13. Piche T, Barbara G, Aubert P, et al. Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome: involvement of soluble mediators. *Gut* 2009;58:196-201.
14. Longstreth G. Definition and classification of irritable bowel syndrome: current consensus and controversies. *Gastroenterol Clin N Am* 2005;34:173-87.
15. Schmulson M, Morgan D, Cortes L, et al. Traducción y validación multinacional del cuestionario diagnóstico para adultos de Roma III en español. *Rev Gastroenterol Méx* 2008;73:79.
16. Sperber AD, Drossman DA. Irritable bowel syndrome: a multidimensional disorder cannot be understood or treated from a unidimensional perspective. *Therapeutic advances in gastroenterology* 2012;5:387-93.
17. Ohman L, Simren M. Pathogenesis of IBS: role of inflammation, immunity and neuroimmune interactions. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 2010;7:163-73.
18. Simren M, Barbara G, Flint HJ, et al. Intestinal microbiota in functional bowel disorders: a Rome foundation report. *Gut* 2013;62:159-76.
19. Ohman L, Lindmark AC, Isaksson S, et al. Increased TLR2 expression on blood monocytes in irritable bowel syndrome patients. *European journal of gastroenterology & hepatology* 2012;24:398-405.
20. Dunlop SP, Jenkins D, Neal KR, Spiller RC. Relative importance of enterochromaffin cell hyperplasia, anxiety, and depression in postinfectious IBS. *Gastroenterology* 2003;125:1651-9.

21. Chadwick VS, Chen W, Shu D, et al. Activation of the mucosal immune system in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2002;122:1778-83.
22. Barbara G, Stanghellini V, De Giorgio R, et al. Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2004;126:693-702.
23. Cenac N, Andrews CN, Holzhausen M, et al. Role for protease activity in visceral pain in irritable bowel syndrome. *The Journal of clinical investigation* 2007;117:636-47.
24. Chang L, Adeyemo M, Karagiannides I, et al. Serum and colonic mucosal immune markers in irritable bowel syndrome. *The American journal of gastroenterology* 2012;107:262-72.
25. Klooker TK, Braak B, Koopman KE, et al. The mast cell stabiliser ketotifen decreases visceral hypersensitivity and improves intestinal symptoms in patients with irritable bowel syndrome. *Gut* 2010;59:1213-21.
26. Braak B, Klooker TK, Wouters MM, et al. Mucosal immune cell numbers and visceral sensitivity in patients with irritable bowel syndrome: is there any relationship? *The American journal of gastroenterology* 2012;107:715-26.
27. Ohman L, Lindmark AC, Isaksson S, et al. B-cell activation in patients with irritable bowel syndrome (IBS). *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 2009;21:644-50, e27.
28. Liebrechts T, Adam B, Bredack C, et al. Small bowel homing T cells are associated with symptoms and delayed gastric emptying in functional dyspepsia. *The American journal of gastroenterology* 2011;106:1089-98.
29. Murai M, Turovskaya O, Kim G, et al. Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nature immunology* 2009;10:1178-84.
30. Quigley EM. Antibiotics for irritable bowel syndrome: hitting the target, but what is it? *Gastroenterology* 2011;141:391-3.
31. Pimentel M, Lembo A, Chey WD, et al. Rifaximin therapy for patients with irritable bowel syndrome without constipation. *The New England journal of medicine* 2011;364:22-32.
32. Salonen A, de Vos WM, Palva A. Gastrointestinal microbiota in irritable bowel syndrome: present state and perspectives. *Microbiology* 2010;156:3205-15.
33. Camilleri M, Lasch K, Zhou W. Irritable bowel syndrome: methods, mechanisms, and pathophysiology. The confluence of increased permeability, inflammation, and pain in irritable bowel syndrome. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 2012;303:G775-85.
34. Liebrechts T, Adam B, Bredack C, et al. Immune activation in patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2007;132:913-20.
35. O'Mahony SM, Marchesi JR, Scully P, et al. Early life stress alters behavior, immunity, and microbiota in rats: implications for irritable bowel syndrome and psychiatric illnesses. *Biological psychiatry* 2009;65:263-7.
36. McKernan DP, Gaszner G, Quigley EM, Cryan JF, Dinan TG. Altered peripheral toll-like receptor responses in the irritable bowel syndrome. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2011;33:1045-52.
37. McKernan DP, Nolan A, Brint EK, et al. Toll-like receptor mRNA expression is selectively increased in the colonic mucosa of two animal models relevant to irritable bowel syndrome. *PloS one* 2009;4:e8226.
38. Brint EK, MacSharry J, Fanning A, Shanahan F, Quigley EM. Differential expression of toll-like receptors in patients with irritable bowel syndrome. *The American journal of gastroenterology* 2011;106:329-36.
39. Villani AC, Lemire M, Thabane M, et al. Genetic risk factors for post-infectious irritable bowel syndrome following a waterborne outbreak of gastroenteritis. *Gastroenterology* 2010;138:1502-13.

40. Navikas V, Link H. Review: cytokines and the pathogenesis of multiple sclerosis. *Journal of neuroscience research* 1996;45:322-33.
41. Muzes G, Molnar B, Tulassay Z, Sipos F. Changes of the cytokine profile in inflammatory bowel diseases. *World journal of gastroenterology : WJG* 2012;18:5848-61.
42. O'Mahony L, McCarthy J, Kelly P, et al. Lactobacillus and bifidobacterium in irritable bowel syndrome: symptom responses and relationship to cytokine profiles. *Gastroenterology* 2005;128:541-51.
43. Dinan TG, Clarke G, Quigley EM, et al. Enhanced cholinergic-mediated increase in the pro-inflammatory cytokine IL-6 in irritable bowel syndrome: role of muscarinic receptors. *The American journal of gastroenterology* 2008;103:2570-6.
44. Kraneveld AD, Rijniere A, Nijkamp FP, Garssen J. Neuro-immune interactions in inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome: future therapeutic targets. *European journal of pharmacology* 2008;585:361-74.
45. Hughes PA, Harrington AM, Castro J, et al. Sensory neuro-immune interactions differ between Irritable Bowel Syndrome subtypes. *Gut* 2012.
46. Gonsalkorale WM, Perrey C, Pravica V, Whorwell PJ, Hutchinson IV. Interleukin 10 genotypes in irritable bowel syndrome: evidence for an inflammatory component? *Gut* 2003;52:91-3.
47. van der Veek PP, van den Berg M, de Kroon YE, Verspaget HW, Masclee AA. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene polymorphisms in irritable bowel syndrome. *The American journal of gastroenterology* 2005;100:2510-6.
48. Gutierrez-Reyes G, Martínez-García R, Morales-Rochlin N, Gonzalez M, Corona de Lau C, Schmulson M. Interleukin-10 genotypes in IBS-Rome II subjects in México. *Gastroenterology* 2006;130:A-512 (T1273).
49. Martínez-García R, Ramos-Valencia A, Morales-Rochlin N, et al. Genetic susceptibility for a low anti-inflammatory component in IBS Rome II positive subjects in Mexico. *Gastroenterology* 2007;132:W1173.
50. Romero-Valdovinos M, Gudino-Ramirez A, Reyes-Gordillo J, et al. Interleukin-8 and -10 gene polymorphisms in irritable bowel syndrome. *Molecular biology reports* 2012;39:8837-43.
51. Schmulson M, Pulido-London D, Rodriguez O, et al. Lower serum IL-10 is an independent predictor of IBS among volunteers in Mexico. *The American journal of gastroenterology* 2012;107:747-53.
52. Ortiz O, Remes-Troche J, Valdovinos M, Vargas-Voráckova F, Schmulson M. Frecuencia de factores desencadenantes extero e interoceptivos en la presentación inicial del síndrome de intestino irritable (SII) en un hospital de tercer nivel en México: Baja frecuencia de SII postinfeccioso? *Revista de gastroenterología de Mexico* 2003;68:98-9.
53. Dunlop SP, Jenkins D, Spiller RC. Distinctive clinical, psychological, and histological features of postinfective irritable bowel syndrome. *The American journal of gastroenterology* 2003;98:1578-83.
54. Gwee KA, Collins SM, Read NW, et al. Increased rectal mucosal expression of interleukin 1beta in recently acquired post-infectious irritable bowel syndrome. *Gut* 2003;52:523-6.
55. Wang LH, Fang XC, Pan GZ. Bacillary dysentery as a causative factor of irritable bowel syndrome and its pathogenesis. *Gut* 2004;53:1096-101.
56. Spiller RC. Role of infection in irritable bowel syndrome. *Journal of gastroenterology* 2007;42 Suppl 17:41-7.
57. Mearin F. Postinfectious functional gastrointestinal disorders. *Journal of clinical gastroenterology* 2011;45 Suppl:S102-5.
58. Gwee KA, Leong YL, Graham C, et al. The role of psychological and biological factors in postinfective gut dysfunction. *Gut* 1999;44:400-6.

59. Neal KR, Hebden J, Spiller R. Prevalence of gastrointestinal symptoms six months after bacterial gastroenteritis and risk factors for development of the irritable bowel syndrome: postal survey of patients. *BMJ* 1997;314:779-82.
60. Mearin F, Perez-Oliveras M, Perello A, et al. Dyspepsia and irritable bowel syndrome after a Salmonella gastroenteritis outbreak: one-year follow-up cohort study. *Gastroenterology* 2005;129:98-104.
61. Gwee KA. Irritable bowel syndrome in developing countries--a disorder of civilization or colonization? *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 2005;17:317-24.
62. Posserud I, Stotzer PO, Bjornsson ES, Abrahamsson H, Simren M. Small intestinal bacterial overgrowth in patients with irritable bowel syndrome. *Gut* 2007;56:802-8.
63. Bratten JR, Spanier J, Jones MP. Lactulose breath testing does not discriminate patients with irritable bowel syndrome from healthy controls. *The American journal of gastroenterology* 2008;103:958-63.
64. Shah ED, Basseri RJ, Chong K, Pimentel M. Abnormal breath testing in IBS: a meta-analysis. *Digestive diseases and sciences* 2010;55:2441-9.
65. Meyrat P, Safroneeva E, Schoepfer AM. Rifaximin treatment for the irritable bowel syndrome with a positive lactulose hydrogen breath test improves symptoms for at least 3 months. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2012;36:1084-93.
66. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005;308:1635-8.
67. Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 2005;307:1915-20.
68. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 2012;486:207-14.
69. Costello EK, Stagaman K, Dethlefsen L, Bohannan BJ, Relman DA. The application of ecological theory toward an understanding of the human microbiome. *Science* 2012;336:1255-62.
70. Malinen E, Rinttila T, Kajander K, et al. Analysis of the fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients and healthy controls with real-time PCR. *The American journal of gastroenterology* 2005;100:373-82.
71. Tana C, Umesaki Y, Imaoka A, Handa T, Kanazawa M, Fukudo S. Altered profiles of intestinal microbiota and organic acids may be the origin of symptoms in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 2010;22:512-9, e114-5.
72. Kerckhoffs AP, Samsom M, van der Rest ME, et al. Lower Bifidobacteria counts in both duodenal mucosa-associated and fecal microbiota in irritable bowel syndrome patients. *World journal of gastroenterology : WJG* 2009;15:2887-92.
73. Maukonen J, Satokari R, Matto J, Soderlund H, Mattila-Sandholm T, Saarela M. Prevalence and temporal stability of selected clostridial groups in irritable bowel syndrome in relation to predominant faecal bacteria. *Journal of medical microbiology* 2006;55:625-33.
74. Peterson G, Allen CR, Holling CS. Ecological resilience, biodiversity, and scale. *Ecosystems* 1998;1:6-18.
75. Hooper DU, Chapin FS, Ewel JJ, et al. Effects of biodiversity on ecosystem functioning: A consensus of current knowledge. *Ecol Monogr* 2005;75:3-35.
76. Jeffery IB, O'Toole PW, Ohman L, et al. An irritable bowel syndrome subtype defined by species-specific alterations in faecal microbiota. *Gut* 2012;61:997-1006.
77. Hemarajata P, Versalovic J. Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Therapeutic advances in gastroenterology* 2013;6:39-51.
78. Whelan K, Quigley EM. Probiotics in the management of irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease. *Current opinion in gastroenterology* 2013.

79. Mayer EA, Tillisch K. The brain-gut axis in abdominal pain syndromes. *Annual review of medicine* 2011;62:381-96.
80. Larauche M, Mulak A, Tache Y. Stress and visceral pain: from animal models to clinical therapies. *Experimental neurology* 2012;233:49-67.
81. Wolitzky-Taylor K, Craske MG, Labus JS, Mayer EA, Naliboff BD. Visceral sensitivity as a mediator of outcome in the treatment of irritable bowel syndrome. *Behaviour research and therapy* 2012;50:647-50.
82. Cohen S, Kamarck T, Mermelstein R. A global measure of perceived stress. *Journal of health and social behavior* 1983;24:385-96.
83. Remor E. Psychometric properties of a European Spanish version of the Perceived Stress Scale (PSS). *The Spanish journal of psychology* 2006;9:86-93.
84. Ramirez MT, Hernandez RL. Factor structure of the Perceived Stress Scale (PSS) in a sample from Mexico. *The Spanish journal of psychology* 2007;10:199-206.
85. Larauche M. Novel insights in the role of peripheral corticotropin-releasing factor and mast cells in stress-induced visceral hypersensitivity. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 2012;24:201-5.
86. Feng B, La JH, Schwartz ES, Gebhart GF. Irritable bowel syndrome: methods, mechanisms, and pathophysiology. *Neural and neuro-immune mechanisms of visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome. American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 2012;302:G1085-98.
87. Wood J. Pathophysiology underlying the irritable bowel syndrome. In: Johnson L, Barrett K, Ghishan F, Merchant J, Said H, Wood J, eds. *Physiology of the Gastrointestinal Tract. Fourth Edition* ed. Burlington, MA. USA: Elsevier Academic Press; 2006:1009-31.
88. Disis ML, dela Rosa C, Goodell V, et al. Maximizing the retention of antigen specific lymphocyte function after cryopreservation. *Journal of immunological methods* 2006;308:13-8.
89. Germann A, Schulz JC, Kemp-Kamke B, Zimmermann H, von Briesen H. Standardized Serum-Free Cryomedia Maintain Peripheral Blood Mononuclear Cell Viability, Recovery, and Antigen-Specific T-Cell Response Compared to Fetal Calf Serum-Based Medium. *Biopreservation and biobanking* 2011;9:229-36.
90. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews Immunology* 2008;8:958-69.
91. Tacke F. Functional role of intrahepatic monocyte subsets for the progression of liver inflammation and liver fibrosis in vivo. *Fibrogenesis & tissue repair* 2012;5 Suppl 1:S27.
92. Diehl GE, Longman RS, Zhang JX, et al. Microbiota restricts trafficking of bacteria to mesenteric lymph nodes by CX(3)CR1(hi) cells. *Nature* 2013;494:116-20.
93. Metcalf D. The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Blood* 1986;67:257-67.
94. Plesner A, Greenbaum CJ, Lernmark A. Low serum conditions for in vitro generation of human macrophages with macrophage colony stimulating factor. *Journal of immunological methods* 2001;249:53-61.
95. Rott LS, Briskin MJ, Andrew DP, Berg EL, Butcher EC. A fundamental subdivision of circulating lymphocytes defined by adhesion to mucosal addressin cell adhesion molecule-1. Comparison with vascular cell adhesion molecule-1 and correlation with beta 7 integrins and memory differentiation. *J Immunol* 1996;156:3727-36.
96. Agace W. Generation of gut-homing T cells and their localization to the small intestinal mucosa. *Immunology letters* 2010;128:21-3.
97. Kunkel EJ, Boisvert J, Murphy K, et al. Expression of the chemokine receptors CCR4, CCR5, and CXCR3 by human tissue-infiltrating lymphocytes. *The American journal of pathology* 2002;160:347-55.
98. Kunkel EJ, Campbell DJ, Butcher EC. Chemokines in lymphocyte trafficking and intestinal immunity. *Microcirculation* 2003;10:313-23.

