



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**PARTICIPACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA Y FACTORES BACTERIANOS EN
NIÑOS INFECTADOS CON *Helicobacter pylori*.**

TESIS

QUE PARA OBTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. C. HUGO ENRIQUE LAGUNES SERVIN

DIRECTOR DE TESIS

DRA. MARTHA ESTHELA PÉREZ RODRÍGUEZ

FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR

DRA. GLADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZÁLEZ

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DR. RAMÓN CORAL VÁZQUEZ

FACULTAD DE MEDICINA

MÉXICO, D. F. AGOSTO 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.

A mi esposa, con quién he compartido muchos momentos, fui muy afortunado al encontrarte y a mis princesas Ximena y Sofía quienes son nuestros dos tesoros.

A mi padres y hermanos

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Martha Esthela Pérez Rodríguez por su apoyo y consejos durante el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Margarita Camorlinga por su invaluable apoyo, confianza y enseñanzas durante el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Javier Torres por los comentarios y apoyo con el escrito

A los miembros del Jurado de Examen; Dra. Yolanda López Vidal, Dr. Gonzalo Castillo Rojas, Emilio Rojas del Castillo y Dr. Jesús Javier Espinosa (con "s") Aguirre por sus acertados y valiosos comentarios al escrito.

A la Dra. Gladis del Carmen Fragoso González, por sus oportunos y atinados comentarios durante el desarrollo del trabajo.

A todos los integrantes del Laboratorio, quienes hacen que todos los días sean diferentes

Al CONACYT por la beca otorgada para la realización del presente trabajo

ÍNDICE GENERAL

	Página
1. Abreviaturas	I
2. Índice de tablas	II
3. Índice de figuras	III
3. Resumen	IV
4. Abstract	V
5. Introducción	1
5.1 Factores de virulencia	3
5.2 Respuesta inmune innata	6
5.3 Receptores tipo Toll	7
5.4 Respuesta inmune innata hacia <i>H. pylori</i>	11
6. Justificación	14
7. Hipótesis	15
7.1 Objetivo General	16
7.2 Objetivos Específicos	17
8. Material y Métodos	18
8.1 Población	18
8.2 Criterios de inclusión	18
8.3 Muestras biológicas	20
8.4 Obtención de RNA de células mononucleares	21
8.5 Cuantificación TLRs por PCR tiempo real	21
8.6 Prueba de urea en aliento	22
8.7 Inmunohistoquímica	22
8.8 Análisis morfométrico	23
8.9 Factores bacterianos	23
9.0 Evaluación morfológica de la mucosa gástrica	24
9.1 Determinación de citocinas	24
9.2 Análisis Estadístico	24
10. Resultados	25
10.1 Población de Estudio	25
10.2 Expresión de TLRs en tejido gástrico	26
10.3 Expresión de citocinas en tejido gástrico	29
10.4 Determinación de inflamación en tejido gástrico	32
10.5 Expresión de TLRs en células mononucleares	33
10.6 Cuantificación de citocinas en plasma	36
11. Discusión	40
12. Conclusiones	52
13. Perspectivas	53
14. Bibliografía	54
15. Anexo tabla 6 iniciadores utilizados	72
16. Anexo publicación	74

ABREVIATURAS

cagA	Gen asociado a la citotoxina A
vacA	Citotoxina vacuolizante A
BabA	Adhesina de unión al antígeno del grupo sanguíneo
OipA	Proteína inflamatoria de membrana externa A
HopH	Proteína de membrana externa H
cagPAI	Isla de patogenicidad cag
TRAF-6	Factor 6 asociado al receptor de TNF- α
NK-kB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
PI3K	Fosfoinositol 3 cinasa
MyD88	Factor de diferenciación mieloides 88
IRAK	Cinasa asociada al receptor de interleucina
TIR	Receptor IL-1/Toll
IRAK-4	Receptor de IL-1 asociado a la cinasa 4
IRAK-1	Receptor de IL-1 asociado a la cinasa 1
TAB-1	TAK-1 proteína de unión-1
UBC-13	Enzima 13 que conjuga a la ubiquitina
UEV-1	Enzima E2 que conjuga a la ubiquitina variante 1
IKK	Inhibidor de la cinasa kB
IKK α	Cinasa α de IKK
IKK β	Cinasa β de IKK
IKK γ	Cinasa γ de IKK
MAP	Proteína cinasa activadora de mitógeno

IκB	Inhibidor de κB
IRF-3	Factor 3 regulador del interferón
TRIF	Dominio TIR que contiene el adaptador-Inductor de interferón β
<i>glmM</i>	Fosfoglucosamina mutasa
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

ÌNDICE DE TABLAS

Número de tabla	Título	Página
Tabla 1	Receptores tipo Toll presentes en humanos y ratones localización celular y sus ligandos conocidos	8
Tabla 2	Características de la población sintomática y asintomática de estudio	25
Tabla 3	Evaluación de la intensidad de la respuesta inflamatoria en el antro y el cuerpo de niños infectados con <i>H. pylori</i>	33
Tabla 4	Genotipificación de factores de virulencia de las cepas ais-39 ladas	
Tabla 5	Iniciadores utilizados para realizar la amplificación por PCR de los diferentes genes de <i>H. pylori</i>	71
Tabla 6	Condiciones utilizadas en la amplificación de los genes de <i>H. pylori</i>	72
Tabla 7	Iniciadores utilizados para amplificar los diferentes TLRs	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
Figura 1	Seroprevalencia en poblaciones de niños de varios países	2
Figura 2	Estructura de la isla de patogenicidad de <i>H. pylori</i>	4
Figura 3	Esquema de colonización de <i>H. pylori</i>	5
Figura 4	Inmunohistoquímica de TLR2, TLR4 y TLR5 en tejido gástrico	27
Figura 5	Cuantificación de TLRs en tejido gástrico	28
Figura 6	Inmunohistoquímica de IL-8, IL-10 y TNF- α	30
Figura 7	Cuantificación de TLRs en células mononucleares	35
Figura 8	Cuantificación de citocinas en plasma	37

RESUMEN

Helicobacter pylori es una bacteria Gram-negativa, de forma espiral, microaerófila y flagelada, que presenta una prevalencia de más del 50% en el mundo. La infección se adquiere en la niñez, y posteriormente en la vida adulta, esta asociada a diversas patologías gástricas como: úlcera péptica, cáncer gástrico y linfoma tipo MALT. Una de las primeras respuestas a la infección por *H. pylori* es a través de la inmunidad innata mediada por los receptores tipo Toll (TLRs). Hasta el momento, se sabe que la expresión de TLRs se incrementa en la mucosa gástrica de adultos y se asocia a daño en la mucosa gástrica. Sin embargo, no se conoce la expresión de TLRs en la mucosa gástrica de niños infectados con *H. pylori* quienes representan el modelo natural de adquisición de la infección y están libres de alcohol, tabaco y medicamentos anti-inflamatorios. En este trabajo se estudió la expresión de los TLRs y citocinas en un grupo de niños sintomáticos (Dolor Abdominal Crónico) y asintomáticos, así como las cepas aisladas del grupo sintomático. Asimismo, se evaluó si *H. pylori* induce un efecto sistémico, mediante la alteración de la expresión de TLRs en células mononucleares de sangre periférica y citocinas en plasma.

Nosotros, encontramos que la expresión de TLR2, TLR4, TLR5, IL-8, TNF- α e IL-10 fue mayor en el grupo de pacientes sintomáticos infectados comparado con los no infectados. Se observó una correlación entre la expresión de TLR2 y la secreción de IL-8, se presentó un infiltrado de células mononucleares de moderado a grave e infiltrado de ausente a moderado para el caso de los neutrófilos. Se determinó, que el 79% de las cepas aisladas presentaron la isla de patogenicidad íntegra, el gen *cagA* (79%), *babA2* (42.1%), *oipA* (78.95%), *vacA s1m1* (68.4%), *s1m2* (10.5%), *s2m2* (21.5%). No se observó correlación entre la presencia de la isla de patogenicidad y la expresión de TLRs.

La expresión de TLR2, TLR4 y TLR5 en células mononucleares de sangre periférica del grupo sintomático mostró una expresión disminuida para los tres TLRs, asimismo se

presentó una concentración significativa de IL-8. El grupo asintomático mostró un aumento significativo de TLR4 en células mononucleares e IL-10 en plasma. No se encontró correlación entre la expresión de TLR4 e IL-10. En conclusión, nuestros resultados muestran que la infección por *H. pylori* en niños sintomáticos y asintomáticos altera la expresión de TLRs en mucosa gástrica y en células mononucleares de sangre periférica.

ABSTRACT

Helicobacter pylori is a Gram-negative spiral bacteria, microaerophilic flagellated and which has a prevalence of over 50% in the world. The infection is acquired in childhood and later in adult life is associated with various gastric diseases such as peptic ulcer, gastric cancer and MALT lymphoma. One of the first responses to infection with *H. pylori* is through innate immunity mediated by Toll-like receptors (TLRs).

So far, it is known that the expression of TLRs is increased adult gastric mucosa and is associated with gastric mucosal damage. However, the expression of TLRs is not known in the gastric mucosa of *H. pylori*-infected children who represent the natural pattern of acquisition of infection and are free of alcohol, snuff and nonsteroidal anti-inflammatory. In this paper, the expression of TLRs and cytokines was studied in a group of symptomatic children (Chronic Abdominal Pain) and asymptomatic and symptomatic isolates of group. Also, whether *H. pylori* was evaluated induced a systemic effect, by altering the expression of TLRs in peripheral blood mononuclear cells, and cytokines in plasma. We found that the expression of TLR2, TLR4, TLR5, IL-8, TNF- α and IL-10 was higher in the group of symptomatic patients infected compared with uninfected.

A correlation between the expression of TLR2 and IL-8 secretion was observed an infiltration of mononuclear cells to moderately severe was presented and a moderate infiltration absent in the case of neutrophils. Was determined that 79% of the isolates showed pathogenicity island integrated, the *cagA* (79%), *babA2* (42.1%), *oipA* (78.95%), *vacA s1m1* (68.4%), *s1m2* (10.5%) gene, *s2m2* (21.5%). No correlation between the presence of the pathogenicity island and the expression of TLRs was observed.

The expression of TLR2, TLR4 and TLR5 in peripheral blood mononuclear cells of symptomatic group showed decreased expression for the three TLRs also showed significant concentrations of IL-8. The asymptomatic group showed a significant increase in mononuclear cells of TLR4 and IL-10 in plasma. No correlation between the expression of

TLR4 and IL-10 was found. In conclusion, our results show that *H. pylori* infection in symptomatic and asymptomatic children alters the expression of TLRs in gastric mucosa and peripheral blood mononuclear cells.

INTRODUCCIÓN

El género *Helicobacter* pertenece a la subdivisión ϵ de las proteobacterias, al orden *Campylobacter* y a la familia *Helicobacteraceae*. Actualmente, el género *Helicobacter* se compone de 20 especies reconocidas, entre las cuales se encuentran *H. canis*, *H. pullorum*, *H. cinaedi*, *H. fennelliae*, *H. canadensis*, *H. winghamensis*, *H. westmeadi* y *H. rappini*. Las cuales han sido aisladas de diarrea o bacteremias humanas (Fox J, 2002). Algunas de estas especies, también presentan potencial zoonótico como *H. heilmannii* y *H. felis*, y están relacionadas con el desarrollo de gastritis en diferentes hospederos incluyendo el humano (Solnick J, 2001). *H. pullorum* se aisló de humanos y aves de corral, *H. canis* de perros, gatos y humanos, *H. cinaedi* de humanos, primates, perros y hamsters así como *H. rappini* aislada de perros, gatos, ratones, humanos y primates (Fox J, 2002). *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) es una bacteria Gram negativa, que infecta la mucosa gástrica de más del 50% de la población mundial, esta bacteria coloniza el estómago humano está asociada a gastritis, úlcera gástrica, linfoma tipo MALT y adenocarcinoma (Dzierzanowska-Fangrat K, 2006). La seroprevalencia de la infección por *H. pylori* es más alta en países en vías de desarrollo que en los desarrollados (Torres J, 1998). En México, el 50% de los niños a los 10 años de edad se encuentran colonizados y esta cifra aumenta a más del 80% en la población adulta (Torres J, 1998). La seroprevalencia como la edad de colonización varía entre los países, en Bangladesh se estima que del 58-70% de los niños a los 8 años se encuentran infectados, en Chile se determinó una seroprevalencia del 70% a los 9.5 años, Etiopia representa la seroprevalencia más alta debido a que a los 6 años de edad el 80% de los niños se encuentran infectados (Torres J, 1998). Por el contrario, países como Bélgica, Suiza en Inglaterra la seroprevalencia es de alrededor del 30%, como se observa en la **Figura 1** (Torres J, 2000; Allaken R, 2002; Uemura N, 2001).

La niñez, representa la etapa de adquisición de esta bacteria la cual persiste hasta la vida adulta incrementando el riesgo de desarrollar: gastritis atrófica, metaplasia, displasia y cáncer gástrico.

Debido a esto, *H. pylori* esta clasificada como carcinógeno humano tipo I, por la International Agency for Research on Cancer (IARC) (IARC, 1994). La infección por *H. pylori*, se adquiere en la niñez por mecanismos que no están completamente entendidos, aunque se ha propuesto que la vía oral-oral ó fecal-oral puede jugar un papel importante. Una vez adquirida la infección, esta permanece de forma crónica en el estómago induciendo una respuesta inflamatoria constante a lo largo de la vida del sujeto infectado (Singh M, 2006).

A pesar del alto porcentaje de la población infectada, sólo una pequeña parte, que va del 10 al 15%, en la vida adulta desarrollará enfermedades gastroduodenales como: úlcera duodenal, úlcera gástrica y solo del 1 al 3% de la población infectada desarrollará adenocarcinoma gástrico ó linfoma gástrico (Castillo-Rojas G, 2004). En población infantil, existen pocos casos publicados de úlcera (Moura S, 2008; Queiroz D, 2005) ó linfoma tipo MALT en niños (Claviez A, 2006; Mo J, 2004). La mayoría de los niños no presentan síntomas específicos, aunque algunos suelen presentar náuseas, vómito y dolor epigástrico (Fox J, 2002).