99. Johansson-Lindbom B, Agace WW. Generation of gut-homing T cells and their localization to the small intestinal mucosa. *Immunological reviews* 2007;215:226-42.
100. Portales P, Psomas KC, Tuaille E, et al. The intensity of immune activation is linked to the level of CCR5 expression in human immunodeficiency virus type 1-infected persons. *Immunology* 2012;137:89-97.
101. Chang LY, Lin YC, Kang CW, et al. The indispensable role of CCR5 for in vivo suppressor function of tumor-derived CD103+ effector/memory regulatory T cells. *J Immunol* 2012;189:567-74.
102. Caron G, Duluc D, Fremaux I, et al. Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN-gamma production by memory CD4+ T cells. *J Immunol* 2005;175:1551-7.
103. Komai-Koma M, Gilchrist DS, Xu D. Direct recognition of LPS by human but not murine CD8+ T cells via TLR4 complex. *European journal of immunology* 2009;39:1564-72.
104. Carvalho FA, Aitken JD, Vijay-Kumar M, Gewirtz AT. Toll-like receptor-gut microbiota interactions: perturb at your own risk! *Annual review of physiology* 2012;74:177-98.
105. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011;473:174-80.
106. Honda K, Takeda K. Regulatory mechanisms of immune responses to intestinal bacteria. *Mucosal immunology* 2009;2:187-96.
107. Miller JD, van der Most RG, Akondy RS, et al. Human effector and memory CD8+ T cell responses to smallpox and yellow fever vaccines. *Immunity* 2008;28:710-22.
108. Giraldo NA, Bolanos NI, Cuellar A, et al. T lymphocytes from chagasic patients are activated but lack proliferative capacity and down-regulate CD28 and CD3zeta. *PLoS neglected tropical diseases* 2013;7:e2038.
109. Neefjes J, Jongsma ML, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature reviews Immunology* 2011;11:823-36.
110. Sancho D, Gomez M, Sanchez-Madrid F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends in immunology* 2005;26:136-40.
111. Langrish CL, Buddle JC, Thrasher AJ, Goldblatt D. Neonatal dendritic cells are intrinsically biased against Th-1 immune responses. *Clinical and experimental immunology* 2002;128:118-23.
112. Mueller A, Kelly E, Strange PG. Pathways for internalization and recycling of the chemokine receptor CCR5. *Blood* 2002;99:785-91.
113. Strioga M, Pasukoniene V, Characiejus D. CD8+ CD28- and CD8+ CD57+ T cells and their role in health and disease. *Immunology* 2011;134:17-32.
114. Jin B, Sun T, Yu XH, Yang YX, Yeo AE. The effects of TLR activation on T-cell development and differentiation. *Clinical & developmental immunology* 2012;2012:836485.
115. Kindt S, Van Oudenhove L, Broekaert D, et al. Immune dysfunction in patients with functional gastrointestinal disorders. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 2009;21:389-98.
116. Wood KL, Twigg HL, 3rd, Doseff AI. Dysregulation of CD8+ lymphocyte apoptosis, chronic disease, and immune regulation. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2009;14:3771-81.
117. Triplett TA, Curti BD, Bonafede PR, Miller WL, Walker EB, Weinberg AD. Defining a functionally distinct subset of human memory CD4+ T cells that are CD25POS and FOXP3NEG. *European journal of immunology* 2012;42:1893-905.
118. Alari-Pahissa E, Notario L, Lorente E, et al. CD69 does not affect the extent of T cell priming. *PloS one* 2012;7:e48593.
119. Noji S, Hosoi A, Takeda K, et al. Targeting spatiotemporal expression of CD137 on tumor-infiltrating cytotoxic T lymphocytes as a novel strategy for agonistic antibody therapy. *J Immunother* 2012;35:460-72.

120. Lopez-Colombo A, Morgan D, Bravo-Gonzalez D, Montiel-Jarquín A, Mendez-Martínez S, Schmulson M. The epidemiology of functional gastrointestinal disorders in Mexico: a population-based study. *Gastroenterology research and practice* 2012;2012:606174.
121. Smith PD, Smythies LE, Shen R, Greenwell-Wild T, Gliozzi M, Wahl SM. Intestinal macrophages and response to microbial encroachment. *Mucosal immunology* 2011;4:31-42.
122. Smythies LE, Maheshwari A, Clements R, et al. Mucosal IL-8 and TGF-beta recruit blood monocytes: evidence for cross-talk between the lamina propria stroma and myeloid cells. *Journal of leukocyte biology* 2006;80:492-9.
123. Bain CC, Scott CL, Uronen-Hansson H, et al. Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6C(hi) monocyte precursors. *Mucosal immunology* 2012.
124. Tamoutounour S, Henri S, Lelouard H, et al. CD64 distinguishes macrophages from dendritic cells in the gut and reveals the Th1-inducing role of mesenteric lymph node macrophages during colitis. *European journal of immunology* 2012;42:3150-66.
125. Lawrence T, Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nature reviews Immunology* 2011;11:750-61.
126. De Calisto J, Villablanca EJ, Mora JR. FcγRI (CD64): an identity card for intestinal macrophages. *European journal of immunology* 2012;42:3136-40.
127. Hunter MM, Wang A, Parhar KS, et al. In vitro-derived alternatively activated macrophages reduce colonic inflammation in mice. *Gastroenterology* 2010;138:1395-405.
128. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of clinical investigation* 2012;122:787-95.
129. Barbara G, Zecchi L, Barbaro R, et al. Mucosal permeability and immune activation as potential therapeutic targets of probiotics in irritable bowel syndrome. *Journal of clinical gastroenterology* 2012;46 Suppl:S52-5.
130. Saadi M, McCallum RW. Rifaximin in irritable bowel syndrome: rationale, evidence and clinical use. *Therapeutic advances in chronic disease* 2013;4:71-5.
131. Grimm MC, Pavli P, Van de Pol E, Doe WF. Evidence for a CD14+ population of monocytes in inflammatory bowel disease mucosa--implications for pathogenesis. *Clinical and experimental immunology* 1995;100:291-7.
132. Inoue T, Tsuzuki Y, Matsuzaki K, et al. Blockade of PSGL-1 attenuates CD14+ monocytic cell recruitment in intestinal mucosa and ameliorates ileitis in SAMP1/Yit mice. *Journal of leukocyte biology* 2005;77:287-95.
133. Ghosh TK, Mickelson DJ, Solberg JC, Lipson KE, Inglefield JR, Alkan SS. TLR-TLR cross talk in human PBMC resulting in synergistic and antagonistic regulation of type-1 and 2 interferons, IL-12 and TNF-alpha. *International immunopharmacology* 2007;7:1111-21.
134. Merlo A, Calcaterra C, Menard S, Balsari A. Cross-talk between toll-like receptors 5 and 9 on activation of human immune responses. *Journal of leukocyte biology* 2007;82:509-18.
135. Lathrop SK, Bloom SM, Rao SM, et al. Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. *Nature* 2011;478:250-4.

From Cytokines to Toll-Like Receptors and Beyond - Current Knowledge and Future Research Needs in Irritable Bowel Syndrome

Oscar Rodríguez-Fandiño, MSc¹, Josélin Hernández-Ruiz, PhD² and Max Schmulson, MD^{1*}

¹Laboratory of Liver, Pancreas and Motility (HIPAM), Department of Experimental Medicine, Facultad de Medicina-Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México, ²Department of Clinical Research, Hospital General de México, México

The irritable bowel syndrome (IBS) is a complex disorder in which psychosocial, cultural and biological factors, interact. Recent knowledge in the pathophysiology of IBS, seem to combine issues such as a low grade inflammation or immune activation and dysbiosis that can trigger or exacerbate IBS. On the other hand, stress mediated through the hypothalamic-pituitary-adrenal axis can produce motility abnormalities that can modify the microbiota as well, with the subsequent immune activation in the mucosa and stimulation of nerve terminals, generating symptoms of IBS. Also, we speculate that, stress, dysbiosis or an underlying genetic predisposition, may increase the epithelial permeability leading to a contact between pathogens-associated molecular patterns and toll-like receptors in the deeper layers of the gut, developing a host immunity response and IBS generation. We believe that the role of toll-like receptors in IBS and elucidating the communication processes between the immune and the nervous system, warrant future research.

(*J Neurogastroenterol Motil* 2010;16:363-373)

Key Words

Immunity, Mucosal; Irritable bowel syndrome; Stress, psychological; Toll-like receptors

Introduction

Traditionally, irritable bowel syndrome (IBS) has been considered a functional gastrointestinal disorder (FGID), characterized by pain or discomfort associated with changes in bowel habit, such as diarrhea, constipation or alternating/mixture.¹ As with other FGIDs, in IBS there is no evidence of organic, biochemical or structural abnormalities; however, recent data are shaping new concepts. Currently, IBS is diagnosed based on clin-

ical symptoms by the Rome criteria, in the absence of alarm signs; but patients usually undergo exhaustive diagnostic evaluations looking for organic gastrointestinal pathologies before the diagnosis is accepted by both patients and physicians.² Despite this, IBS is the most common FGID and may affect up to 20% of the adult population in industrialized and non industrialized countries. For example, in non industrialized countries, a 16% prevalence of IBS has been reported in the community, and up to 35% among volunteers.³⁻⁵ Furthermore, it is the first reason for consultation to gastroenterologists.⁵

Received: June 23, 2010 Revised: August 18, 2010 Accepted: August 21, 2010

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

*Correspondence: Max Schmulson, MD

Laboratory of Liver, Pancreas and Motility (HIPAM), Department of Experimental Medicine, Faculty of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Hospital General de México, Dr. Balmis 148, Col. Doctores CP 06726, México DF, México
Tel: +52-55-5623-2673, Fax: +52-55-5623-2669, E-mail: maxjulio@prodigy.net.mx

Financial support: This study was supported in part by grant PAPIIT, IN-210010 of DGAPA, Universidad Autónoma de México (UNAM).

Conflicts of interest: None.

In recent years, new concepts have changed the main interest in IBS, energizing a growing group of gastroenterologists and scientists around the world. On the one hand, data from several groups have begun to blur the division between functional and organic disorders.⁶ For example, the recognition of inflammation in IBS, albeit its low grade,⁷ the participation of this inflammatory response on gut motility and sensitivity⁸ and finally the fact that IBS could represent an abnormal mucosal response to an altered intestinal microbiota, echoing current theories on inflammatory bowel disease (IBD),⁹ could answer the long time considered convergence between IBD, celiac disease and IBS.⁷ Additionally, there is evidence implicating gastrointestinal infections in the pathogenesis of IBS, the so called post-infectious IBS (PI-IBS).¹⁰ With this information, a rapidly growing body of evidence has supported a low grade inflammation¹¹⁻¹³ and an altered fecal microbiota condition related to the pathogenesis of IBS.^{14,15} On the other hand, some antibiotics and probiotics have proven to reduce symptoms, leading to a new understanding of IBS.

Issues of Interest in the Pathophysiology of IBS

1. Genetic factors

During the last decade, studies on familial aggregation¹⁶ and on twins¹⁷ have supported the involvement of hereditary factors in the pathogenesis of IBS. However, the lack of consistent findings that support a specific genetic mechanism in IBS based on symptom phenotypes, has lead to a different approach: the examination candidate genes associations with FGIDs and with the underlying abnormalities in gastrointestinal and colonic physiology.¹⁸ Examples of this approach include the association of IBS with IL-10, serotonin transporter, alpha-2 adrenergic receptors and G protein functions. Gonsalkorale et al¹⁹ and van der Veek et al²⁰ reported an association of IL-10 low producer polymorphism with the presence of IBS in different populations.²¹ The above findings have suggested a genetic predisposition for a reduced anti-inflammatory response, mediated by a lower production of this regulatory cytokine. Additionally, this pro-inflammatory condition could be synergistically stimulated, if patients have a higher production of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), as has been related by high producer polymorphisms in patients compared to healthy controls.²⁰

Recently, as a consequence of a gastroenteritis outbreak fol-

low-up, Villani et al²² evaluated the genetic risk factors in patients with PI-IBS, reporting statistically significant relationships with several genes. The most striking features were the relationships between the immunity related toll-like receptor 9 (TLR9), IL-6 and adhesion E-cadherin 1 polymorphism genes, as risk factors.

2. Stress

Since the stress concept was borrowed from physics, Hans Selye²³ identified the gut, along with the endocrine and immune systems, as the main targets altered by chemical and physical challenges. Recently, there have been several studies relating stressful events (psychological stressors) with the development of FGIDs such as IBS or symptom exacerbation,²⁴⁻²⁶ which intend to elucidate the stress related mechanisms that influence the pathophysiology of this disorder.

The release of corticotrophin-releasing factor (CRF) from the hypothalamus, in response to diverse physical and psychological stressors, plays a major role in orchestrating the behavioral, neuroendocrine and autonomic responses to stress.^{27,28} The hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and the sympathetic nervous system are the 2 core branches of this stress response system. Abnormalities in the stress response in the form of changes in adrenocorticotrophin hormone, cortisol and catecholamine levels, have been reported in IBS.²⁹ In fact, the importance of CRF has led research to develop CRF antagonists as possible treatments for IBS.³⁰

Additionally, alterations in the HPA axis have received much attention due to its possible implication in a non-standard immune activation in the gut wall,³¹ and in symptom exacerbation in different IBS subgroups.³² This non-standard immune activation is represented by an abnormal mucosal response to an altered microbiota including an increase infiltration of mononuclear, mast and enteroendocrine cells in the colonic mucosa, but without a frank histological inflammation by light microscopy and absence of clinical and laboratory markers of inflammation.⁹

Also, in order to solve the therapeutic needs related to these factors, several groups have turned their scope to exploring the efficacy of probiotics, mainly due to the potential effects that can be developed by gut derived flora, in symptom improvement (pain and discomfort) and low grade inflammation in the intestinal mucosa, probably through several mechanisms and interactions, including possible modifications of the HPA axis balance.³³

3. IBS and the involved immunological response

Several groups have been reporting evidences that suggest the development of low grade inflammation in the gut mucosa (Table 1), mainly in patients with PI-IBS.³⁴ Almost 20 years ago, Salzman et al³⁵ suggested an increased infiltration of mononuclear cells in the lamina propria of patients with IBS. On the other hand, the majority of individuals that suffer an acute gastroenteritis recover completely after the infectious agent is cleared, but a significant group develops FGIDs, such as IBS, functional dyspepsia or both.^{6,36} It is remarkable that non-gastrointestinal infections have also been reported as risk factors for the development of IBS.³⁷

1) Low grade inflammation-immune activation

The concept of low grade inflammation has been coined by several groups, and as previously mentioned, it is described as an increased infiltration in the colonic mucosa of T lymphocytes, mast cells and enteroendocrine cells (Fig. 1).^{31,38,39} However, the term low immune activation is probably more appropriate. The

higher number of mast cells present in colonic biopsies, which has been reported as a key immunological trait of IBS patients, is an important issue.^{31,32,40,41} In fact, a higher number of mast cells in proximity to the colon sensory nerves³¹ have been correlated with the severity and frequency of abdominal pain,⁴⁰ bloating,³² and probably with rectal hypersensitivity.³⁸ It is noteworthy that Cremon et al³² reported higher numbers of T and mast cells in about 50% of the IBS patients. Their study compared the percentage of colonic mucosa infiltrated by immune cells in patients with IBS and those with truly inflammatory conditions, such as IBD (eg, microscopic colitis, inactive and active ulcerative colitis) and healthy controls, finding intermediate infiltration levels in IBS patients compared to controls, but lower levels when compared to patients with IBD. The authors concluded that inflammation could be a common pathophysiological factor triggering each one of these disorders, where IBS and IBD might represent the 2 ends of a wide spectrum of chronic inflammatory conditions.