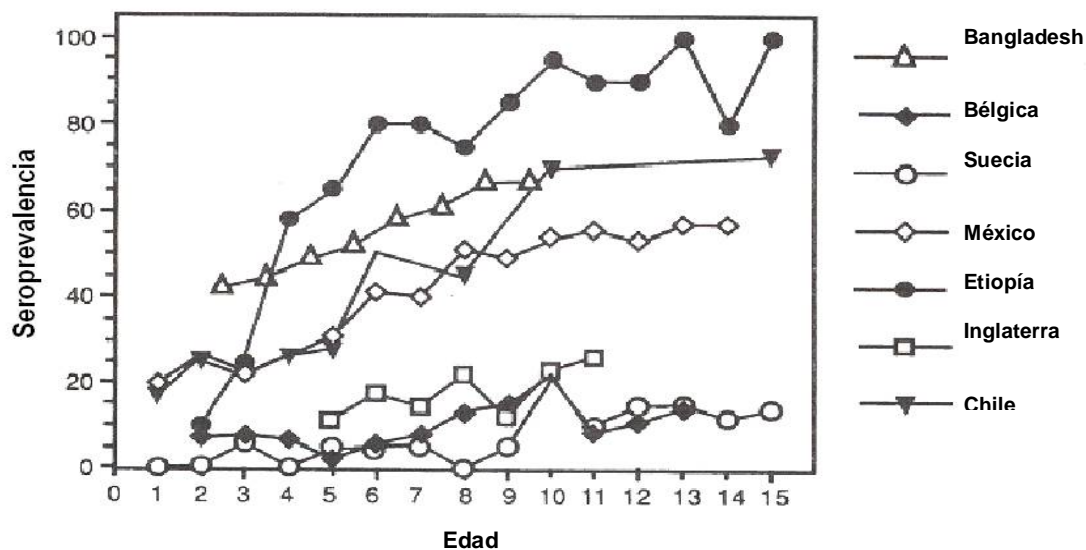


Figura 1. Seroprevalencia en poblaciones de niños de varios países (Torres J, 2000)

FACTORES DE VIRULENCIA

El éxito en la colonización de la mucosa gástrica, de *H. pylori* se debe a que posee diversas estrategias que le permiten sobrevivir y persistir entre los cuales se encuentran: ureasa, flagelos, adhesinas y moléculas efectoras como la proteína asociada a la citotoxina A (CagA) y la citotoxina vacuolizante (vacA), como puede apreciarse en la **Figura 2**.

Durante el proceso de colonización, *H. pylori* genera grandes cantidades de la enzima ureasa, esta hidroliza la urea presente en la mucosa gástrica transformándola en dióxido de carbono y amoníaco, confiriéndole un entorno neutro alrededor de la bacteria, logrando así persistir y reproducirse en el medio ácido del estómago, *H. pylori* posee forma espiral y de 4 a 6 flagelos polares, con los cuales logra penetrar la capa de moco y adherirse a las células epiteliales gástricas (Dzierzanowska-Fangrat K, 2006). Asimismo, *H. pylori* presenta diversas proteínas de membrana externa que le permiten adherirse al epitelio gástrico, una de las más estudiadas es la adhesina de unión a grupo sanguíneo (BabA), esta proteína presenta dos alelos *babA1* y *babA2*, solo este último es funcional (Rad R, 2002).

Por otra parte, la proteína inflamatoria de membrana externa A (OipA), codificada por el gen *hopH* presente en todas las cepas de *H. pylori*, puede funcionar como un adhesina de acuerdo a su expresión, la cual es modulada por dinucleótidos repetidos en la región 5' del gen, se ha observado que la expresión de *oipA* también está estrechamente relacionada con un incremento en la secreción de CXCL8 (Yamaoka Y, 2000). Otro factor de virulencia importante es la proteína CagA, codificada por el gen *cagA*, generalmente relacionado a la presencia de la isla de patogenicidad *cag* (*cag*-PAI) de *H. pylori* (Hatakeyama M, 2004).

Existe evidencia que indica, que las personas colonizadas con cepas que presentan la proteína CagA presentan un mayor riesgo de llegar desarrollar gastritis severa, úlcera péptica o cáncer gástrico que las personas con cepas *cagA*- (Peek R, 1995). Además de esto, se ha establecido que CagA es una molécula efectora pro-oncogénica, involucrada en el desarrollo del cáncer

hepatobiliar y gástrico (Boonyanugomol W, 2012; Murata-Kamiya N, 2007). Esta proteína, se encuentra presente en el 39.2% de las cepas aisladas de mexicanos con gastritis crónica (Paniagua G, 2009).

Un factor de virulencia importante sin duda lo es la isla de patogenicidad de *H. pylori* (cag-PAI), esta se compone de un segmento de ADN de 40 Kb que contiene al menos 30 genes, los cuales codifican para el sistema de secreción tipo IV (SSTIV) presente en las cepas de *H. pylori* con una virulencia mayor, el SSTIV es capaz de liberar a la proteína CagA y peptidoglicano al interior de la célula de hospedero, este se compone de 11 proteínas VirB (codificadas por los genes *virB1-virB11*) además de la proteína de acoplamiento VirD4 (Tegtmeyer N, 2011). En la cag-PAI, se ha observado que algunas cepas se encuentran divididas por un elemento transponible (IS605), dividiéndola en dos regiones *cag I* y *cag II* estas presentan de 14 a 16 marcos de lectura aproximadamente (Slater E, 1999). La inserción del elemento IS605 entre la región *cag I* y *cag II* genera cepas de *H. pylori* con diferentes niveles de virulencia (Deguchi R, 2004). **Figura 3.**

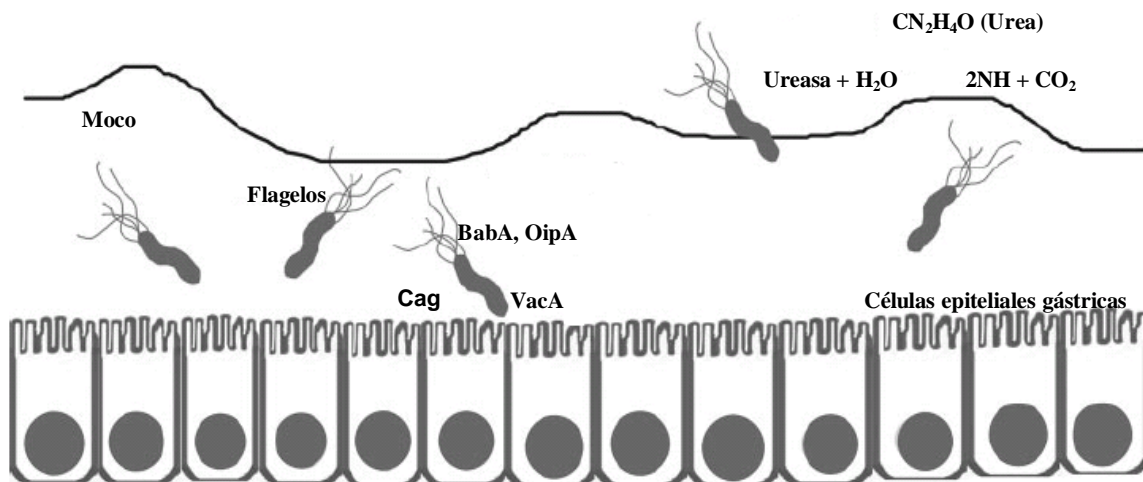


Figura 2. Colonización de *H. pylori*, diversos elementos le permiten a *H. pylori* colonizar el estómago. La ureasa, contribuye a la resistencia del ambiente ácido del estómago, los flagelos le permiten adentrarse en la capa de moco. Asimismo, diversas proteínas de membrana externa como babA, vacA, y oipA median la adherencia y daño a la célula epitelial gástrica (Tomado y modificado de Algood H, 2006).

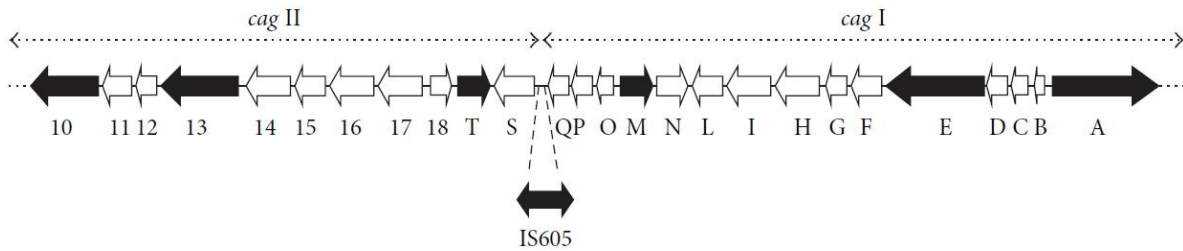


Figura 3. Estructura de la isla de patogenicidad de *H. pylori*, se observa la localización del gen *cagA*, *cagE*, *cagT* y *cag10*.