Table 1. Immunological Abnormalities and Microbiota-Gut Interactions in Irritable Bowel Syndrome

Study	Findings	Relevance in IBS
Chadwick et al, ¹¹ 2002	Increased numbers of intraepithelial CD3+ and CD25+ lymphocytes	Low grade inflammation
Gwee et al, ¹² 2003	Increased numbers of neutrophils and mast cells Greater IL-1 β mRNA expression during acute gastroenteritis, > 3 months after clearing the infection	Increased production of pro-inflammatory cytokines
Barbara et al, ³¹ 2004	Activated mast cells in proximity of colonic nerve endings	Correlated with the severity and frequency of abdominal pain/discomfort
O'Mahony et al, ⁶³ 2005	Altered IL-10/IL-12 ratio, indicative of a pro-inflammatory state, normalized with <i>B infantis</i>	Correlated with improvement in the patients symptom scores
Kassinen et al, ¹⁵ 2007	A significantly altered fecal microbiota in IBS	The microbial composition varies between IBS subtypes and controls
Liebrechts et al, ¹³ 2007	Higher TNF- α , IL-1 β , IL-6 at baseline, and IL-6 levels after LPS induction	Pro-inflammatory cytokines differences according to bowel habit predominance
Cremon et al, ³² 2009	IBS-D presented higher levels of cytokines than IBS-C Higher percentage of mucosal immune cells in IBS patients compared to controls, but lower than IBD	Inflammatory conditions as a continuum: Healthy-IBS-IBD.
Piche et al, ⁷⁸ 2009	Greater number of mast cells in women than men with IBS Changes in intestinal barrier integrity due to paracellular permeability and tight-junction protein expression	Immune activation is gender dependent Increased permeability in the gut
Öhman et al, ^{39,52} 2009	Increased T and B cell activation and reduced proliferation in IBS patients with gut homing phenotype	Increased immunological activity directed towards the bowel
Villani et al, ²² 2010	Genetic risk factors related with acute gastroenteritis that involved immunity and permeability genes (TLR9, IL-6 and CDH1)	Genetic predisposition to abnormalities in immunity and permeability

IBS, irritable bowel syndrome; LPS, lipopolysaccharide; IBS-D, diarrhea predominant-IBS; IBS-C, constipation predominant-IBS; IBD, inflammatory bowel disease; TLR9, toll-like receptor 9; CDH1, E-cadherin 1.

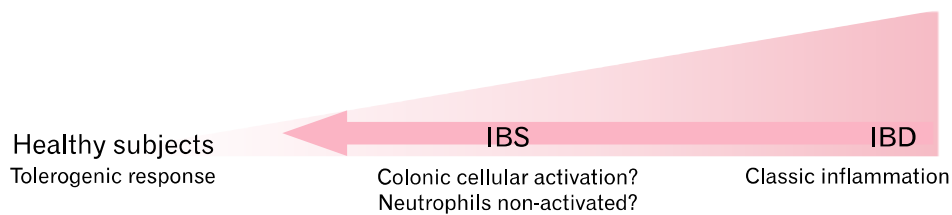


Figure 1. Possible immunological responses in the gut mucosa related to developing bowel disorders. In healthy controls there is a tolerogenic reaction towards commensal microorganisms. However, it is possible that bacterial populations present in some patients or a genetic predisposition, may shift the response towards an immune activation in irritable bowel syndrome (IBS) or to a full-blown inflammatory response in inflammatory bowel disease (IBD).

2) Mast cells

Mast cells are distributed along the digestive tract and in all layers of the intestinal wall, and might be in a permanent state of alert or activation due to the continuous presence of potential antigens within the gastrointestinal lumen.⁴² Furthermore, mast cell functions are diverse. Traditionally, they have been considered as the key effectors cells of allergic reactions. These cells could also be of major importance in recruiting and activating eosinophils, B and T cells in activated state (presence of CD4+ and CD25+ markers).^{43,44} On the other hand, mast cells have been involved in the communication with intrinsic and extrinsic nerves to modulate sensory and motility functioning.⁴⁵ It is important to note that the resulting reactions from the mediators released by the above mentioned cells include responses in the enteric nervous system, visceral hyperalgesia and an increased mucosal permeability, as well as the generation of symptoms, such as changes in bowel habit and abdominal pain.^{33,44}

3) Enteroendocrine and other immune cells

Other immune cell types have also been observed to be increased in patients with IBS. That is the case for enteroendocrine cells, which have been related to PI-IBS.⁴⁶ In this subgroup of patients, enteroendocrine cells have been reported to be present in higher numbers than in any other IBS subgroup.⁴⁷ Additionally, neutrophils have been reported to be augmented in the gut mucosa of patients and in animal models, but unlike the above immune cells (mast cells and enteroendocrine cells) these observations seem to be scarce^{11,48} and possibly this cellular population is not an important mediator of the low immune activation present in IBS. In addition, the presence of neutrophils would imply a full-blown inflammatory process (Fig. 1).⁴⁹

4) Lymphocytes

Chadwick et al,¹¹ reported increased numbers of T cells expressing CD25+ in the lamina propria of the colon that could be related with the low immune activation in the bowel.⁵⁰ Recently, it

has been hypothesized that CD4+ CD25+ T regulatory (Treg) cells are reduced in numbers and in their functional capabilities, producing an inadequate suppression of intestinal inflammatory activity.⁵¹ However, research data from Holmén et al⁵¹ did not find a significant difference in the mRNA expression of the FoxP3 - a specific marker of Treg cells -, between IBS patients and healthy controls, or in the suppressive activity of the peripheral CD4+ CD25+ cells from patients and controls. Despite the above research, the study was not able to rule out the possibility that the colonic Treg cells are dysfunctional in vivo or that alteration of other mucosal immunological cells with suppressive activity could be associated with the low grade inflammation that is found in the gut of patients with IBS.⁵¹

Recently, Öhman et al,³⁹ reported several alterations in peripheral blood T cells, such as the presence of CD69+ lymphocytes (early activation) and the integrin alpha4beta7, receptor (intestinal homing) (Fig. 2). The same group⁵² also described a state of B cell activation, finding increased CD80 and CD86 expression, at least in a subpopulation of IBS patients. In addition, the slight but significant difference in the over expression of IgG and alpha4beta7, together with the increased expression of CD80 and CD86, suggests that IBS patients also have increased B cell activation in the extra-intestinal lymph nodes.⁵² In order to explain this cellular infiltrate, Öhman and Simrén⁴⁷ suggested 2 possible explanations: (1) It could be due to an unregulated mild inflammation or (2) It can reflect a potent inflammatory suppressive process led by activated T lymphocytes. However, as of today, the profile of cytokines released by mast cells, enteroendocrine cells, T and B lymphocytes and Treg cells in IBS, as well as the level of activation of the infiltrated lymphocytes in the gut mucosa of these patients, is unknown.

5) IBS and microscopic colitis

The finding of increased numbers of T cells in the lamina propria of the colon in a subgroup of IBS patients,¹¹ may need to

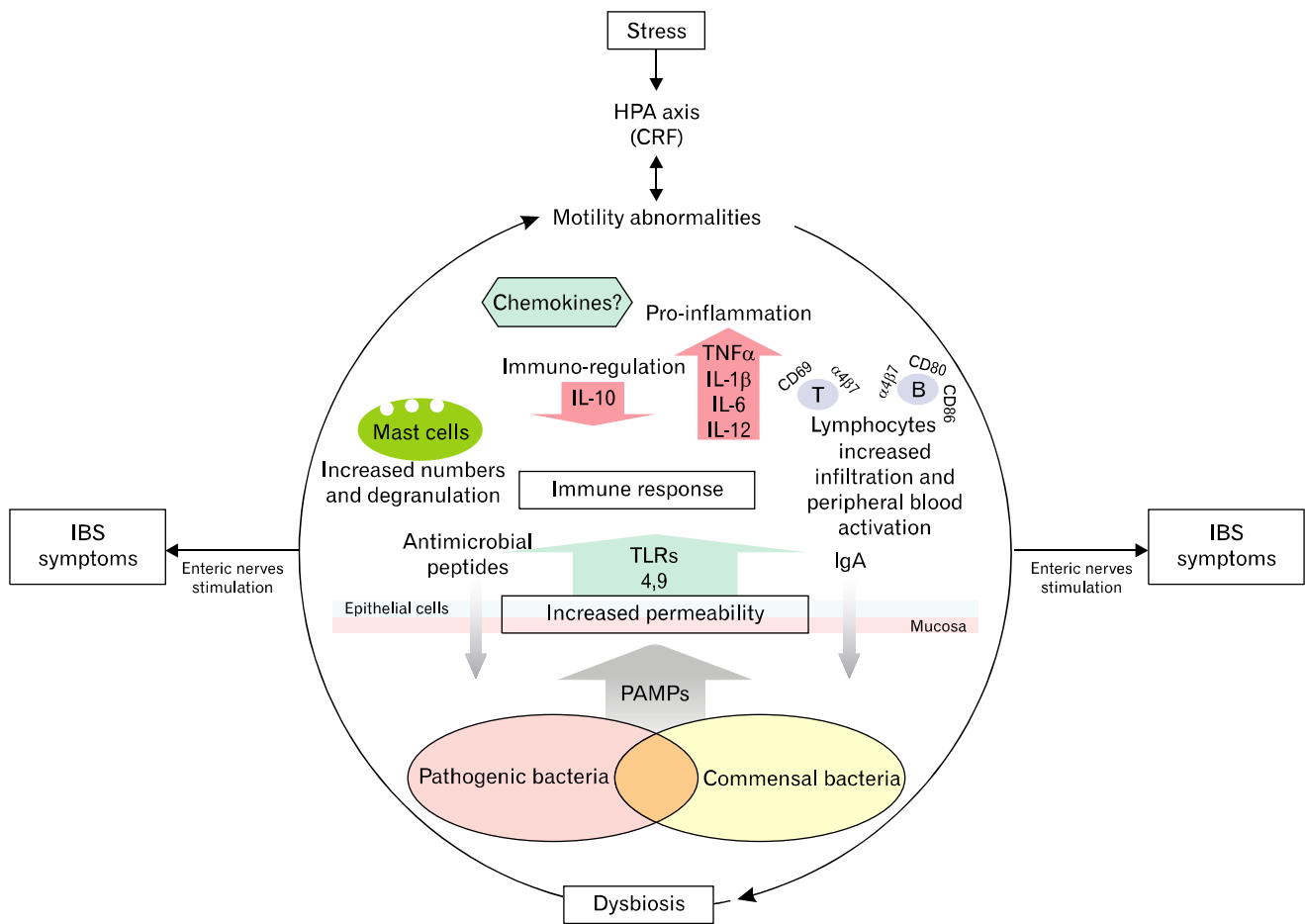


Figure 2. Integrative model of irritable bowel syndrome (IBS) pathophysiology. IBS can develop from centrally dominant factors such as stress or luminal factors like dysbiosis triggering an altered immune response. Stress alters gastrointestinal motility mediated through the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, and these motility abnormalities can modify the microbiota with the subsequent immune activation in the mucosa and stimulation of nerve terminals, generating symptoms of IBS. On the other hand, dysbiosis related to gastrointestinal infections, small intestine bacterial overgrowth or antibiotics may increase the epithelial permeability leading to contact between pathogens-associated molecular patterns (PAMPs) and toll-like receptors (TLRs) in the deeper layers of the gut with the subsequent host immunity response and IBS generation or symptom exacerbation. CRF, corticotrophin-releasing factor.

be differentiated from the presence of microscopic colitis. Microscopic colitis is a syndrome of chronic watery diarrhea with a chronic inflammatory cell infiltrate in the colonic mucosa, a normal colonic appearance in the colonoscopy and no laboratory abnormalities, therefore, the clinical presentation may be indistinguishable from diarrhea predominant-IBS (IBS-D).^{53,54} In fact, Limsui et al⁵⁵ have reported that 41% to 56% of patients with microscopic colitis, met symptom criteria for IBS. Also, Chey et al⁵⁶ found that the overall prevalence of microscopic colitis in suspected IBS patients is 1.5% and 2.3% in those older than 45 years. On the other hand, classic microscopic colitis encompasses 2 subgroups, collagenous colitis and lymphocytic

colitis.⁵³ The first one has an abnormally thickened subepithelial collagen band and the second one, has increased intraepithelial lymphocytes (IELs).⁵³ Therefore, lymphocytic colitis may be similar with IBS respect to low grade inflammation, however, in microscopic colitis the IELs are increased from 5 per 100 surface epithelial cells in normal subjects, to 20 or more per 100 epithelial cells.⁵⁷ Hence, colonoscopy with multiple biopsies is crucial to rule out microscopic colitis^{53,54} and to differentiate it from IBS. Furthermore, very recent data presented in abstract form have confirm that there is no difference between IBS and controls in the number of IELs from the cecum, transverse and sigmoid colon, and both groups have less than 10 IELs×100 enterocytes,⁵⁸

confirming the last statement.

4. Immune response molecules

The gastrointestinal tract, as well as other organs lined with mucosal tissue, is the first line of defense against luminal antigens and environmental pathogens. The epithelial cells in the mucosa form a layer that avoids the paracellular transit of substances with high molecular weight, such as pathogens or antigens. Also these cells produce large amounts of mucus and secrete anti-microbial peptides which limit bacterial populations.⁵⁹ Under physiological conditions this epithelial barrier is not completely impermeable to all bacteria, developing a tolerogenic immune response.⁶⁰ On the other hand, bacteria or other antigens pass through the paracellular space, leading to a local and transitory pro-inflammatory cytokine production that can slightly inhibit invasion^{60,61} by microorganisms (Fig. 2). This response occurs rapidly and does not trigger a measurable systemic pro-inflammatory state.⁶¹

1) Cytokines

Research on the immunological response in IBS has been led by the analysis of differences in cytokines expression. Cytokines are intercellular signaling proteins, mainly produced by immune cells (mast cells, macrophages, glial cells and lymphocytes in proximity with afferent primary non-adrenergic non-cholinergic nerves in the gut mucosa). Their main function is to regulate and coordinate the immunological response,⁶² but they could also play an important role in the development of motor dysfunction, visceral pain and anxiety or depression, mediated by the CNS.^{29,62} Gwee et al¹² opened a research path, when finding higher levels of IL-1 β mRNA expression in IBS patients both shortly after a gastrointestinal infection and three months after the infection was cleared. Later, O'Mahony et al⁶³ reported an abnormal ratio of immunoregulatory/proinflammatory IL-10/IL-12 cytokines in non-stimulated peripheral blood mononuclear cells from patients with IBS, indicating an inflammatory state in these patients. In addition, the authors related the normalization of this cytokine ratio and the significant symptomatic relief to the use of a probiotic, the *Bifidobacterium infantis* 35624. Recently, Liebrechts et al¹³ reported a markedly higher basal and lipopolysaccharide stimulated levels of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α and IL-6) released from peripheral blood mononuclear cells in patients with IBS. Moreover, the authors suggested that pro-inflammatory cytokines can partly explain symptom manifestations.¹³ More recently, O'Mahony et al⁶⁴ evidenced a higher IFN- γ and TNF- α production from whole blood stimulated with lipopolysaccharide in an animal model relevant for IBS (rat maternal separation)

compared to non-stressed rats. Also, Clarke et al⁶⁵ using the same rat model, showed correlations between the IL-6 and the polyunsaturated fatty acid profile (negative correlations with omega-3 total levels, and positive correlations with the omega-6/omega-3 ratio), suggesting a phenotype that is primed for immune activation. Also, several other pro-inflammatory (IL-2, IL-12, IL-17 and IL-18) and anti-inflammatory (IL-4 and IL-13) cytokines have been shown to be present in a lesser extent in IBS.⁶²

2) Role of cytokines

The specific roles displayed by cytokines in IBS patients are not fully established. Microarray studies have supported the hypothesis of an immune activation, as they have shown a reduced expression of immunoregulatory cytokines together with an over expression of the pro-inflammatory ones.⁶⁶ However, the cytokines are able to start several processes in different cellular types. For example, in vitro studies have demonstrated neuronal activation, probably mediated by glial cells, based on the fact these cells have a high density of receptors for cytokines and chemokines.⁶⁷ The above suggests neuronal excitation mediated by intermediate cellular populations (glial cells). When stimulated by cytokines, the glial and endothelial cells locally release nitric oxide, arachidonic acid, prostaglandins, oxygen reactive species and excitatory aminoacids (mainly glutamate), which could modify the neuronal activity.⁶⁸ Also, glial cells can produce chemokines which in turn can induce attraction of immunological cells, amplifying the inflammatory signals.^{68,69}

3) Chemokines

However, the roles played by chemokines in IBS are not yet fully understood, and only a small number of studies have reported changes in these molecules. For example, Dinan et al^{29,70} reported increased levels of the chemokine IL-8/CXCL8. At the same time, MacSharry et al⁶⁶ reported reduced levels in both the expression and secretion levels of chemokines (IL-8/CXCL8; CXCL9 and monocyte chemoattractant protein-1) in the colonic mucosa of IBS patients. The above findings are controversial and warrant the search of additional markers (eg, lactoferrin, calprotectin, reactive C protein and myeloperoxidase) that can become biomarkers in IBS and that can explain the underlying biological mechanisms as well.⁷¹

5. Toll-like receptors

The innate immune system is the first line of defense and is promptly activated against pathogens or tissue damage, after the recognition of several pathogens-associated molecular patterns (PAMPs) or danger associated molecular patterns (DAMPs).⁷²

The most studied receptors for PAMPs and DAMPs are the TLRs, which have a significantly specific response in the innate immunity.⁷³ Phylogenetic analysis classifies the TLRs in three main branches, which seem to correspond with the recognized ligands: (1) TLRs 1, 2, 4, 6 and 10 are involved with lipids recognition, (2) TLRs 5 and 11 recognize proteins and (3) TLRs 3, 7, 8 and 9 are sensitive to nucleic acids.⁷⁴ TLRs display differential expression levels through the gut mucosal layers, with a spatial and cellular specific allocation probably related to their function.