Asimismo, el SSTIV y el gen *cagA* codificado por la *cag*-PAI están involucrados en la activación e inducción de CXCL8, lo que genera la atracción y activación de neutrófilos, que inducen gastritis grave (Tegtmeier N, 2011; Crabtree J, 1994; Peek P, 1995).

De igual forma la citotoxina vacuolizante VacA otro factor de virulencia importante, es codificada por el gen *vacA* e induce la formación de vacuolas en cultivos de células epiteliales, incrementando la permeabilidad de las células epiteliales gástricas provocando la entrada de sustancias tóxicas y permitiendo la difusión de los nutrientes a la capa de moco, que favorece la permanencia de *H. pylori* (Cover T, 2005). Este gen, presenta 2 variantes alélicas para el péptido señal *s1* y *s2* a su vez *s1* posee los subtipos *s1a*, *s1b* y *s1c*, y en la porción media del gen existen dos variantes alélicas *m1* y *m2* el alelo *m2* puede presentarse como *m2a* o *m2b* (Atherton J, 1997). Las cepas que contienen los alelos *s1/m1* inducen niveles elevados de toxina a diferencia de las variantes *s1/m2* o la *s2/m2*, así el genotipo *s1/m1* se encuentra más relacionado con formas severas de gastritis, atrófia, metaplasia intestinal y cáncer gástrico (Atherton J, 1997).

Todos estos factores de virulencia anteriormente vistos, contribuyen a que *H. pylori* logre persistir y desencadene una respuesta inflamatoria crónica en la mucosa gástrica.

RESPUESTA INMUNE INNATA

La respuesta inicial del hospedero contra la invasión de patógenos es mediada por la inmunidad innata, la cual se basa en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos, que son estructuras comunes a un grupo de patógenos. La inmunidad innata, es un sistema rápido basado en mecanismos físicos, bioquímicos y celulares de defensa que constituyen una barrera física como las superficies epiteliales, por ejemplo; la piel, el revestimiento del tubo digestivo y el de las vías respiratorias que impiden la entrada de microorganismos (Abbas A, 2008).

Otro componente importante, son las células que participan en la inmunidad innata dentro de las cuales se encuentran; macrófagos, células asesinas naturales (NK), eosinófilos, basófilos, neutrófilos, mastocitos y las células dendríticas fundamentales en la unión de la respuesta inmune innata con la respuesta inmune adaptativa, al procesar y presentar antígenos a las células T (Abbas A, 2008; Paul W, 1999).

Todos estos grupos celulares presentan receptores relacionados con la inmunidad innata codificados en la línea germinal sin requerir de re-arreglo genético, esencial para el reconocimiento mediado por la respuesta inmune adaptativa. Estos receptores se conocen como “Receptores de Reconocimiento de Patrón” (PRR, *Pattern Recognition Receptors*), pueden estar expresados en la superficie celular, en compartimientos intracelulares ó ser secretados al torrente sanguíneo y fluidos tisulares (Takeda K, 2005).

Dentro de estos PRRs, se encuentran receptores citosólicos de DNA, receptores tipo Toll (TLRs), receptores RIG-I (Retinoic Acid-inducible gene 1), dominios de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD), CD14, lectina unidora de manosa (MBL), los receptores scavenger, dectina-1, los NLR (receptores tipo NOD) y las pentrexinas, entre otros (Hold G, 2011; Inohara N, 1999; Petersen S, 2001). Dentro de las principales funciones de los PRRs están la opsonización, la activación del complemento, las cascadas de coagulación, la fagocitosis, la activación de vías de señalización inflamatorias y la inducción de la apoptosis (Medzhitov R, 2001).

RECEPTORES TIPO TOLL

Los receptores tipo Toll (TLRs) son un grupo de proteínas conservadas evolutivamente, su presencia se ha reportado en invertebrados marinos tan antiguos como los poríferos dentro de los cuales se encuentran las esponjas de mar (Wiens M, 2005). Los TLRs fueron caracterizados en *Drosophila melanogaster* donde intervienen en el desarrollo embrionario dorsoventral, estudios posteriores demostraron su participación en la respuesta hacia infecciones por bacterias y hongos en el insecto adulto (Takeda K, 2001). En humanos, se han identificado 10 miembros de la familia de los TLRs y en ratones se han encontrado 13 miembros (Kawai T, 2010) como se puede apreciar en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Receptores tipo Toll presentes en humanos y ratones, localización celular y sus ligandos conocidos.

Receptor/co-receptor	Localización celular	Ligando
TLR1	Superficie celular	Triacil lipopéptidos
TLR2 (Dectina-1, Lectina tipo C)	Superficie celular	Peptidoglicano, zymosan, lipoarabinomanana, hemaglutinina, fosfolipomanana, glicosilfosfatidil inositol
TLR3	Endosoma	RNA de cadena sencilla y doble (virus), virus sincicial respiratorio, citomegalovirus murino
TLR4 (MD-2, CD14, LBP)	Superficie celular	LPS, mananas, glicoinositolfosfolipidos, proteínas del virus de tumor mamario y virus sincicial respiratorio, pneumolisina de streptococcus pneumonia, taxol
TLR5	Superficie celular	Flagelina
TLR6/2	Superficie celular	Diacil lipopéptidos, ácido lipoteicoico
TLR7	Endolisosoma	Virus de cadena sencilla, imidazolquinolinas
TLR8	Endolisosomas	RNA de cadena sencilla, imidazolquinolinas
TLR9	Endolisosoma	DNA de cadena doble de citomegalovirus murino y virus del herpes, motivos CpG de bacterias y virus, hemozoina del parásito de la malaria
TLR10	Superficie celular	Péptidos diacilados, Pam ₃ CSK ₄ , PamCysPamSK ₄ ^a
TLR11 (solo en ratón)	Superficie celular	Bacterias uropathogenicas, profilina de <i>toxoplasma gondii</i>
TLR12 (solo ratón)	****	Profilina de <i>toxoplasma gondii</i> ^b
TLR13 (solo ratón)	Endosoma	RNA bacteriano ^c

Tomado y modificado de Kumar H. 2011

^a Govindaraj R, 2010.

^b Koblansky A, 2013.

^c Hidmark A, 2012.

**** Desconocido

Los TLRs son proteínas transmembranales tipo I involucradas en la detección de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), se componen de tres dominios y presentan secuencias ricas repetidas en leucina en el ectodominio, quienes llevan a cabo el reconocimiento con los PAMPs, también presenta un dominio transmembranal y un dominio intracelular que es homólogo al receptor de IL-1R llamado Toll/IL-1R (TIR) el cual inicia la cascada de señalización (Kawai T, 2010). El dominio Toll/IL-1 (TIR) de aproximadamente 160 aminoácidos, contiene tres regiones llamadas caja 1, 2 y 3. La caja 1 contiene la secuencia del dominio TIR, la 2 forma un bucle en la estructura la cual probablemente se acopla con otros elementos para llevar a cabo la señalización (o con otros TLRs cuando ocurre la señalización). La función de la caja 3 no está bien entendida, se postula que participa en la señalización (Slack J, 2000). En conjunto, las tres cajas activan moléculas de señalización como MyD88, IRAKs y TRAF6. MyD88 es la molécula adaptadora utilizada por todos los TLRs excepto el TLR3, presenta un dominio TIR y un dominio de muerte, el carboxilo terminal del dominio TIR interactúa con los dominios afines en las colas citoplasmáticas de los TLRs y el dominio de muerte amino terminal interactúa con el dominio de IRAK-4 y de este modo induce la asociación de IRAK-1 esta es fosforilada en residuos de treonina (T-209), generando un cambio conformacional en el dominio de la cinasa y una posterior fosforilación a residuos de treonina (T-387) (Wesche H, 1997; Li S, 2002). Esto genera la autofosforilación y la actividad enzimática de IRAK-1, la hiperfosforilación de IRAK-1 induce su disociación de MyD88 sin afectar la asociación con TRAF-6 (Kollewe C, 2004). Posteriormente, fosforilados IRAK-1 y TRAF-6 se disocian del complejo y se unen a la proteína de membrana de TAB-1 seguida de la unión de TAK-1 (transforming growth factor- β -activated kinase) y TAB-2. Finalmente, se lleva a cabo la ubiquitinación y degradación de IRAK-1 y el complejo restante se trasloca al citoplasma donde se asociará con las ubiquitin ligasas como UBC-13 y UEV-1 provocando la ubiquitinación y degradación de TRAF-6 (Sun L, 2004). Esto a su vez activa a TAK-1 y la fosforilación de IKK (inhibitor of κ B kinase) del complejo IKK α , IKK β , e IKK γ , así como, MAP