It is remarkable how changes in the integrity of the epithelial barrier or permeability dysfunction lead to contact between PAMPs and TLRs in the deeper layers of the gut and the subsequent host immunity response (Fig. 2).⁷⁵ However, despite the fact that there is not yet a study that has related mucosal permeability with TLRs in IBS patients, research has suggested that permeability abnormalities are related to IBS generation and symptom exacerbation, especially in the PI-IBS and IBS-D subgroups.^{10,76,77} In fact, ex vivo assays have shown an augmented permeability in all IBS subgroups based on bowel habit predominance,⁷⁸ although the mechanisms involved in these changes are unknown. Recent reports have suggested alterations in the tight junction proteins, and their physiological processes are the possible underlying mechanisms of these changes.⁷⁹

Despite the fact that the TLRs are deeply related with some gastrointestinal chronic inflammatory disorders such as ulcerative colitis or Crohn's disease,^{75,80} available data regarding their participation in the pathophysiology of IBS is quite limited. Recently, Brint et al,⁸¹ reported a 5-fold up-regulation of TLR4 in women with IBS compared to healthy controls, while reporting a reduced expression of TLR7 and TLR8 in the same patients.

On the other hand, McKernan et al,⁸² based on a rat model for IBS, reported many differences in the TLRs expression in chronically stressed rats compared to controls. The authors used 2 different models (maternal separation and stress susceptible Wistar-Kyoto rats), showing a significantly higher expression of the TLR3, 4 and 5 on both, while the Wistar-Kyoto which are genetically susceptible to stress, also had a significant over expression in the TLRs 7, 8 and 9 compared to the Sprague-Dawley which are not genetically susceptible to stress. The reasons involved in these differences are not clear; however, alterations in the gut microbiota could be related.

More recently, Villani et al²² evidenced the complex genetic scenario present in the gut mucosa of IBS patients. In this key study, the presence of genetic variants involved with TLR9, IL-6 and intestinal permeability E-cadherin, were found to be in-

dependent risk factors for developing IBS following an episode of acute gastroenteritis.

6. Microbiota interactions

The role of TLRs in the pathophysiology of IBS must be linked to the extremely taxonomically complex and ecologically dynamic community inside the gut, which comprises around 1,000 different species,⁸³ the microbiota⁸⁴ and the fine immune response, developing a tolerogenic reaction towards these commensal microorganisms in addition to the strongly combative response against the pathogenic agents.⁸⁵ An abnormal or unbalanced response is currently considered a relevant issue in explaining the mechanisms underlying IBD. Although the relationship between the gut mucosal response and microbiota has not been completely elucidated in IBS, microbiota alterations due to the use of systemic antibiotics,⁸⁶ small intestine bacterial overgrowth (SIBO)⁸⁷⁻⁸⁹ or acute gastroenteritis,⁹⁰ are extensively considered risk factors for the development of IBS. In contrast, the use of some probiotics has proven to be effective in improving symptoms of IBS.³⁴

Despite the complexity of the gut flora ecosystem, some commensal microorganisms have been significantly related to IBS, including increased *Clostridium perfringens* (or more diverse *Clostridium* spp. in general) or decreased *Bifidobacteria*.⁹¹⁻⁹³ Similarly, Codling et al⁹⁴ reported higher gut microbial instability and diversity in controls compared to patients. In addition to the related immune mechanisms, very recently Tana et al⁹⁵ also introduced the concept of the association of organic acids produced by bacterial fermentation derived from higher levels of *Veillonella* and *Lactobacillus* spp. with IBS. In summary, the available data has suggested the presence of a dysbiotic microbiota, especially in patients with IBS-D, even though the overall structure is similar between patients and healthy controls.⁹⁶

Finally, Collins et al⁹⁷ have proposed that contrary to what occurs in normal subjects following a gastrointestinal infection or after the use of antibiotics, where the changes of microbiota are temporary and completely restored, in patients with IBS a vicious cycle is developed, where intestinal physiological changes, could lead to modifications of the bacterial diversity and richness. In addition, modifications in the microbiota, may trigger changes in the motor function and gut sensitivity, and perhaps produce a positive feedback sustaining the motility abnormalities and visceral hypersensitivity (Fig. 2).

Conclusion

In recent years there has been an increase in the knowledge of the pathophysiological mechanisms related to IBS. However, the evidence obtained from other chronic pain syndromes, where biological, psychological and cultural factors interact in a multifactorial fashion similar to what occurs in IBS, suggests that the data from research studies must be used with caution.⁹⁸ Several elements are involved in this complex disorder, including an unbalanced immune response, dysbiosis or abnormalities in the intestinal permeability, all of them interacting to develop IBS. We must highlight that the mechanisms underlying the microbiota and host interaction warrant further research to elucidate the communication processes between the immune and the nervous system. We believe that the TLRs and their subsequent cellular activation and production of messenger molecules in IBS need to be investigated. In addition, the single contribution of each TLR and the interaction between 2 or more of these receptors to induce cellular activation and the mechanisms by which this event can affect the pathophysiology of IBS, also deserves future research.

References

- Schmulson M. Síndrome de intestino irritable. In: Schmulson M, ed. *Clínicas de Gastroenterología de México, Motilidad y Trastornos Funcionales Digestivos*. Asociación Mexicana de Gastroenterología. Volume 1. 1st ed. Mexico DF: Editorial Alfil SA de CV 2008: 109-128.
- Cash BD, Schoenfeld P, Chey WD. The utility of diagnostic tests in irritable bowel syndrome patients: a systematic review. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2812-2819.
- Lopez-Colombo A, Bravo-Gonzalez D, Corona-Lopez A, et al. First community-based study of functional gastrointestinal disorders (FGID) in México using the Rome II modular questionnaire. *Gastroenterology* 2006;130(suppl 2):A508.
- Schmulson M, Ortiz O, Santiago-Lomeli M, et al. Frequency of functional bowel disorders among healthy volunteers in Mexico City. *Dig Dis* 2006;24:342-347.
- Schmulson M, Adeyemo M, Gutiérrez-Reyes G, et al. Differences in gastrointestinal symptoms according to gender in Rome II positive IBS and dyspepsia in a Latin American population. *Am J Gastroenterol* 2010;105:925-932.
- Gwee KA. Post-infectious irritable bowel syndrome, an inflammation-immunological model with relevance for other IBS and functional dyspepsia. *J Neurogastroenterol Motil* 2010;16:30-34.
- Quigley EM. Irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease: interrelated diseases? *Chin J Dig Dis* 2005;6:122-132.
- Bercik P, Verdú EF, Collins SM. Is irritable bowel syndrome a low grade inflammatory disease? *Gastroenterol Clin North Am* 2005;34: 235-245.
- Keohane J, O'Mahony C, O'Mahony L, O'Mahony S, Quigley EM, Shanahan F. Irritable bowel syndrome-type symptoms in patients with inflammatory bowel disease: a real association or reflection of occult inflammation? *Am J Gastroenterol* 2010;105:1788, 1789-1794.
- Spiller RC, Jenkins D, Thornley JP, et al. Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T lymphocytes, and increased gut permeability following acute *Campylobacter* enteritis and in post-infectious irritable bowel syndrome. *Gut* 2000;47:804-811.
- Chadwick VS, Chen W, Shu D, et al. Activation of the mucosal immune system in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2002; 122:1778-1783.
- Gwee KA, Collins SM, Read NW, et al. Increased rectal mucosal expression of interleukin 1 beta in recently acquired post-infectious irritable bowel syndrome. *Gut* 2003;52:523-526.
- Liebrechts T, Adam B, Bredack C, et al. Immune activation in patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2007;132: 913-920.
- Malinen E, Rinttilä T, Kajander K, et al. Analysis of fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients and healthy controls with real-time PCR. *Am J Gastroenterol* 2005;100:373-382.
- Kassinen A, Krogius-Kurikka L, Mäkiyuokko H, et al. The fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients differs significantly from that of healthy subjects. *Gastroenterology* 2007;133:24-33.
- Saito YA, Zimmerman JM, Harmsen WS, et al. Irritable bowel syndrome aggregates strongly in families: a family-based case-control study. *Neurogastroenterol Motil* 2008;20:790-797.
- Bengtson MB, Ronning T, Vatn MH, Harris JR. Irritable bowel syndrome in twins: genes and environment. *Gut* 2006;55:1754-1759.
- Camilleri M. Genetics and irritable bowel syndrome: from genomics to intermediate phenotype and pharmacogenetics. *Dig Dis Sci* 2009;54:2318-2324.
- Gonsalkorale WM, Perrey C, Pravica V, Whorwell PJ, Hutchinson IV. Interleukin 10 genotypes in irritable bowel syndrome: evidence for an inflammatory component? *Gut* 2003;52:91-93.
- van der Veek PP, van den Berg M, de Kroon YE, Verspaget HW, Masclee AA. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene polymorphisms in irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2005;100:2510-2516.
- Gutiérrez-Reyes G, Martínez-García R, Morales-Rochlin N, González M, Corona de Lau C, Schmulson M. Interleukin-10 genotypes in IBS-Rome II subjects in México. *Gastroenterology* 2006; 130(suppl 2):A512.
- Villani AC, Lemire M, Thabane M, et al. Genetic risk factors for post-infectious irritable bowel syndrome following a waterborne outbreak of gastroenteritis. *Gastroenterology* 2010;138:1502-1513.
- Selye H. A syndrome produced by diverse noxious agents. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 1998;10:230-231.
- Barreau F, Cartier C, Leveque M, et al. Pathways involved in gut mucosal barrier dysfunction induced in adult rats by maternal deprivation: corticotrophin-releasing factor and nerve growth factor interplay. *J Physiol* 2007;580:347-356.
- Taché Y, Brunhuber S. From Hans Selye's discovery of biological stress to the identification of corticotropin-releasing factor signaling

- pathways implication in stress-related functional bowel diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1148:29-41.
26. Stengel A, Taché Y. Neuroendocrine Control of the gut during stress: corticotropin-releasing factor signaling pathways in the spotlight. *Annu Rev Physiol* 2009;71:219-239.
 27. Fish EW, Shahrokh D, Bagot R, et al. Epigenetic programming of stress responses through variations in maternal care. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1036:167-180.
 28. Chang L, Sundaresh S, Elliott J, et al. Dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2009;21:149-159.
 29. Dinan TG, Quigley EM, Ahmed SM, et al. Hypothalamic-pituitary-gut axis dysregulation in irritable bowel syndrome: plasma cytokines as a potential biomarker? *Gastroenterology* 2006;130:304-311.
 30. Martinez V, Taché Y. CRF1 receptors as a therapeutic target for irritable bowel syndrome. *Curr Pharm Des* 2006;12:4071-4088.
 31. Barbara G, Stanghellini V, De Giorgio R, et al. Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2004;126:693-702.
 32. Cremon C, Gargano L, Morselli-Labate AM, et al. Mucosal immune activation in irritable bowel syndrome: gender-dependence and association with digestive symptoms. *Am J Gastroenterol* 2009;104:392-400.
 33. Quigley EM. Probiotics in functional gastrointestinal disorders: what are the facts? *Curr Opin Pharmacol* 2008;8:704-708.
 34. Rijniere A, Nijkamp FP, Kraneveld AD. Mast cells and nerves tickle in the tummy: implications for inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome. *Pharmacol Ther* 2007;116:207-235.
 35. Salzman JL, Peltier-Koch F, Bloch F, Petite JP, Camilleri JP. Morphometric study of colonic biopsies: a new method of estimating inflammatory diseases. *Lab Invest* 1989;60:847-851.
 36. Barbara G, Cremon C, Pallotti F, De Giorgio R, Stanghellini V, Corinaldesi R. Postinfectious irritable bowel syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009;48(suppl 2):S95-S97.
 37. McKeown ES, Parry SD, Stansfield R, Barton JR, Welfare MR. Postinfectious irritable bowel syndrome may occur after non-gastrointestinal and intestinal infection. *Neurogastroenterol Motil* 2006;18:839-843.
 38. Park JH, Rhee PL, Kim G, et al. Enteroendocrine cell counts correlate with visceral hypersensitivity in patients with diarrhea predominant irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2006;18:539-546.
 39. Öhman L, Isaksson S, Lindmark AC, et al. T-Cell activation in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2009;104:1205-1212.
 40. Barbara G, Wang B, Stanghellini V, et al. Mast cell-dependent excitation of visceral-nociceptive sensory neurons in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2007;132:26-37.
 41. Walker MM, Talley NJ, Prabhakar M, et al. Duodenal mastocytosis, eosinophilia and intraepithelial lymphocytosis as possible disease markers in the irritable bowel syndrome and functional dyspepsia. *Aliment Pharmacol Ther* 2009;29:765-773.
 42. Argenzio RA. Neuro-immune pathobiology of infectious enteric disease. *Adv Exp Med Biol* 1997;412:21-29.
 43. Nakae S, Suto H, Kakurai M, Sedgwick J, Tsai M, Galli S. Mast cells enhance T cell activation: importance of mast cell-derived TNF. *PNAS* 2005;102:6467-6472.
 44. Bischoff SC. Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. *Nat Rev Immunol* 2007;7:93-104.
 45. Barbara G, Stanghellini V, De Giorgio G, Corinaldesi R. Functional gastrointestinal disorders and mast cells: implications for therapy. *Neurogastroenterol Motil* 2006;18:6-17.
 46. Dunlop SP, Jenkins D, Neal KR, Spiller RC. Relative importance of enterochromaffin cell hyperplasia, anxiety and depression in post-infectious IBS. *Gastroenterology* 2003;125:1651-1659.
 47. Ohman L, Simrén M. New insights into the pathogenesis and pathophysiology of irritable bowel syndrome. *Dig Liver Dis* 2007;39:201-215.
 48. Bradesi S, Schwetz I, Ennes HS, et al. Repeated exposure to water avoidance stress in rats: a new model for sustained hyperalgesia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;289:G42-G53.
 49. Collins SM. A case for an immunological basis for irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2002;122:2078-2080.
 50. Foell D, Wittkowski H, Roth J. Monitoring disease activity by stool analyses: from occult blood to molecular markers of intestinal inflammation and damage. *Gut* 2009;58:859-868.
 51. Holmén N, Isaksson S, Simrén M, Sjövall H, Öhman L. CD4+ CD25+ regulatory T cells in irritable bowel syndrome patients. *Neurogastroenterol Motil* 2007;19:119-125.
 52. Öhman L, Lindmark AC, Isaksson S, et al. B-cell activation in patients with irritable bowel syndrome (IBS). *Neurogastroenterol Motil* 2009;21:644-650, e27.
 53. Chang F, Deere H, Vu C. Atypical forms of microscopic colitis: morphological features and review of the literature. *Adv Anat Pathol* 2005;12:203-211.
 54. Fernández-Bañares F. How much symptom overlap is there between microscopic colitis and IBS? *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2007;4:304-305.
 55. Limsui D, Pardi DS, Camilleri M, et al. Symptomatic overlap between irritable bowel syndrome and microscopic colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:175-181.
 56. Chey WD, Nojkov B, Rubenstein JH, Dobhan RR, Greenson JK, Cash BD. The yield of colonoscopy in patients with non-constipated irritable bowel syndrome: results from a prospective, controlled US trial. *Am J Gastroenterol* 2010;105:859-865.
 57. Lazenby AJ, Yardley JH, Giardiello FM, Bayless TM. Pitfalls in the diagnosis of collagenous colitis: experience with 75 cases from a registry of collagenous colitis at the Johns Hopkins Hospital. *Hum Pathol* 1990;21:905-910.
 58. Walker MM, Warwick A, Ung C, et al. The Popcol Study: Epidemiology by endoscopy in a Swedish adult random population. Intraepithelial lymphocyte and eosinophil counts in the normal colon and irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2010;138(suppl 1):S585.
 59. Kraehenbuhl JP, Corbett M. Immunology. Keeping the gut at bay. *Science* 2004;303:1624-1625.
 60. Al-Sadi R, Boivin M, Ma Y. Mechanism of cytokine modulation of epithelial tight junction barrier. *Front Biosci* 2009;14:2765-2778.
 61. Kiank C, Taché Y, Larauche M. Stress-related modulation of inflammation in experimental models of bowel disease and post-infectious irritable bowel syndrome: role of corticotropin-releasing fac-