cinasas. Posteriormente, el complejo IKK fosforila a I κ B esto genera su ubiquitinación y posterior degradación, induciendo la liberación y translocación de NF- κ B al núcleo para la transcripción de genes pro-inflamatorios (Tato C, 2002; Karin M, 2005) **Figura 4.**

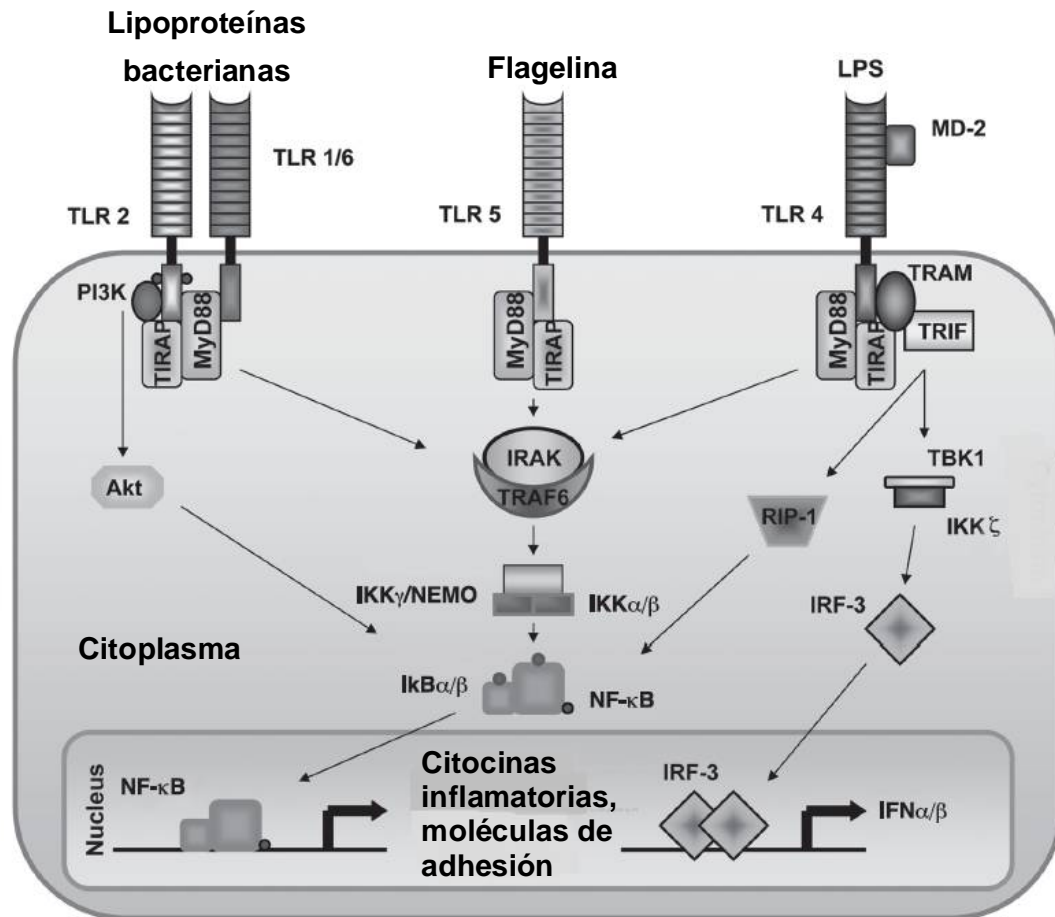


Figura 4. Vías de señalización utilizadas por TLR2, 4 y 5 cuando TLR2, 4 ó 5 son activados MyD88 es reclutado al dominio TLR/TIR para inducir la producción de citocinas proinflamatorias a través de la vía clásica. En la cual, la familia de las proteínas IKK son activadas en un proceso que involucra a IRAK-1 y TRAF-6. El complejo IKK cataliza la fosforilación y degradación por el proteasoma de I κ B α , llevando a la traslocación de NF κ B al núcleo, una vez en el núcleo NF κ B regula la expresión de citocinas proinflamatorias y moléculas de adhesión. TLR2 y TLR4 utilizan la vía independiente de MyD88 que involucra el reclutamiento de PI3K y TRIF al dominio TLR/TRIF. Por otra parte, TLR4 activa la vía dependiente de TRIF que provoca la activación de IRF-3 y la producción de IFN tipo I en respuesta al LPS (Arancibia S, 2007).

RESPUESTA INMUNE INNATA HACIA *Helicobacter pylori*

La colonización del epitelio gástrico por *H. pylori* y subsecuente interacción con el hospedero trae como consecuencia una respuesta inflamatoria. En niños, la infección por *H. pylori* se caracteriza por una respuesta inflamatoria de leve a moderada y por la presencia de un leve infiltrado de células mononucleares, células plasmáticas, células cebadas y neutrófilos contrario a la respuesta observada en adultos. En general, se presenta una pobre respuesta inflamatoria localizada principalmente en las células epiteliales gástricas (Camorlinga-Ponce M, 2003; Whitney A, 2000).

Dentro de esta respuesta inflamatoria se ha observado que los TLRs participan de manera importante. Diversos estudios *in vitro*, muestran que los TLRs pueden reconocer diversas estructuras de *H. pylori*. Yokota S. en el 2007 demostró *in vitro* que al infectar a las líneas celulares MKN45 y MKN28 con aislados clínicos de *H. pylori* de pacientes con gastritis crónica, úlcera gástrica, úlcera duodenal y cáncer gástrico, estas mostraban secreción de CXCL8. Para asegurar que este efecto se debió a la participación de TLR2 se realizaron mutantes dominantes negativos de TLR2 y TLR4 en células T24 sensibles a LPS. El autor observó que la secreción de CXCL8 inducida por el LPS de *H. pylori* fue significativamente suprimida por el dominante negativo de TLR2, mostrando que TLR2 reconoce LPS de *H. pylori* e induce la secreción de CXCL8. Hallazgo similar a lo demostrado por Torok A, en 2005, quién mostró que la línea celular HEK293 TLR2+/+ infectada por la cepa 26695 de *H. pylori* por 24 hrs. incrementaba los niveles del RNAm de CXCL8 a diferencia de la línea celular HEK293 TLR2 -/-.