- tor receptors. *Brain Behav Immun* 2010;24:41-48.
62. Kraneveld AD, Rijnierse A, Nijkamp FP, Garssen J. Neuro-immune interactions in inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome: Future therapeutic targets. *Eur J Pharmacol* 2008;585:361-374.
 63. O'Mahony L, McCarthy J, Kelly P, et al. Lactobacillus and Bifidobacterium in irritable bowel syndrome: symptom responses and relationship to cytokine profiles. *Gastroenterology* 2005;128: 541-551.
 64. O'Mahony SM, Marchesi JR, Scully P, et al. Early life stress alters behavior, immunity and microbiota in rats: implications for irritable bowel syndrome and psychiatric illnesses. *Biol Psychiatry* 2009;65: 263-267.
 65. Clarke G, O'Mahony SM, Hennessy AA, et al. Chain reactions: early-life stress alters the metabolic profile of plasma polyunsaturated fatty acids in adulthood. *Behav Brain Res* 2009;205:319-321.
 66. Macsharry J, O'Mahony L, Fanning A, et al. Mucosal cytokine imbalance in irritable bowel syndrome. *Scand J Gastroenterol* 2008; 43:1467-1476.
 67. Milligan ED, Sloane EM, Watkins LR. Glia in pathological pain: a role for fractalkine. *J Neuroimmunol* 2008;198:113-120.
 68. Guyon A, Massa F, Rovère C, Nahon JL. How cytokines can influence the brain: a role for chemokines? *J Neuroimmunol* 2008;198: 46-55.
 69. Guyon A, Nahon JL. Multiple actions of the chemokine stroma cell-derived factor1 alpha on neuronal activity. *J Mol Endocrinol* 2007;38:365-376.
 70. Dinan TG, Clarke G, Quigley EM, et al. Enhanced cholinergic-mediated increase in the pro-inflammatory cytokine IL-6 in irritable bowel syndrome: role of muscarinic receptors. *Am J Gastroenterol* 2008;103:2570-2576.
 71. Clarke G, Quigley EM, Cryan JF, Dinan TG. Irritable bowel syndrome: towards biomarker identification. *Trends Mol Med* 2009; 15:478-489.
 72. Fukata M, Vamadevan AS, Abreu MT. Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors in inflammatory disorders. *Semin Immunol* 2009;21:242-253.
 73. Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 2010;327:291-295.
 74. Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. Role of Toll-Like receptors in tissue repair and tumorigenesis. *Biochemistry (Mosc)* 2008;73:555-561.
 75. Abreu MT. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol* 2010;10:131-144.
 76. Marshall JK, Thabane M, Garg AX, et al. Intestinal permeability in patients with irritable bowel syndrome after a waterborne outbreak of acute gastroenteritis in Walkerton, Ontario. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;20:1317-1322.
 77. Dunlop SP, Hebden J, Campbell E, et al. Abnormal intestinal permeability in subgroups of diarrhea-predominant irritable bowel syndromes. *Am J Gastroenterol* 2006;101:1288-1294.
 78. Piche T, Barbara G, Aubert P, et al. Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome: involvement of soluble mediators. *Gut* 2009;58:196-201.
 79. Coëffier M, Gloro R, Boukhetala N, et al. Increased proteasome-mediated degradation of occludin in irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2010;105:1181-1188.
 80. Himmel ME, Hardenberg G, Piccirillo CA, Steiner TS, Levings MK. The role of T-regulatory T cells and Toll-like receptors in the pathogenesis of the human inflammatory bowel disease. *Immunology* 2008;125:145-153.
 81. Brint E, MacSharry J, Shanahan F, Quigley EM. 400 Differential expression of Toll-like receptors (TLRS) in Irritable bowel syndrome (IBS). *Gastroenterology* 2009;136(suppl 1):A67.
 82. McKernan DP, Nolan A, Brint EK, et al. Toll-like receptor mRNA expression is selectively increased in the colonic mucosa of two animal models relevant to irritable bowel syndrome. *PLoS One* 2009;4: e8226.
 83. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005;308:1635-1638.
 84. Hattori M, Taylor TD. The human intestinal microbiome: a new frontier of human biology. *DNA Res* 2009;16:1-12.
 85. Honda K, Takeda K. Regulatory mechanisms of immune responses to intestinal bacteria. *Mucosal Immunol* 2009;2:187-196.
 86. Di Stefano M, Corazza GR. The rationale for antibiotics in IBS. *Am J Gastroenterol* 2008;103:2652.
 87. Pimentel M, Chow EJ, Lin HC. Eradication of small intestinal bacterial overgrowth reduces symptoms of irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2000;95:3503-3506.
 88. Pimentel M, Chow EJ, Lin HC. Normalization of lactulose breath testing correlates with symptom improvement in irritable bowel syndrome. A double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Am J Gastroenterol* 2003;98:412-419.
 89. Pimentel M, Lin HC, Enayati P, et al. Methane, a gas produced by enteric bacteria, slows intestinal transit and augments small intestinal contractile activity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 290:G1089-G1095.
 90. Spiller R, Garsed K. Postinfectious irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2009;136:1979-1988.
 91. Si JM, Yu YC, Fan YJ, Chen SJ. Intestinal microecology and quality of life in irritable bowel syndrome patients. *World J Gastroenterol* 2004;10:1802-1805.
 92. Mättö J, Maunukela L, Kajander K, et al. Composition and temporal stability of gastrointestinal microbiota in irritable bowel syndrome - a longitudinal study in IBS and control subjects. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005;43:213-222.
 93. Maukonen J, Satokari R, Mättö J, Söderlung H, Mattilla-Sandholm T, Saarela M. Prevalence and temporal stability of selected clostridial groups in irritable bowel syndrome in relation to predominant faecal bacteria. *J Med Microbiol* 2006;55:625-633.
 94. Codling C, O' Mahony L, Shanahan F, Quigley EM, Marchesi JR. A molecular analysis of fecal and mucosal bacterial communities in irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci* 2010;55:392-397.
 95. Tana C, Umesaki Y, Imaoka A, Handa T, Kanazawa M, Fukudo S. Altered profiles of intestinal microbiota and organic acids may be the origin of symptoms in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2010;22:512-519.
 96. Krogius-Kurikka L, Lyra A, Malinen E, et al. Microbial community analysis reveals high level phylogenetic alterations in the overall gastrointestinal microbiota of diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome sufferers. *BMC Gastroenterol* 2009;9:95.
 97. Collins SM, Denou E, Verdu EF, Bercik P. The putative role of the

intestinal microbiota in the irritable bowel syndrome. *Dig Liver Dis* 2009;41:850-853.

98. Bielefeldt K, Levinthal D. Pieces of a puzzle: Permeability, proinflammatory pathways and pain? *Pain* 2009;146:7-8.

Intestinal recruiting and activation profiles in peripheral blood mononuclear cells in response to pathogen-associated molecular patterns stimulation in patients with IBS

O. RODRÍGUEZ-FANDIÑO,* J. HERNÁNDEZ-RUÍZ,* Y. LÓPEZ-VIDAL,† L. CHARÚA,‡ H. BANDEH-MOGHADDAM,‡ A. MINZONI,§ C. GUZMÁN* & M. SCHMULSON*

*Laboratorio de Hígado, Páncreas y Motilidad (HIPAM), Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina-Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Hospital General de México, México Distrito Federal, México

†Programa de Inmunología Molecular Microbiana, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México Distrito Federal, México

‡Unidad de Coloproctología, Hospital General de México, México Distrito Federal, México

§Departamento de Matemáticas y Mecánica, Instituto de Investigación en Matemáticas Aplicadas y Sistemas, Universidad Nacional Autónoma de México, México Distrito Federal, México

Key Messages

- Peripheral blood mononuclear cells from IBS and controls were cultured with and without stimulation with PAMPs such as LPS, PGN, and CpG.
- Flow cytometry was used to measure gut homing (integrin $\alpha 4\beta 7$), intestinal recruiting (CCR5), and activation (CD28) phenotypes, whereas multiplex technology was used to measure cytokines and chemokines in the supernatant.
- In response to PAMPs stimulation, blood T cells expressing integrin $\alpha 4\beta 7$ in IBS compared with controls resulted in an unsuccessful down-regulation of the co-expression of intestinal CCR5 and higher expression of CD28.
- Our results support an interaction between the innate immunity and microbial triggers as an underlying mechanism for developing or exacerbating IBS.

Abstract

Background Immune activation, increased Toll-like Receptors (TLR) expression, and gut epithelial diffusion of bacterial molecules have been reported in irritable bowel syndrome (IBS). Thus, we sought to

relate these factors by analyzing gut homing (integrin $\alpha 4\beta 7$), intestinal recruiting (CCR5) and activation (CD28) phenotypes, and the cytokines and chemokines concentration in peripheral blood T-lymphocytes stimulated with TLR-ligands. **Methods** Twenty-one IBS-Rome II (1 PI-IBS) patients and 19 controls were studied. Isolated peripheral blood mononuclear cells were cultured with and without *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS), *Staphylococcus aureus* peptidoglycan (PGN), and unmethylated cytosine-phosphate-guanine motifs (CpG). Phenotypes were investigated by flow cytometry and supernatant cytokines and chemokines were also measured. **Key Results** After LPS, CCR5 expression in CD4⁺ $\alpha 4\beta 7$ ⁺ cells remained unchanged in IBS, but decreased in

Address for Correspondence

Max Schmulson, Laboratorio de Hígado, Páncreas y Motilidad (HIPAM)-Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina-Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Hospital General de México. Dr. Eduardo Liceaga, Dr. Balmis #148, Col. Doctores C.P. 06726, México Distrito Federal, México.

Tel: +52 5556232673; fax: +52 5556232669;

e-mail: maxjulio@prodigy.net.mx

Received: 7 May 2013

Accepted for publication: 18 July 2013

controls ($p = 0.002$), to lower levels than in IBS (Mean fluorescence intensity [MFI]: 1590 ± 126.9 vs 2417 ± 88.4 , $p < 0.001$). There were less $CD8^+ \alpha 4\beta 7^+$ $CCR5^+$ cells (85.7 ± 1.5 vs $90.8 \pm 0.9\%$, $p = 0.006$) after LPS and $CD3^+ \alpha 4\beta 7^+$ $CCR5^+$ (40.0 ± 1.7 vs $51.2 \pm 4.3\%$, $p = 0.006$) after PGN in controls. Also, after LPS, CD28 decreased in $CD4^+ \alpha 4\beta 7^+$ $CCR5^+$ in IBS (MFI: 2337 ± 47.2 vs 1779 ± 179.2 , $p < 0.001$), but not in controls. Cytokines and chemokines were similar, except for lower IL8/CXCL8 in the unstimulated condition in IBS (4.18, 95% CI: 3.94–4.42 vs 3.77, 3.59–3.95; $p = 0.006$). **Conclusions & Inferences** Pathogen-associated molecular patterns stimulation of peripheral blood T cells expressing gut homing marker in IBS compared with controls resulted in an unsuccessful down-regulation of the co-expression of intestinal recruiting/residence phenotype and a state of activation. These findings support an interaction between an innate immune predisposition and microbial triggers, which may unleash or exacerbate IBS.

Keywords chemokines, CpG, cytokines, gut homing, residence, activated T cells, innate immunity, irritable bowel syndrome, lipopolysaccharide, peptidoglycan, toll-like receptors.

INTRODUCTION

Irritable bowel syndrome (IBS) is a highly prevalent functional gastrointestinal disorder (FGID) throughout the world,^{1,2} which has a negative impact on health perception and quality of life.³ Despite extensive research, the underlying pathophysiologic mechanisms remain elusive. Notwithstanding, recent studies have suggested an altered systemic⁴ and/or mucosal immune response⁵ that may be associated with impaired bowel motility and visceral sensitivity.^{6,7} The above scenario is complemented with several elements such as impaired epithelial permeability,⁸ abnormalities in gut microbiota,^{9–11} infectious gastroenteritis that can trigger or exacerbate IBS,¹² and chronic stress¹³ that has also been associated with pro-inflammatory profiles in patients leukocytes.¹⁴ Further investigations have involved an abnormal innate immune activation through altered Toll-like Receptors (TLR) expression, mainly TLR4 and TLR2, in the gut mucosa and in cultured monocytes/macrophages, respectively.^{15–17} In addition, TLR stimulation with pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) has been related with increased production of Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α), Interleukin (IL)-1 β , IL-6, and IL-8, in peripheral blood mononuclear cells

(PBMCs).^{18,19} Moreover, a higher percentage of peripheral T²⁰ and B²¹ cells expressing integrin $\beta 7$, a molecule responsible for T cell homing into the gut-associated lymphoid tissue,²² and elevated percentages of transiently activated T and B cells have been reported in IBS compared with controls, suggesting that the first ones have more tissue-directed and -activated immune cells.

Recently, Liebrechts *et al.* observed higher percentage of cells expressing gut homing that co-expressed the intestinal resident chemokine receptor 9 (CCR9)²³ in circulating PBMCs in Functional Dyspepsia, while not in IBS.²⁴ Another chemokine receptor, CCR5,²⁵ is expressed by almost all small bowel and colonic resident T cells,²⁶ in the lamina propria and the intestinal epithelium.²⁷ CCR5 is not involved in lymphocytes tissue-homing, but in tissue-infiltrating (recruiting/residence);²⁴ therefore, may be important for positioning or retention of lymphocytes after tissue entry,²⁵ and has not been studied in IBS. In addition, we have analyzed lymphocyte activation through the expression of CD28, a co-stimulatory molecule of T cells that decreases considerably after TLR-ligands stimulation by pathological triggers²⁸ or in the presence of TNF- α in pro-inflammatory conditions.^{29,30}

This chain of events could generate or exacerbate IBS during changes in the microbiota or in the presence of pathogens during a bacterial gastroenteritis and could also be mediated by psychological stress. Therefore, we sought to evaluate the gut homing ($\alpha 4\beta 7$), intestinal recruiting/residence (CCR5), and activation (CD28) phenotype co-expression in peripheral blood T-lymphocyte subpopulations and their cytokines and chemokines production, after *in vitro* stimulation with soluble bacterial TLR-ligands. Furthermore, to correlate these factors with perceived stress scores, we hypothesized that PBMCs in contact with bacterial molecules will result in higher cell percentages and/or expression of integrin $\alpha 4\beta 7$ and CCR5, a sub-expression of CD28, and higher production of cytokines and chemokines in IBS VS controls and in relation to perceived stress.

METHODS

Study subjects

Twenty-one volunteer IBS subjects and 19 controls were studied. Subjects were selected among consecutive patients between 18 and 60 years of age that consulted from May to October of 2011, the Colon and Rectal Clinic in the Hospital General de México O.D. in the center of Mexico City. This general hospital is a tertiary care institution and is the main and largest hospital of the public health system in Mexico. In the Colon and Rectal

Clinic, patients are routinely examined with a rigid rectosigmoidoscopy and to be eligible for inclusion in the study, patients had to show no evidence of mucosal inflammation or neoplastic disorders. Moreover, patients had to be free of any previous history of inflammatory bowel disease based on their medical history and physical exploration (including the rectosigmoidoscopy), and no history of celiac disease, microscopic colitis, or gastrointestinal cancer. In addition, subjects were excluded in the presence of any ongoing acute respiratory or gastrointestinal disorders or signs of any other infectious diseases, or if they were taking proton pump inhibitors, antispasmodics, prokinetics, antibiotics, probiotics, antidepressants, anti-inflammatory, or any immunosuppressive agents. Only those without any organic disorder and not taking any of the above-mentioned medications were invited to participate. Those who voluntarily accepted signed an informed consent and are hereinafter called study subjects.

Rome II modular questionnaire

Study subjects answered the Rome II Modular Questionnaire validated into Spanish-Mexico,³¹ and were categorized as IBS or controls independently of their reason for consultation. Accordingly, IBS was diagnosed in the presence of abdominal pain or discomfort at least 12 weeks in the preceding 12 months associated with two of the following: relief after a bowel movement and/or; it is associated with a change in the frequency of bowel movements; and/or it is associated with a change in the consistency of bowel movements.³² Patients with IBS were further classified according to their bowel habit using Rome II Criteria as diarrhea (IBS-D) and constipation predominant IBS (IBS-C), whereas those not meeting criteria for IBS-D or IBS-C were classified as alternating/mixed IBS (IBS-A/M). Moreover, IBS diagnosis was confirmed by a gastroenterologist with expertise in IBS (MS) and no attempt was made to include IBS patients based on their bowel habit subtype. Controls were those not fulfilling criteria for IBS or any other functional bowel disorder according to the Rome II Modular Questionnaire and without a history of any other chronic pain condition. In this study, we did not use the Rome III Adult Questionnaire because the translation and validation into Spanish-Mexico of that instrument was not available at the start of this study. Only recently, in 2012, we finalized this version.³³

As for the reasons for consultation among subjects, fulfilling criteria for IBS were current symptoms of IBS ($n = 13$) or constipation ($n = 3$) and for a regular checkup due to a previous history of hemorrhoidal disease ($n = 5$). As for those categorized as controls, the reasons for consultation were for regular checkups due to a previous history of hemorrhoidal disease ($n = 8$), anal fistula not related to inflammatory bowel disease-cryptogenic ($n = 3$), anal itching, skin flaps, mucosal prolapse, and diverticulosis without diverticulitis ($n = 2$, each). It must be emphasized that aside from the patients that consulted with symptoms of IBS or constipation, subjects were asymptomatic and without any ongoing activity of their previous problems.

Postinfectious IBS

Subjects fulfilling Rome II criteria for IBS answered the Spiller's Post Infectious IBS (PI-IBS) Questionnaire.³⁴ This instrument delimits patients that were previously asymptomatic and in whom IBS symptoms developed after an acute gastrointestinal illness characterized by two or more of the following symptoms: diarrhea, vomiting, fever, or positive stool culture; suggesting PI-IBS.³⁴

Cohen's perceived stress scale (PSS-10)

The PSS-10 is an instrument that measures the degree to which situations in one's life over the past month are appraised as stressful.^{35,36}

Isolation of PBMCs

Peripheral venous blood samples were collected from each subject via sterile venipuncture into EDTA vacutainers (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and immediately afterward, PBMCs were isolated by density gradient centrifugation. Fifteen mL of blood was diluted on sterile phosphate-buffered saline (PBS) (1 : 1 volume), and layered onto 15 mL of Histopaque 1077 (Sigma, St Louis-MO, USA) in a sterile 50-mL tube and centrifuged at 400 *g* for 20 min at room temperature. Peripheral blood mononuclear cells were washed, once with lyse buffer and twice with PBS and viability was evaluated by trypan blue exclusion. Peripheral blood mononuclear cells were re-suspended to a 2×10^6 cells/mL in complete medium (RPMI 1640 medium; Gibco®, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco®), 100 IU/mL penicillin, and 10 mg/mL streptomycin (Gibco®).³⁷

Cell cultures Peripheral blood mononuclear cells were cultured in 24-well plates (Costar, Corning Inc., Wilkes Barre, PA, USA) and were either non-stimulated or incubated with submaximal concentrations (50 ng/mL) of *E. coli* Lipopolysaccharides (LPS), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); 1 μ L/mL of *Staphylococcus aureus* peptidoglycans (PGN), (Sigma-Aldrich); and 6.5 μ g/mL of synthetic oligodeoxynucleotides of Cytosine-phosphate-Guanine motifs Hu/MsCpG-C (CpG), (Hycult Biotech, Uden, The Netherlands).^{15,17,38} The rationale for using these PAMPs was because the extracellular LPS is recognized by TLR4,³⁹ and PGN by TLR2,⁴⁰ whereas the intracellular CpG is recognized by TLR9,⁴¹ which have been related to IBS.

Cell cultures were incubated for 24 h at 37 °C and 5% CO₂ humidified atmosphere.⁴² This time frame was chosen based on the current knowledge that human T cells are able to directly recognize PAMPs^{43,44} and it has been previously used to characterize cytokine production after TLRs-ligands stimulation in IBS and controls.¹⁹

Flow cytometry The 1.5×10^6 cryo-preserved PBMCs were thawed using a modified technique from Germann *et al.* Briefly, the cells were rapidly thawed in water bath (37 °C), diluted in filtered PBS (1 : 10 volume), centrifuged at 400 *g* for 5 min, and re-suspended in 50 μ L of filtered PBS.⁴⁵ To further characterize the T-cell subpopulations (CD3, CD4, CD8), cells were co-stained for integrin $\alpha 4\beta 7$, CCR5, and the co-activator CD28. Thus, after thawed, the cells were immediately stained for flow cytometry analysis of the mentioned surface markers in six fluorochrome combinations as follows: Anti-CD3-APC-Cy7; Anti-CD4-PE-Cy7; Anti-CD8-PE-Cy5; Anti-integrin $\alpha 4\beta 7$ -PE; Anti-CCR5-APC; and Anti-CD28-FITC. All cells were fixed in 1% paraformaldehyde before flow cytometry. The flow cytometry analysis was performed in a BD FACSanto II (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA). At least 100 000 lymphocytes per sample were analyzed, defined by forward VS side scatter. Mean fluorescence intensity and cell percentage data were analyzed using FACSDiva 6.0 (BD Biosciences).

Cytokine analysis T-cell free supernatant fraction of the PBMCs culture was collected, aliquoted, and stored at -80 °C until analysis. Supernatant concentration of nine cytokines and chemokines, including TNF α , IL-1 β , IL-10, IL-17, IL-8/CXCL8,

Chemokine (C-C motif) ligand-5 (CCL5 also known as RANTES), Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP1), and Macrophage Inflammatory Protein 1 alpha (MIP1 α) and 1 beta (MIP1 β), was measured using 9-Plex kits. The rationale for studying them are the following: The pro-inflammatory TNF α ¹⁸ and IL-1b,¹⁸ and together with IL8/CXCL8,¹⁹ have been reported to be elevated in PBMCs cultures in IBS compared with controls, whereas serum levels of the immunoregulatory IL-10 have been shown to be decreased in IBS.⁴ IL-17 has not been studied in IBS, however, is one of the most important cytokines in the innate immune response,⁴⁶ and has been related to a decreased intestinal hypercontractility in an experimental model of acute inflammation.⁴⁷ Although there are no reports that find any difference in CCL5 expression and MCP1 between IBS and controls, CCL5 plays a fundamental role in activating mast cells by generating histamine and serotonin⁴⁸ that have been related to the severity of abdominal pain in IBS,⁴⁹ while MCP1 induces central sensitization.⁵⁰ Furthermore, the MIP1 α and MIP1 β have also been associated with pain by activating sensory neurons and glial cells expressing receptors for these chemokines, thus they were also evaluated.⁵¹

The Plex kits were assayed on a Bio-Plex suspension array system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The plates were read on a Bio-Plex system and analyzed using the Bio-Plex Manager software (Bio-Rad Laboratories) with an eight-point standard curve. Samples of 50 μ L were assayed in duplicated. Repeated measures were run on each plate to determine assay consistency. Intra- and inter-assay variation were run.

Statistical analysis

The study sample size was determined with Epidat 3.1 (OPS/OMS, Coruña, Spain, 2006). Because no previous study has measured CCR5 in IBS and the one measuring integrin β 7 did not report SD values²⁰ to use in our sample calculation, we used as a reference the study by Liebrechts *et al.* that analyzed gut homing and residence flow cytometry analysis, where the authors reported increased gut homing and residence cell percentages in patients with Functional Dyspepsia in comparison with controls ($5.6 \pm 3.5\%$ VS $1.6 \pm 1.0\%$),²⁴ resulting a minimum sample of 18 subjects per group for a statistical power of 90%. In addition, a *post hoc* analysis for Mann-Whitney test (G*power 3.1.5. Institut für Experimentelle Psychologie, Christian-Albrechts-Universität Kiel, Kiel, Germany) was conducted to evaluate the statistical power of the obtained results between the IBS and controls. The power was higher than 0.99 for the statistically significant differences.

Continuous variables are expressed as mean \pm SD. Data were analyzed with the non-parametric Mann-Whitney test. In addition, the Spearman rank test was used to examine the correlations between the perceived stress and immunological measures. A $p < 0.05$ was considered significant. All data were analyzed with the SPSS version, 17.0; SPSS, Chicago, IL, USA.

The protocol was approved by the Research Commissions of the Faculty of Medicine of the *Universidad Nacional Autónoma de México* (UNAM) and the Research and Ethics Committees of the *Hospital General de México O.C.*

RESULTS

Study subjects

Table 1 describes the general characteristics of the groups. The IBS and controls were similar in age and

Table 1 Demographic characteristics of the study groups

	IBS N = 21	Controls N = 19	P
Gender			
Women/Men	16/5	13/6	0.580
Age			
Years \pm SD	41.9 \pm 12.3	40.7 \pm 9.8	0.733
IBS subtype			
C/D/A	8/3/10	–	
PI-IBS			
+/All	1/21	–	
Psychological stress			
PSS: mean \pm sd	23.6 \pm 4.7	18.0 \pm 6.7	0.001

C, constipation (IBS-C); D, diarrhea (IBS-D); A, mixed/alternating (IBS-M/A); IBS, irritable bowel syndrome; PI-IBS, postinfectious IBS; PSS, perceived stress scale³⁵.

gender distribution. Half of the IBS patients (48%) were classified as IBS-A/M, and the other half was distributed into IBS-C (38%) and IBS-D (14%), and only one patient was categorized as PI-IBS. Perceived stress scores were significantly higher among IBS than controls. (Table 1).

T-lymphocyte phenotypes

There were no differences in the level of expression of the gut homing marker integrin α 4 β 7 between the IBS and controls, in lymphocyte subpopulations CD3, CD4, and CD8, both in unstimulated and stimulated conditions (LPS, PGN, CpG) (data not shown). In addition, there were no differences in the percentage of cells expressing gut homing. (Table S1).

To further characterize the phenotypes of the former T-cell subpopulation (T-cells α 4 β 7⁺), we evaluated the co-expression of recruiting/residence and activation markers (CCR5 and CD28). Although the IBS and controls showed similar levels of expression of both superficial markers (α 4 β 7⁺ CCR5⁺) for all T-cell subpopulations in the cultures without any TLR-ligand stimulation, the LPS stimulation led to significant differences in CCR5 expression. Accordingly, in CD4⁺ α 4 β 7⁺ cells, CCR5 remained unchanged in patients with IBS (MFI: 2397 \pm 72.41 vs 2417 \pm 88.4, $p = 0.780$), while decreased significantly in controls (MFI: 2293 \pm 214.2 vs 1590 \pm 126.9, $p = 0.002$), to lower expression levels than in IBS ($p < 0.001$). (Fig. 1) Besides, in CD8⁺ α 4 β 7⁺ cells, CCR5 expression decreased both in IBS (MFI: 4382 \pm 287.9 vs 3373 \pm 235.2, $p = 0.007$) and controls (4118 \pm 247.0 vs 2680 \pm 217.5, $p < 0.001$), also showing lower expression levels in controls vs IBS ($p = 0.048$). (Fig. 1).

In addition, the percentage of T cells expressing CCR5 was similar in the unstimulated cultures

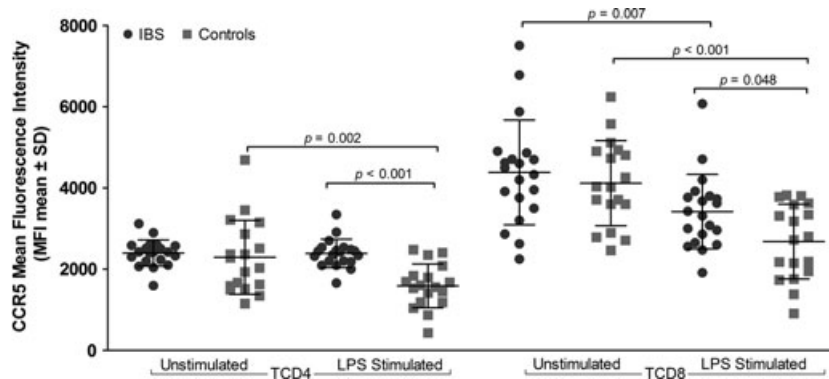


Figure 1 Mean fluorescence intensity (MFI) of CCR5⁺ in CD4⁺ $\alpha 4\beta 7^+$ and CD8⁺ $\alpha 4\beta 7^+$ cells in unstimulated and Lipopolysaccharide (LPS)-stimulated cultures in IBS and controls. The mean fluorescence intensity of the expression level of the recruiting phenotype (CCR5) was similar in patients with IBS *VS* controls in the unstimulated cultures both in TCD4 and in CD8 cells. In LPS-stimulation culture of CD4 cells, CCR5 expression remained unchanged in IBS (2397 ± 72.41 *VS* 2417 ± 88.4 , $p = 0.780$) while decreased in controls (2293 ± 214.2 *VS* 1590 ± 126.9 , $p = 0.002$) to lower levels than in IBS ($p < 0.001$). In CD8 cells, CCR5 decreased both in IBS (4382 ± 287.9 *VS* 3373 ± 235.2 , $p = 0.007$) and in controls (4118 ± 247.0 *VS* 2680 ± 217.5 , $p < 0.001$) to lower levels than in IBS ($p = 0.048$).