En relación a TLR4, se ha demostrado que el LPS de *H. pylori* NCTC (11637) estimula la expresión de TLR4 en células gástricas de cobayo (Kawahara T, 2001). En el mismo sentido, Su B, en 2003, encontró que los aislados clínicos de *H. pylori* inducen la expresión de RNAm de TLR4 en células AGS, MKN y T84, independientemente de la presencia de la isla de patogenicidad *cag* (*cag*-PAI). Respecto a TLR5, Smith M, en 2003 demostró que al cultivar la línea celular MKN45 de células epiteliales gástricas con la cepa 26695, estas incrementaban la expresión de RNAm de

TLR5, lo cual se comprobó con la realización de mutantes dominantes negativos de TLR5. Un resultado similar fue el obtenido por Torok A, en 2005 al infectar a la línea celular HEK293 con la cepa 26695 de *H. pylori*, el autor demostró que se incrementaba la secreción de CXCL8 comparado con el testigo no infectado. Por otra parte, un par de estudios en población adulta demostraron la expresión de TLRs en tejido gástrico humano Schmausser B, en 2004, demostró la expresión de TLR 4 y 5 en los polos apical y basolateral de las células epiteliales en biopsias de epitelio gástrico de adultos, con y sin gastritis infectados con *H. pylori*. De igual forma, Pimentel-Nunes P, en 2011, observó que en población adulta la expresión de TLR2, 4 y 5 aumenta conforme progresan las lesiones gástricas, mostrando que a mayor expresión de TLRs mayor daño en el epitelio gástrico. Sin embargo, se desconoce si desde la niñez etapa en la que ocurre la adquisición de *H. pylori*, se está induciendo la sobreexpresión de los TLRs en la mucosa gástrica generando un proceso inflamatorio crónico, lo que podría estar favoreciendo el desarrollo de enfermedad gastroduodenal en la vida adulta.

Asimismo, se ha establecido que la expresión de TLRs va acompañada por la secreción de citocinas, por ejemplo; la estimulación de TLR2 y TLR5 por parte de *H. pylori* induce la secreción de CXCL8 y TNF- α a través de NF κ B (Torok A, 2005; Pachathundikandi K, 2011). Igualmente, se ha observado que TLR2 es capaz de inducir la expresión de IL-10 a través de la ERK MAPK cinasas (Dillon S, 2006). De igual forma, se ha observado que TLR4 puede incrementar la producción de TNF- α de forma sinérgica con TLR2 y TLR6 en un modelo de fibroblastos de ratones deficientes en el receptor antagonista de IL-1 (IL-1Ra) (Young O, 2009). Estableciéndose así, que los receptores tipo Toll son capaces de mediar la producción de citocinas proinflamatorias y reguladoras. En el contexto de la infección por *H. pylori* se ha demostrado que CXCL8, TNF- α e IL-10 participan de forma importante en el desarrollo del proceso infeccioso.

Al colonizar al hospedero el contacto de la bacteria con los monocitos, células dendríticas y las células epiteliales gástricas estimulan la secreción de citocinas proinflamatorias como CXCL8 y

TNF- α y estas a su vez actúan como quimioatrayentes induciendo infiltrado granulocítico, el cual produce especies reactivas de oxígeno que dañan al epitelio gástrico, causan apoptosis y alteraciones genómicas en las células gástricas epiteliales (Crabtree J, 1996; Viala J, 2004; Lehmann F, 2002).

Por otra parte, IL-10 es una citocina reguladora importante en el control de la homeostasis del hospedero. En relación a esto, se ha demostrado que los ratones a los que se les ha eliminado el gen que codifica para IL-10, desarrollan enterocolitis lo que indica que IL-10 participa de manera fundamental limitando la respuesta inflamatoria de las bacterias residentes del intestino (Kuhn R, 1993). Asimismo, se ha establecido que IL-10 inhibe la síntesis de CXCL8 y TNF- α y reduce el grado de gastritis (Holck S, 2003; Ismail H, 2003). Limitando el daño al epitelio gástrico provocado por la inflamación, aunque constituye una limitante a la respuesta inmune para eliminar a *H. pylori*. Por otra parte, diversos estudios muestra que la infección por *H. pylori* también puede causar reacciones inmunológicas que son reflejadas en las células mononucleares de sangre periférica. Karttunen R, en 1997 encontró que el número de leucocitos y basófilos en sangre periférica se incrementa en adultos infectados con *H. pylori*. De forma similar Kondo Y, en 2004, mostró que adultos infectados por *H. pylori* presentaban un incremento en el conteo de neutrófilos y monocitos en sangre periférica. Asimismo, se ha sugerido que los pacientes con úlcera infectados con *H. pylori* expresan un mayor número de moléculas co-estimuladoras como; ICAM-1, VLA-4, Leu-M3, CD28, SLe^x, CD4, HLA-DR⁺, UN-B2, CD8 y CD19 en células mononucleares de sangre periférica, mostrando que *H. pylori* puede inducir efectos a nivel sistémico (Ohara T, 2001; Helmin-Basa A, 2011). Resultados similares, encontró Soares T, en 2005, al observar un mayor porcentaje de moléculas de activación y marcadores co-estimulatorios CD4⁺/CD28⁺ en células mononucleares, en sangre periférica de niños infectados con *H. pylori*. Sin embargo, a pesar de todos estos datos que muestran que *H. pylori* esta generando una respuesta inmune en células mononucleares de sangre periférica, hasta el momento no existen estudios que muestren como se encuentra la

expresión de los TLRs en esta población celular en niños infectados, lo cual podría ayudar a entender mejor la pato-fisiología de la infección.

JUSTIFICACIÓN

La infección por *H. pylori* en la niñez es un factor de riesgo significativo para el desarrollo clínico posterior, ya que puede predisponer al desarrollo de gastritis atrófica, metaplasia intestinal, displasia y cáncer gástrico. Una de las primeras respuestas hacia la bacteria es a través de los TLRs quienes median el proceso inflamatorio. Algunos estudios, indican que los TLRs presentan un aumento en sus niveles de expresión en distintas patologías relacionadas a *H. pylori* en la vida adulta.

No obstante, hasta el momento no se conoce si la presencia de esta bacteria puede modificar la expresión de TLRs y citocinas en la mucosa gástrica de niños y menos aún si esta respuesta es capaz de alterar la expresión de TLRs en células mononucleares de sangre periférica y citocinas en plasma. El estudio de la relación entre *H. pylori* y la respuesta inflamatoria vía TLRs y citocinas, ayudará a entender el desarrollo de las enfermedades atribuidas a esta bacteria lo cual podría ser muy útil para alternativas terapéuticas y de diagnóstico.

HIPÓTESIS

Helicobacter pylori induce el aumento en la expresión de TLRs y citocinas en el epitelio gástrico de niños infectados, asimismo provoca el aumento en la expresión de TLRs y citocinas en células mononucleares de sangre periférica y plasma comparado con niños asintomáticos que no presentan estos cambios.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la presencia de *H. pylori* altera la expresión de TLRs y citocinas en niños sintomáticos y asintomáticos infectados.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el nivel de expresión de TLR2, TLR4, TLR5, CXCL8, TNF- α e IL-10 en biopsias gástricas de niños sintomáticos infectados y no infectados con *H. pylori*.
- Determinar el nivel de expresión de TLR2, TLR4 y TLR5 en células mononucleares de sangre periférica de niños sintomáticos y asintomáticos infectados y sin infección por *H. pylori*.
- Cuantificar la concentración de CXCL8, TNF- α e IL-10 en plasma de niños sintomáticos y asintomáticos infectados y no infectados por *H. pylori*.
- Determinar si existe correlación entre la expresión de TLRs y citocinas en tejido gástrico en el grupo sintomático.
- Determinar si existe correlación entre la expresión de TLRs expresados en células mononucleares y citocinas en plasma en el grupo sintomático y asintomático.
- Determinar la presencia de los genes de virulencia *cagA*, *vacA*, *babA2*, *oipA*, así como, los genes *cagE*, *cagT*, *cag10* de la isla de patogenicidad.
- Establecer si existe correlación entre la expresión de TLRs y la presencia de la isla de patogenicidad.
- Determinar si existe correlación entre los genes *cagA*, *vacA*, *babA2*, *oipA* y la expresión de TLRs y citocinas en mucosa gástrica.
- Determinar el grado de inflamación en el tejido gástrico en el grupo de niños sintomáticos.
- Establecer si existe correlación entre el grado de inflamación y la expresión de TLRs.
- Establecer si existe correlación entre el grado de inflamación y la expresión de citocinas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población sintomática

La población de estudio se integro por 50 niños atendidos por Dolor Abdominal Recurrente (DAR), sometidos a endoscopia de tubo digestivo alto en el servicio de Gastroenterología del Hospital de Pediatría del CMN Siglo XXI, IMSS. De esta población se obtuvo 2 biopsias gástricas de antro y 2 de cuerpo y entre 0.5 a 1 ml de sangre periférica. En todos los casos, se realizó la solicitud de consentimiento informado de los padres para participar en el estudio. El estudio fue aprobado por el comité de ética del Hospital de Pediatría y se siguieron los preceptos de la declaración de Helsinki.

Criterios de inclusión:

- Pacientes masculinos y femeninos menores de 18 años de edad, con indicación de endoscopia.
- Pacientes con diagnóstico de DAR.
- Pacientes que les permitan ingresar al estudio.
- Pacientes a los que se les pueda extraer la muestra de sangre y biopsia.
- Pacientes atendidos en el Hospital de Pediatría CMNSXXI.

Criterios de no inclusión:

- Pacientes que presenten inmunodeficiencias como VIH, leucemias y neoplasias.
- Pacientes que hayan recibido tratamiento antimicrobiano o con anti-inflamatorios, un mes previo al estudio.
- Pacientes cuyos padres, no acepten ingresar al estudio.
- Pacientes cuyo padecimiento no sea relacionado a la infección por *H. pylori*.

Criterio de exclusión

- El paciente será excluido cuando no se obtenga la muestra de sangre ó la biopsia gástrica.
- Cuando el rendimiento de RNAm no sea suficiente.

Criterio de infección para población sintomática

Infectado: Será aquel que resulte positivo en cultivo o a dos de las siguientes pruebas:

Prueba de urea en aliento, histología, serología.

No infectado: negativo a las tres pruebas.

Población asintomática

Esta población se integró por 25 niños con un promedio de edad de 10.6 años (intervalo de 8.4 a 11.6 años) de una escuela primaria que participaron en un estudio de nutrición donando una muestra de sangre. En todos los casos, se realizó la solicitud de consentimiento informado de los padres para participar en el estudio. El estudio fue aprobado por el comité de ética del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS bajo los preceptos de la declaración de Helsinki.

Criterios de inclusión:

- Pacientes menores de 18 años de edad de ambos sexos.
- Pacientes que puedan donar la muestra de sangre.
- Pacientes que les permitan participar en el estudio.

Criterios de no inclusión:

- Niños a los que no les permitan ingresar al estudio.
- Niños con infección bacteriana diferente a *H. pylori*.

Criterio de exclusión

- Cuando la cantidad de sangre, no permita una buena obtención de RNA.

Criterio de infección para población sintomática

Infectado: Positivo en prueba de urea en aliento de acuerdo al valor de corte.

No infectado: Negativo en prueba de urea en aliento, de acuerdo al valor de corte.

MUESTRAS BIOLÓGICAS

Factores del Hospedero

Biopsias. Por medio de endoscopia se tomaron, dos biopsias de antro y dos de cuerpo. Una biopsia de antro y cuerpo se colocó en solución salina para el cultivo de *H. pylori*, el resto se fijó en formalina al 10% y se procesaron para inmunohistoquímica.

Cultivo. Se homogenizó una biopsia con solución salina al 0.9% mediante un homogenizador de vidrio, posteriormente, se inoculó 50 µl de este homogenizado en medio de gelosa sangre de carnero (Becton Dickinson, Cockeysville, EU) al 5%, con y sin antibióticos. Se incubó a 37°C con una atmósfera de 9 % de CO₂ por un periodo de 2 a 10 días. Se consideró como cultivo positivo cuando se observaron colonias características de *H. pylori*, cuando sea positivo a las pruebas bioquímicas de: ureasa, catalasa y oxidasa. Así, como, a la identificación del gen *glmM (ureC)* constitutivo de las cepas de *H. pylori* (Reuse H, 1997). Las cepas positivas se conservaron en caldo Brucella (Becton Dickinson, Cockeysville, EU) con glicerol al 15% a -70°C.

Muestra sanguínea y separación de células mononucleares. Se tomó una muestra de 0.5 a 1 ml de sangre venosa periférica en tubos con EDTA como anticoagulante. Posteriormente, se realizó la separación de células mononucleares por medio de un gradiente de densidad con Lymphoprep (1.077 g/ml) (Axis-Shield, Oslo, Noruega). Centrifugando por 30 min a 1,500 rpm a temperatura ambiente del gradiente obtenido, se tomó 600 µl de plasma para la cuantificación de citocinas. La fase intermedia (células mononucleares), se extrajeron por medio de una micropipeta y se lavaron dos veces con solución salina al 0.9% para eliminar los restos de Lymphoprep. Posteriormente, se centrifugaron a 1,200 rpm durante 5 min. Finalmente, el botón obtenido se resuspendió en 2 ml de solución salina para determinar la viabilidad y conteo celular.

Determinación de viabilidad celular. La viabilidad celular fue evaluada por medio de la incorporación de azul tripano (Sigma Chemical, MO, EU), con una dilución 1:100 se evaluaron células vivas y muertas (teñidas con azul tripano) en una cámara Neubauer (Boeckel, Alemania).

Obtención de RNAm de células mononucleadas por el método de Chomczynski y Sacchi.

A partir de 2×10^6 células mononucleadas humanas, se realizó la lisis de las mismas con 1 ml de Trizol (Invitrogen, CA, EU) agitando por 5 min en vórtex. Posteriormente, se agregó a cada tubo 200 μ l de cloroformo (Merck, NJ, EU) por cada mililitro de trizol, agitándose en el vórtex durante 30 seg. después las muestras fueron incubadas por 2-3 min en hielo y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 15 min a 4°C. Se transfirió la fase acuosa obtenida a un tubo estéril libre de RNasas y se precipitó con 500 μ l de isopropanol (Sigma-Aldrich, MO, EU) durante 20 min, transcurrido este tiempo se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min a 4°C, se retiró el sobrenadante por inversión y el botón de RNA se lavó con 1 ml de etanol (Merck, NJ, EU) al 75% en agua tratada con Dietil Pirocarbonato (DEPC) (Sigma-Aldrich, MO, EU). Enseguida se agitó en vórtex por 30 seg y se centrifugó nuevamente a 14,000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se retiró con puntas tratadas con DEPC, tratando de no desprender el botón de RNA y se dejó evaporar el etanol por 30 min. Después se disolvió, suavemente el botón en 30 μ l de agua libre de RNasas y DNasas. Enseguida, se incubó a 55°C por 10 min para la completa disolución del RNA, transcurrido este tiempo se colocó en hielo el RNA y se tomó 1 μ l para su cuantificación en el espectrofotómetro (Nanodrop, Wilmington, EU) y la integridad se comprobó por medio de geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

Cuantificación de la expresión de RNAm de TLR2, TLR4 y TLR5

La transcripción reversa se realizó mediante el sistema Super Script (Invitrogen, CA, EU) según las instrucciones del fabricante. La expresión del RNAm de TLR2, TLR4 y TLR5 se determinó

cuantitativamente por medio de PCR en tiempo real mediante cuantificación relativa, utilizando como gen de normalización el gen de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), mediante el sistema Taqman (Applied Biosystems, CA, EU). Se utilizaron las siguientes condiciones para la PCR; 1 ciclo a 95°C /1 min, 45 ciclos de 55°C /1 min. y 72 °C /1 min.