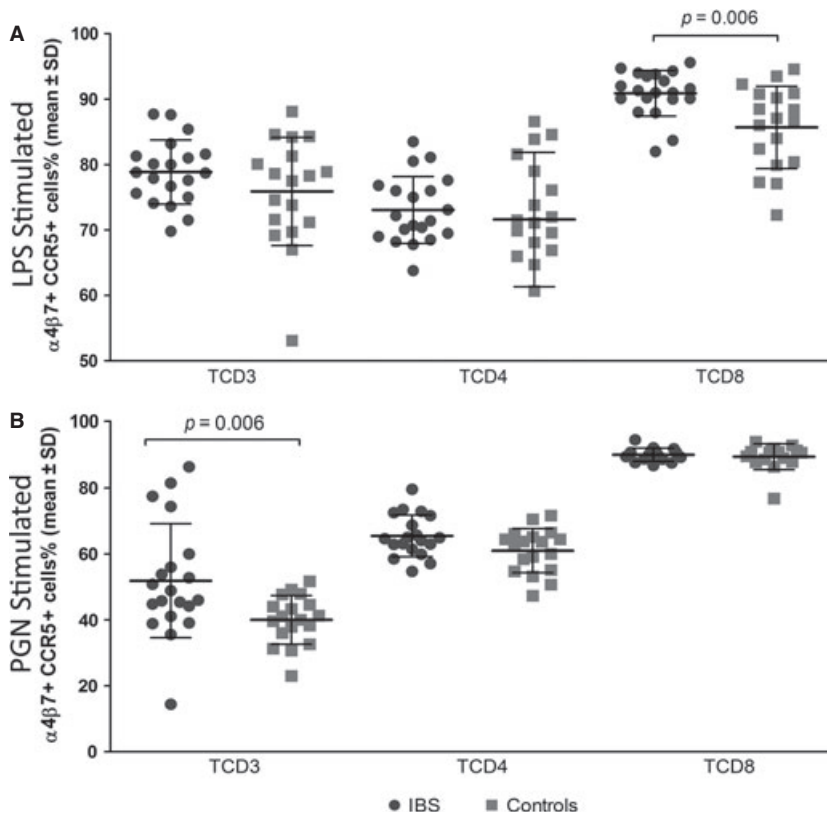


Figure 2 Percentage of integrin $\alpha 4\beta 7^+$ CCR5⁺ T-cell subpopulations under lipopolysaccharide (LPS) and peptidoglycan (PGN)-stimulated cultures in IBS and controls. In cultures with LPS stimulation, the proportion of TCD8 cells expressing the recruiting (CCR5) phenotype was significantly lower in controls *VS* IBS (90.8 ± 0.9 *VS* $85.7 \pm 1.5\%$, $p = 0.006$). There were no differences in the proportion of TCD3 and TCD4 between the groups. (Fig. 3A) Moreover, in cultures with PGN stimulation, the proportion of TCD3 expressing CCR5 was also significantly lower in controls (51.2 ± 4.3 *VS* $40.0 \pm 1.7\%$, $p = 0.006$). (Fig. 3B) There were no differences in the proportion of TCD4 and TCD8 expressing CCR5, between the groups.

between the IBS and controls. In contrast, the percentage of LPS-stimulated CD8 (90.8 ± 0.9 *VS* $85.7 \pm 1.5\%$, $p = 0.006$), (Fig. 2A) and PGN-stimulated CD3⁺ (51.2 ± 4.3 *VS* $40.0 \pm 1.7\%$, $p = 0.006$) T cells (Fig. 2B) was significantly lower in controls *VS* IBS (Table S1).

The above gut homing and intestinal recruiting/residence subpopulations were further studied to

confirm their activation status by the presence of CD28. We did not observe any difference in the expression levels of the mentioned marker in the unstimulated T-cell subpopulations between the IBS and controls. However, in response to LPS, there was a significant reduction in CD28 in CD4⁺ $\alpha 4\beta 7^+$ CCR5⁺ cells in IBS (2397 ± 70.9 *VS* 1779 ± 179.2 , $p < 0.001$), but not in controls (2330 ± 59.4 *VS* 2337 ± 47.2 ,

$p = 0.962$). Moreover, expression levels after LPS were significantly lower in IBS *VS* controls ($p < 0.001$). (Fig. 3) The percentage of T-cell subpopulations expressing the CD28 with or without TLR-ligands stimulation was similar between the groups (Table S1).

Cytokine and chemokine production

Overall, the supernatant concentration of the studied cytokines and chemokines from unstimulated cells was similar in IBS and controls except for IL-8/CXCL8 that was significantly lower in IBS *VS* controls (7847.3 ± 1399.4 *VS* 11120.9 ± 1872.2 , $p = 0.010$). (Table 2) After stimulation with LPS and PGN, there were higher cytokine and chemokine concentrations in both the IBS and controls. No such increase was observed for cultures with the TLR9-ligand CpG, except for the MIP1 α chemokine concentration (Table 2). However, as was observed with the unstimulated cells, the overall concentrations of cytokines and chemokines in the supernatant from TLR's challenged cells did not show any significant difference between the IBS and controls.

Stress and immunological profiles

Finally, there were no correlations between the PSS scores and the measured immunological profiles, neither with respect to T-cell number or the cytokine and chemokine concentrations both in IBS and controls (Data not shown).

DISCUSSION

The main rationale of our experimental design was to mimic *ex vivo*, the interaction between the immune system and bacterial origin PAMPs, a contact that is common and has a pivotal importance in the gut homeostasis.⁵² This interaction involves a large amount of immune cells and the astonishing diversity

of microbiota present in the gastrointestinal tract,^{53,54} where the fine immune response develops a tolerogenic reaction toward commensal organisms and a strong combative response against pathogenic agents.⁵⁵ On the basis of the above, we did not find any difference in the T-cell expression of the gut homing marker (integrin $\alpha 4\beta 7$) in the unstimulated or extracellular TLR-ligands stimulation in IBS *VS* controls. However, after challenging the PBMCs with LPS, the co-expression of the recruiting/residence (CCR5) phenotype in CD4 and CD8⁺ $\alpha 4\beta 7$ ⁺ cells remained unchanged in IBS while decreased among controls, together with lower number of CD8⁺ $\alpha 4\beta 7$ ⁺ cells expressing CCR5 in controls *VS* IBS. In addition, co-expression of the activation phenotype (CD28) decreased significantly in IBS, but not in controls, suggesting that T cells have been activated in IBS. In contrast, when PBMCs were stimulated with CpG, a synthetic intracellular bacterial component, we did not observe any difference in the phenotypes expression compared with the unstimulated cells.

Gut homing

Recently, Öhman *et al.* reported an augmented percentage of T lymphocytes expressing the gut homing, integrin $\beta 7$ phenotype in patients with IBS compared with healthy controls. The gut homing marker could be nicely related with several other reports that have shown higher percentages of T cells in the colonic mucosa in patients with IBS *VS* controls.^{56,57} However, this low-grade inflammation pattern has not been replicated by others.^{5,58} In contrast, our results were somewhat different from those by Öhman *et al.* as we did not find any difference in the expression of gut homing.²⁰ This discrepancy may have several explanations. We evaluated cultured cells, while they studied freshly obtained PBMCs; in addition, they reported differences in the percentage of CD4⁺ and CD8⁺ T cells co-expressing HLA-DR and integrin $\beta 7$, while we analyzed the expression of $\alpha 4\beta 7$ itself.

Figure 3 Mean fluorescence intensity (MFI) of CD28 in CD4⁺ $\alpha 4\beta 7$ ⁺ CCR5⁺ cells in unstimulated and lipopolysaccharide (LPS)-stimulated cultures in IBS and controls. The mean fluorescence intensity of the expression level of the activation phenotype (CD28) was similar in patients with IBS *VS* controls in the unstimulated condition. In cultures under LPS stimulation, the expression of CD28 decreased in IBS ($p < 0.001$), but not in controls. Furthermore, the CD28 expression level after LPS stimulation was significantly lower in IBS *VS* controls ($p = < 0.001$).

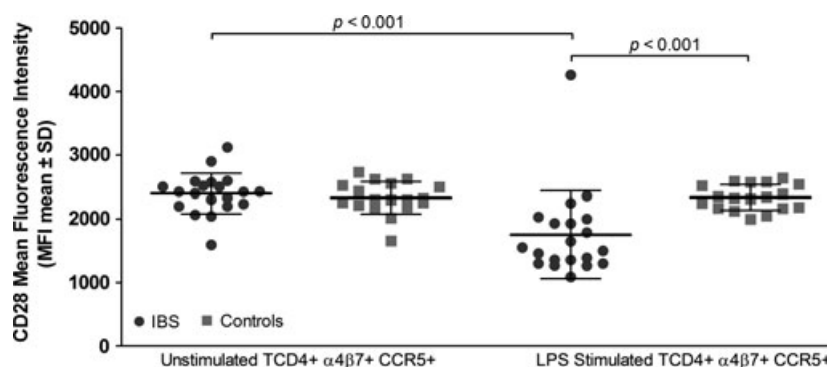


Table 2 Cytokines and chemokines concentration from supernatant of TLR-ligands stimulated and unstimulated PBMCs cultures

Cytokine/Chemokine	IBS		Controls		IBS		Controls		IBS		Controls	
	Unstimulated cultures		LPS		PGN		CpG		IBS		Controls	
TNF- α	19.4 \pm 5.5	23.0 \pm 6.1	1535.0 \pm 854.0	979.1 \pm 567.5	555.9 \pm 231.6	284.9 \pm 103.1	15.5 \pm 1.9	25.0 \pm 9.5				
IL-1 β	10.9 \pm 4.2	23.7 \pm 16.2	38.9 \pm 10.6	47.8 \pm 19.3	47.0 \pm 9.2	48.2 \pm 23.2	11.5 \pm 4.7	23.2 \pm 19.0				
IL-10	30.2 \pm 7.4	34.7 \pm 7.0	789.6 \pm 137.0	763.7 \pm 83.0	719.4 \pm 95.5	1053.1 \pm 236.2	34.9 \pm 5.8	108.2 \pm 61.2				
IL-17 α	32.6 \pm 3.0	35.9 \pm 3.6	63.7 \pm 7.9	62.5 \pm 3.7	180.0 \pm 37.7	153.8 \pm 20.8	42.0 \pm 4.3	42.2 \pm 4.8				
IL8/CXCL8	7847.3 \pm 1399.4*	11120.9 \pm 1872.2	15200.0 \pm 2012.3	13380.0 \pm 1381.9	15200.1 \pm 2012.0	13380.1 \pm 1381.0	10500.2 \pm 1638.6	10240.7 \pm 1077.5				
CCL5	1302.1 \pm 181.5	1562.0 \pm 277.2	2153.1 \pm 390.6	2682.1 \pm 442.4	2694.9 \pm 279.6	3359.3 \pm 429.6	1925.3 \pm 267.3	1911.8 \pm 248.3				
MCPI	2116.0 \pm 478.7	2306.1 \pm 466.1	2565.8 \pm 277.5	3050.0 \pm 421.4	1499.7 \pm 219.4	2256.0 \pm 363.4	1923.2 \pm 133.1	1986.2 \pm 103.8				
MIP1 α	61.6 \pm 27.62	119.4 \pm 70.07	15550.1 \pm 6522.7	14350 \pm 3725	2284.2 \pm 1692	1699.2 \pm 826.1	1423.1 \pm 870.8	3806.3 \pm 2337.8				
MIP1 β	527.8 \pm 111.0	695.8 \pm 314.5	2730.6 \pm 627.6	3742.1 \pm 809.7	2647.7 \pm 335.8	2967.3 \pm 322.1	946.3 \pm 204.3	858.4 \pm 202.3				

MCP, monocyte chemoattractant protein; CpG, cytosine-phosphate-guanine motifs; IL, Interleukin; LPS, lipopolysaccharide; MIP, macrophage inflammatory protein; IBS, irritable bowel syndrome; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; PGN, peptidoglycan; TLR, Toll-like Receptors; TNF, tumor necrosis factor.

Supernatant cytokine concentrations are expressed in pg/mL as mean \pm SD.

*Statistical significant difference $p = 0.010$. After LPS and PGN stimulation, all cytokine and chemokines increased compared to the unstimulated condition both in IBS and controls. No such increase was observed under CpG, except for the MIP1 α .

Recruitment/Residence

Liebregts *et al.* described an increased percentage of circulating T lymphocytes co-expressing gut homing and residence ($\alpha 4\beta 7^+$ CCR9 $^+$) phenotypes in functional dyspepsia, but not in IBS.²⁴ CCR9 is expressed by T lymphocytes infiltrating mainly the small bowel and by a low percentage of colonic lymphocytes.²⁷ In contrast, Kunkel *et al.* found CCR5 to be a more general phenotype of tissue-infiltrating lymphocytes, thus, is important for retaining these cells after entering into the gut.^{25,26} Therefore, we evaluated CCR5 in cells expressing the gut homing phenotype. Accordingly, after LPS stimulation, CCR5 expression in CD4 $^+$ $\alpha 4\beta 7$ cells remained unchanged in IBS while decreased significantly in controls. Furthermore, CCR5 co-expression in CD8 $^+$ $\alpha 4\beta 7$ cells decreased in both groups with a significantly greater extent in controls. However, the findings of our study and that of Liebregts *et al.* are in agreement as we did not find any difference in the T-cell phenotypes between IBS and controls in the unstimulated cells as was to be expected. CCR5 differences were only found after TLR-challenges. This lower expression of CCR5 among controls is an interesting finding. In a study to analyze the susceptibility of neonates to infections, Langrish *et al.* compared monocyte-derived dendritic cells from cord blood and adults that were cultured with LPS.⁵⁹ Adult dendritic cells adopted a mature phenotype with a down-regulation of CCR5 expression, while cord cells failed to mature. However, both had comparable expression of surface markers and morphology in the immature state.⁵⁹ Based on the above data, one may speculate that in IBS, T cells fail to mature in response to bacterial LPS stimulation in contrast to controls. However, this needs to be further investigated and confirmed.

Activation

We have found a similar proportion of CD28 $^+$ cells in IBS and controls with or without TLR-ligands stimulation.⁶⁰ These results are in agreement with those from Kindt *et al.* who did not find any difference in the percentage of CD3 $^+$ CD28 $^+$ cells in patients with FGIDs (including IBS, Functional Dyspepsia, and Non-Cardiac Chest Pain) VS controls.⁶¹ Notwithstanding, in this study, CD28 expression decreased in IBS, but not in controls after TLRs stimulation with LPS. One may speculate that there is a predisposition for a faster or stronger response to TLR stimulation in IBS than controls, thus decreasing the expression of CD28 in the first ones.

Cytokines and chemokines

Stimulating PBMCs with LPS or PGN resulted in higher concentration of cytokines and chemokines without any difference between the IBS and controls, whereas the CpG stimulation did not lead to an amplification of soluble molecules response in comparison with non-stimulated cells. The lack of difference in cytokines and chemokines between the groups after LPS and PGN challenges in this study is an intriguing finding and differs from others that have reported higher levels in IBS under these conditions.^{18,19} We do not believe that the time frame of the cultures (24 h) may be the reason, as the cytokines and chemokines concentration did increase in both groups. Furthermore, McKernan *et al.* demonstrated higher cytokine levels in IBS *VS* controls in cultures with this time period. Population differences may be related, and further studies are required. On the other hand, the secretion pattern after CpG stimulation was in part expected based on previous studies that have reported very low levels of some cytokines (*e.g.*, IL-10) in cultured cells with this intracellular ligand.^{42,62} CpG is recognized by TLR-9, and Villani *et al.*³⁸ reported the association of two TLR-9 polymorphisms as genetic risk factors for developing PI-IBS. However, TLR-9 has only been associated with PI-IBS and not with IBS without a postinfectious etiology, as were the majority of our studied patients, suggesting that the underlying mechanisms could be different in PI-IBS and IBS.³⁸

We must acknowledge that this study has some limitations. The main one is that we did not analyze colonic biopsies to rule out microscopic colitis or low-grade inflammation. The latter could have strengthened our results by comparing the immune activation in response to the molecules from the microbiota in the periphery and in the bowel mucosa. However, our protocol was designed to reproduce the interaction between the immune system and bacterial origin PAMPs. Firstly, we would not expect to find differences in mucosal cell counts as almost all of our patients were IBS without a postinfectious etiology and our findings suggest an immune predisposition in IBS because of a failure of peripheral blood T cells to mature in the presence of extracellular bacterial ligands, with a subsequent impairment to down-regulate the expression of intestinal recruiting/residence phenotype. Secondly, we did not conduct complete blood cell count or C Reactive Protein to rule out signs of a systemic inflammatory condition nor markers for celiac disease; although as stated in the methods section, subjects were interrogated for the presence of any of these disorders. Thirdly, the small sample size (21 IBS and 19 controls) and the heterogeneous nature of our IBS population did

not enable an analysis between IBS and PI-IBS or by bowel habit subtypes. This is of concern because the suggested pathophysiological mechanisms in IBS such as infectious gastroenteritis,¹² altered microbiota,^{9–12} gut permeability,⁸ and immune response⁵ are likely to differ among the different subgroups of IBS. However, this study was conducted in Mexico where the only small retrospective study analyzing PI-IBS suggests that the prevalence of this IBS group is very low (5.8%), similar to what we found in this study.⁶³ In addition, in this country, the prevalence of IBS-D (15%) is the lowest one compared with IBS-A (41%) and IBS-C (44%).² Therefore, the three patients with IBS-D (14.3%) in our study sample well represent the true prevalence of this subgroup in Mexico. Fourthly, although we cannot draw any conclusions based on the IBS bowel habit subgroups, the fact that the majority of our patients were IBS-A/M (47.6%) followed by IBS-C (38.1%) suggest that our findings of abnormal innate immune response in IBS may not be an exclusive characteristic of patients with IBS-D. Designing larger studies are warranted to make comparisons between those groups.

In conclusion, we have found that PAMPs stimulation of peripheral blood T cells expressing gut homing marker in IBS compared with controls resulted in an unsuccessful down-regulation of the co-expression of intestinal recruiting/residence phenotype and a state of activation. In addition, microbial cell wall-derived signals (LPS, PGN) elicit greater responses than that from internal bacterial molecules such as CpG. These results support an interaction between the innate immunity and microbial triggers as an underlying mechanism for developing or exacerbating IBS.

ACKNOWLEDGMENTS

This study has been selected for oral presentation at the 2013 DDW. We thank Dr. Orianna Ortiz-Garrido for helping in the application of the questionnaires to the study subjects and collecting the blood samples.

FUNDING

This study was funded by grant PAPIIT IN210010 from the *Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica*, DGAPA-Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Oscar Rodríguez-Fandiño is a recipient of a fellowship from the *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología* (CONACyT) No. 336205.

DISCLOSURE

Max Schmulson has received grant supports from Nestle Ltd. and Nycomed/Takeda Mexico; has served in the Advisory Board of Alfa Wasserman and has been a consultant for Almirall, Janssen,

and Nestle Ltd; has been a speaker for Alfa Wasserman, Janssen, and Takeda Mexico. Yolanda López-Vidal has served in the Advisory Board of Alfa Wasserman. Oscar Rodríguez-Fandiño, Josélin Hernández-Ruiz, Hamzeh Bandeh-Moghaddam, Luis Charúa, Antonmaria Minzoni, and Carolina Guzmán have nothing to declare.

AUTHOR CONTRIBUTION

OR-F performed the patient selection and enrollment, sample collection and processing, analyzed and interpreted the data, drafted the manuscript, and approved the final draft; JH-R

performed the planning and study conceptualizing, flow cytometry analyses, data analyses, interpretation, and approved the final draft; YL-V analyzed and interpreted the data, and approved the final draft; LC performed the patient selection and enrollment, sample collection, and approved the final draft; Hamzeh Bandeh-Moghaddam performed the patient selection and enrollment, sample collection, and approved the final draft; AM analyzed and interpreted the data, and approved the final draft; CG performed the cytokine and chemokines analyses, analyzed and interpreted the data, and approved the final draft; MS performed the planning, funding, and study conceptualizing, analyzed and interpreted the data, drafted the manuscript, and approved the final draft.

REFERENCES

- 1 Lovell RM, Ford AC. Global prevalence of and risk factors for irritable bowel syndrome: a meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012; **10**: 712–721. e4.
- 2 Lopez-Colombo A, Morgan D, Bravo-Gonzalez D *et al.* The epidemiology of functional gastrointestinal disorders in Mexico: a population-based study. *Gastroenterol Res Pract* 2012; **2012**: 606174.
- 3 Drossman DA, Morris CB, Schneck S *et al.* International survey of patients with IBS: symptom features and their severity, health status, treatments, and risk taking to achieve clinical benefit. *J Clin Gastroenterol* 2009; **43**: 541–50.
- 4 Schmulson M, Pulido-London D, Rodríguez O *et al.* Lower serum IL-10 is an independent predictor of IBS among volunteers in Mexico. *Am J Gastroenterol* 2012; **107**: 747–53.
- 5 Chang L, Adeyemo M, Karagiannides I *et al.* Serum and colonic mucosal immune markers in irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2012; **107**: 262–72.
- 6 Ohman L, Simren M. Pathogenesis of IBS: role of inflammation, immunity and neuroimmune interactions. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; **7**: 163–73.
- 7 Rodríguez-Fandiño O, Hernández-Ruiz J, Schmulson M. From cytokines to toll-like receptors and beyond - current knowledge and future research needs in irritable bowel syndrome. *J Neurogastroenterol Motil* 2010; **16**: 363–73.
- 8 Piche T, Barbara G, Aubert P *et al.* Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome: involvement of soluble mediators. *Gut* 2009; **58**: 196–201.
- 9 Simren M, Barbara G, Flint HJ *et al.* Intestinal microbiota in functional bowel disorders: a Rome foundation report. *Gut* 2013; **62**: 159–76.
- 10 Kassinen A, Krogius-Kurikka L, Maki-uvokko H *et al.* The fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients differs significantly from that of healthy subjects. *Gastroenterology* 2007; **133**: 24–33.
- 11 Rajilic-Stojanovic M, Biagi E, Heilig HG *et al.* Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2011; **141**: 1792–801.
- 12 Spiller R, Lam C. An update on post-infectious irritable bowel syndrome: role of genetics, immune activation, serotonin and altered microbiome. *J Neurogastroenterol Motil* 2012; **18**: 258–68.
- 13 O'Malley D, Quigley EM, Dinan TG *et al.* Do interactions between stress and immune responses lead to symptom exacerbations in irritable bowel syndrome? *Brain Behav Immun* 2011; **25**: 1333–41.
- 14 Antoni MH, Lutgendorf SK, Blomberg B *et al.* Cognitive-behavioral stress management reverses anxiety-related leukocyte transcriptional dynamics. *Biol Psychiatry* 2012; **71**: 366–72.
- 15 Brint EK, MacSharry J, Fanning A *et al.* Differential expression of toll-like receptors in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2011; **106**: 329–36.
- 16 Belmonte L, Beutheu Youmba S, Bertiaux-Vandaele N *et al.* Role of toll like receptors in irritable bowel syndrome: differential mucosal immune activation according to the disease subtype. *PLoS ONE* 2012; **7**: e42777.
- 17 Ohman L, Lindmark AC, Isaksson S *et al.* Increased TLR2 expression on blood monocytes in irritable bowel syndrome patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2012; **24**: 398–405.
- 18 Liebrechts T, Adam B, Bredack C *et al.* Immune activation in patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2007; **132**: 913–20.
- 19 McKernan DP, Gaszner G, Quigley EM *et al.* Altered peripheral toll-like receptor responses in the irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; **33**: 1045–52.
- 20 Ohman L, Isaksson S, Lindmark AC *et al.* T-cell activation in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2009; **104**: 1205–12.
- 21 Ohman L, Lindmark AC, Isaksson S *et al.* B-cell activation in patients with irritable bowel syndrome (IBS). *Neurogastroenterol Motil* 2009; **21** (644–50): e27.
- 22 Petrovic A, Alpdogan O, Willis LM *et al.* LPAM (alpha 4 beta 7 integrin) is an important homing integrin on alloreactive T cells in the development of intestinal graft-versus-host disease. *Blood* 2004; **103**: 1542–7.
- 23 Agace W. Generation of gut-homing T cells and their localization to the small intestinal mucosa. *Immunol Lett* 2010; **128**: 21–3.
- 24 Liebrechts T, Adam B, Bredack C *et al.* Small bowel homing T cells are associated with symptoms and delayed gastric emptying in functional dyspepsia. *Am J Gastroenterol* 2011; **106**: 1089–98.
- 25 Kunkel EJ, Boisvert J, Murphy K *et al.* Expression of the chemokine receptors CCR4, CCR5, and CXCR3 by human tissue-infiltrating lymphocytes. *Am J Pathol* 2002; **160**: 347–55.
- 26 Kunkel EJ, Campbell DJ, Butcher EC. Chemokines in lymphocyte trafficking and intestinal immunity. *Microcirculation* 2003; **10**: 313–23.
- 27 Johansson-Lindbom B, Agace WW. Generation of gut-homing T cells and their localization to the small

- intestinal mucosa. *Immunol Rev* 2007; **215**: 226–42.
- 28 Jin B, Sun T, Yu XH *et al.* The effects of TLR activation on T-cell development and differentiation. *Clin Dev Immunol* 2012; **2012**: 836485.
- 29 Broux B, Markovic-Plese S, Stinissen P *et al.* Pathogenic features of CD4⁺ CD28⁻ T cells in immune disorders. *Trends Mol Med* 2012; **18**: 446–53.
- 30 Bryl E, Vallejo AN, Weyand CM *et al.* Down-regulation of CD28 expression by TNF- α . *J Immunol* 2001; **167**: 3231–8.
- 31 Schmulson M, Ortiz O, Santiago-Lomeli M *et al.* Frequency of functional bowel disorders among healthy volunteers in Mexico City. *Dig Dis* 2006; **24**: 342–7.
- 32 Thompson W, Longstreth G, Drossman DA. *et al.* C. Functional Bowel Disorders and D. Functional Abdominal Pain. In: Drossman DA, Corazziari E, Talley NJ, Thompson WG, Whitehead WE and the Rome II Multinational Working Teams, eds. *Rome II: The Functional Gastrointestinal Disorders*, 2nd edn. McClean, VA: Degnon Associates Inc., 2000: 351–432.
- 33 Schmulson M, Lopez-Colombo A, Mendoza-Gomez A *et al.* The Rome III adult questionnaire in Spanish-Mexico has a low sensitivity for identifying IBS and higher sensitivity for uninvestigated dyspepsia. *Gastroenterology* 2012; **143**: S-829.
- 34 Dunlop SP, Jenkins D, Spiller RC. Distinctive clinical, psychological, and histological features of postinfective irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2003; **98**: 1578–83.
- 35 Remor E. Psychometric properties of a European Spanish version of the perceived stress scale (PSS). *Span J Psychol* 2006; **9**: 86–93.
- 36 Ramirez MT, Hernandez RL. Factor structure of the Perceived Stress Scale (PSS) in a sample from Mexico. *Span J Psychol* 2007; **10**: 199–206.
- 37 Godoy-Ramirez K, Franck K, Mahdaviifar S *et al.* Optimum culture conditions for specific and nonspecific activation of whole blood and PBMC for intracellular cytokine assessment by flow cytometry. *J Immunol Methods* 2004; **292**: 1–15.
- 38 Villani AC, Lemire M, Thabane M *et al.* Genetic risk factors for post-infectious irritable bowel syndrome following a waterborne outbreak of gastroenteritis. *Gastroenterology* 2010; **138**: 1502–13.
- 39 Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ *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**: 1043–55.
- 40 Wang Q, Dziarski R, Kirschning CJ *et al.* Micrococci and peptidoglycan activate TLR2 \rightarrow MyD88 \rightarrow IRAK \rightarrow TRAF \rightarrow NIK \rightarrow IKK \rightarrow NF- κ B signal transduction pathway that induces transcription of interleukin-8. *Infect Immun* 2001; **69**: 2270–6.
- 41 Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A *et al.* TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* 2004; **5**: 190–8.
- 42 Ghosh TK, Mickelson DJ, Solberg JC *et al.* TLR-TLR cross talk in human PBMC resulting in synergistic and antagonistic regulation of type-1 and 2 interferons, IL-12 and TNF- α . *Int Immunopharmacol* 2007; **7**: 1111–21.
- 43 Caron G, Duluc D, Fremaux I *et al.* Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN- γ production by memory CD4⁺ T cells. *J Immunol* 2005; **175**: 1551–7.
- 44 Komai-Koma M, Gilchrist DS, Xu D. Direct recognition of LPS by human but not murine CD8⁺ T cells via TLR4 complex. *Eur J Immunol* 2009; **39**: 1564–72.
- 45 Germann A, Schulz JC, Kemp-Kamke B *et al.* Standardized serum-free cryome-dia maintain peripheral blood mononuclear cell viability, recovery, and antigen-specific T-Cell response compared to fetal calf serum-based medium. *Biopreserv Biobank* 2011; **9**: 229–36.
- 46 Song X, Qian Y. The activation and regulation of IL-17 receptor mediated signaling. *Cytokine* 2013; **62**: 175–82.
- 47 Akiho H, Nakamura K. Daikenchuto ameliorates muscle hypercontractility in a murine T-cell-mediated persistent gut motor dysfunction model. *Digestion* 2011; **83**: 173–9.
- 48 Castellani ML, De Lutiis MA, Tonia-to E *et al.* Impact of RANTES, MCP-1 and IL-8 in mast cells. *J Biol Regul Homeost Agents* 2010; **24**: 1–6.
- 49 Cremon C, Carini G, Wang B *et al.* Intestinal serotonin release, sensory neuron activation, and abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2011; **106**: 1290–8.
- 50 Gao YJ, Ji RR. Chemokines, neuronal-glia interactions, and central processing of neuropathic pain. *Pharmacol Ther* 2010; **126**: 56–68.
- 51 Kiguchi N, Kobayashi Y, Kishioka S. Chemokines and cytokines in neuro-inflammation leading to neuropathic pain. *Curr Opin Pharmacol* 2012; **12**: 55–61.
- 52 Carvalho FA, Aitken JD, Vijay-Kumar M *et al.* Toll-like receptor-gut microbiota interactions: perturb at your own risk!. *Annu Rev Physiol* 2012; **74**: 177–98.
- 53 Arumugam M, Raes J, Pelletier E *et al.* Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011; **473**: 174–80.
- 54 Salonen A, de Vos WM, Palva A. Gastrointestinal microbiota in irritable bowel syndrome: present state and perspectives. *Microbiology* 2010; **156**: 3205–15.
- 55 Honda K, Takeda K. Regulatory mechanisms of immune responses to intestinal bacteria. *Mucosal Immunol* 2009; **2**: 187–96.
- 56 Chadwick VS, Chen W, Shu D *et al.* Activation of the mucosal immune system in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2002; **122**: 1778–83.
- 57 Cremon C, Gargano L, Morselli-Labate AM *et al.* Mucosal immune activation in irritable bowel syndrome: gender-dependence and association with digestive symptoms. *Am J Gastroenterol* 2009; **104**: 392–400.
- 58 Braak B, Klooker TK, Wouters MM *et al.* Mucosal immune cell numbers and visceral sensitivity in patients with irritable bowel syndrome: is there any relationship? *Am J Gastroenterol* 2012; **107**: 715–26.
- 59 Langrish CL, Buddle JC, Thrasher AJ *et al.* Neonatal dendritic cells are intrinsically biased against Th-1 immune responses. *Clin Exp Immunol* 2002; **128**: 118–23.
- 60 Strioga M, Pasukoniene V, Characiejus D. CD8⁺ CD28⁻ and CD8⁺ CD57⁺ T cells and their role in health and disease. *Immunology* 2011; **134**: 17–32.
- 61 Kindt S, Van Oudenhove L, Broekaert D *et al.* Immune dysfunction in patients with functional gastrointestinal disorders. *Neurogastroenterol Motil* 2009; **21**: 389–98.
- 62 Merlo A, Calcaterra C, Menard S *et al.* Cross-talk between toll-like receptors 5 and 9 on activation of human immune responses. *J Leukoc Biol* 2007; **82**: 509–18.
- 63 Ortiz O, Remes-Troche J, Valdovinos M *et al.* Frecuencia de factores desencadenantes externo e interoceptivos en la presentación inicial del síndrome de intestino irritable (SII) en un hospital de tercer nivel en México: Baja frecuencia de SII postinfeccioso? *Rev Gastroenterol Mex* 2003; **68**: 98–9.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. Percentage of T-lymphocytes in unstimulated and Toll-like Receptors (TLR)-stimulation cultures in patients with IBS and controls.

Corrigendum

This work is a requirement for the PhD degree of Oscar Rodríguez-Fandiño for the *Doctorado en Ciencias Biomédicas* of the Universidad Nacional Autónoma de México [1].

REFERENCE

1. Rodríguez-Fandiño O, Hernández-Ruíz J, López-Vidal Y, Charúa L, Bandeh-Moghaddam H, Minzoni A, Guzmán C, Schmulson M. Intestinal recruiting and activation profiles in peripheral blood mononuclear cells in response to pathogen-associated molecular patterns stimulation in patients with IBS. *Neurogastroenterol Motil* 2013; **25**: 872–e699.