Prueba de urea en aliento

Esta prueba fue realizada a la población asintomática para detectar la infección activa de *H. pylori*. Brevemente, a cada niño se le dio a tomar 50 ml. de jugo de naranja con el fin de evitar el vaciamiento del estómago. Pasados 5 min. se realizó la recolección la muestra del aliento basal soplando en un globo. Posteriormente, a los 10 min. se administró una capsula (75 mg) con urea marcada con carbono 13 (¹³C) con 250 ml. de agua. Después de 30 min. se realizó la recolección del aliento por medio de un globo y se llevó al espectrógrafo de masas para su lectura.

Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica se realizó mediante el siguiente procedimiento; brevemente, las muestras se desparafinaron a 62°C por 1 hora. A continuación, se hidrataron en tres baños con xileno por 8 minutos, dos baños en etanol por 5 minutos al 100%, un baño en etanol al 90% por 5 minutos, un baño en etanol al 70% por 5 minutos y un baño en agua destilada por 5 minutos. Se realizó la recuperación antigénica con citrato de sodio por 20 minutos en ebullición, se lavaron las laminillas con Phosphate Buffered Saline (PBS). Enseguida se realizaron 2 lavados con metanol y peróxido de hidrógeno al 3% durante 15 minutos cada uno. Se realizó el bloqueo con suero normal de cerdo al 2% (Gibco BRL, NY, EU) en PBS, durante una hora. Posteriormente, se realizaron lavados con PBS y se colocó el anticuerpo primario anti-TLR2, 4, 5, CXCL8, IL-10 y TNF- α (Santa Cruz Biotechnology, CA, EU), así como el control de isotipo, a una dilución de 1:500, 1:500, 1:750, 1:50, 1:50 y 1:250, respectivamente, se dejó incubar toda la noche. Posteriormente, se lavó con

PBS y se incubó por 1 hora con Biotina (Dako, CA, EU), enseguida se lavo y se incubó con estreptavidina conjugada a peroxidada (Dako, CA, EU). Se revelo mediante (diamino benzidina) (DAB) (Dako, CA, EU). Finalmente, las preparaciones se cubrieron con resina (Epon, PA, EU) y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Análisis morfométrico

Las laminillas conteniendo el corte histológico se analizaron en un microscopio (Olympus BX-40), las células positivas (tinción café), fue cuantificada mediante el programa Microsuite Biological Suite (Olympus BX40, Olympus Latin America). Para cada marcador, se cuantificaron cinco campos por biopsias, los resultados se expresaron como densidad de expresión en 200 μm^2 . Para cada paciente, el resultado es la media de los cinco campos por biopsias analizados.

FACTORES BACTERIANOS

Cepas de referencia

Para determinar el genotipo de *vacA* se utilizó la cepa ATCC 60190 como testigo para el genotipo *s1m1*, la cepa ATCC 8822 como testigo para el genotipo *s2m2* y la cepa J99 como testigo para la identificación del gen *glmM*, *cagA*, *vacA*, *oipA* y *babA2*.

Aislamiento de *H. pylori* y extracción de DNA bacteriano

A partir del crecimiento de las cepas de *H. pylori* en placas de gelosa soya tripticasa con sangre de carnero al 5%, se tomó un barrido de múltiples colonias, las cuales se aislaron y propagaron clonas aisladas para extraer el DNA. Para la extracción del DNA bacteriano, se usó el método comercial Wizard Genomics (Promega, WI, EU), según las instrucciones del fabricante, el DNA obtenido resuspendió con 100 μl de TE y se guardó a 2°C.

Detección de los genes *glmM*, *cagA*, *vacA*, *oipA* y *babA2* por PCR

La detección de los genes de *H. pylori* se realizó por PCR punto final, utilizando iniciadores específicos para los genes *glmM*, *cagA*, *vacA*, *oipA*, y *babA2*, tabla 6 (anexo), la reacción se realizó en un volumen final de 25 μ l, las condiciones utilizadas se muestran en la tabla 6 (anexo).

Genes de la *cag*-PAI

Para la detección de los genes de la isla de patogenicidad (*cagA*, *cagE*, *cagT*, *cag10*) se realizó PCR con iniciadores específicos previamente descritos tabla 7.

Evaluación morfológica de la mucosa gastroduodenal

Se utilizó el criterio establecido en el sistema Sydney (Dixon M, 1996). Este criterio, se basa en las características morfológicas para generar datos clínicos útiles para el diagnóstico histológico. Los resultados se emiten con un valor numérico que equivale a la siguiente escala: 0=normal, 1=leve, 2=moderado y 3=grave o intenso. Por medio de este sistema, se evaluó la colonización, la infiltración de neutrófilos y mononucleares, así, como, el grado de atrofia y metaplasia intestinal, si fuera el caso. Las biopsias fueron evaluadas en el Departamento de Patología del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI por un solo patólogo, sin que el evaluador conociera el origen de la muestra o el cuadro clínico del paciente.

Determinación de citocinas CXCL8, TNF- α e IL-10

La concentración de CXCL8 (1:250); TNF- α (1:500); IL-10 (1:250) se determinó por medio del kit (OptEIA, BD Pharmingen, CA, EU), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Análisis estadístico

Para analizar la intensidad de la inflamación en la mucosa gástrica, se calculó el valor medio de inflamación por paciente, la diferencia en la respuesta inflamatoria entre niño infectados o no

infectados se determinó por prueba de proporciones. Para el análisis de los resultados, se elaboró una base de datos para concentrar los resultados, se utilizó la prueba Mann-Whitney para establecer diferencias entre el grupo infectado y el no infectado con $p=0.05$, y se determinaron las medianas. Se utilizó la prueba de correlación de Spearman y t de student para ver asociación entre la cag-PAI y TLRs y citocinas, los datos fueron analizados mediante el programa Prisma versión 5.01 (GraphPad, CA, EU).

RESULTADOS

Población de estudio

La población de estudio consistió en niños con dolor abdominal Recurrente (DAR) y niños asintomáticos, ambas poblaciones se dividieron en infectados y no infectados con *H. pylori*. En el grupo sintomático, se considero como testigo negativo a los pacientes que presentaban dolor abdominal sin relación a la infección por *H. pylori* (estrés, ingestión de objeto), y como pacientes positivos a aquellos en los que se confirmo la presencia de *H. pylori*. En el grupo asintomático, se utilizó como testigo a la población negativa a la infección. La población positiva se tomó de acuerdo al resultado de la prueba de aliento y se excluyo otro tipo de infección **Tabla 2**.

Tabla 2. Características de la población sintomática y asintomática de estudio.

	Niños sintomáticos <i>n</i> = 50	Niños asintomáticos <i>n</i> = 25
Edad promedio (Intervalo)	10.4± 3.8 (2-16)	10.6± 1.2 (8.4-11.5)
Género (M/F)	25/25	9/16
Hp +	25 (10 niños;15 niñas)	11 (4 niños;7 niñas)
Hp –	25 (15 niños;10 niñas)	14 (5 niños;9 niñas)

Expresión y cuantificación de TLRs en tejido gástrico

Para cuantificar el nivel de expresión de TLR2, 4 y 5 en tejido gástrico de niños sintomáticos, se realizó la detección por medio de inmunohistoquímica y cuantificación del área teñida para cada marcador por medio del programa Microsuite Biological en un microscopio Olympus BX-40 (Olympus FL, EU). En los tres casos, se observó un nivel de tinción mayor en el grupo infectado, TLR2 se ubicó principalmente en la región apical de las células epiteliales, en el caso de TLR4 éste se observó en la región apical y basolateral, así como, en células mononucleares de lámina

propia. TLR5 se localizó en la región apical y basolateral de las células epiteliales gástricas,

Figura 5.

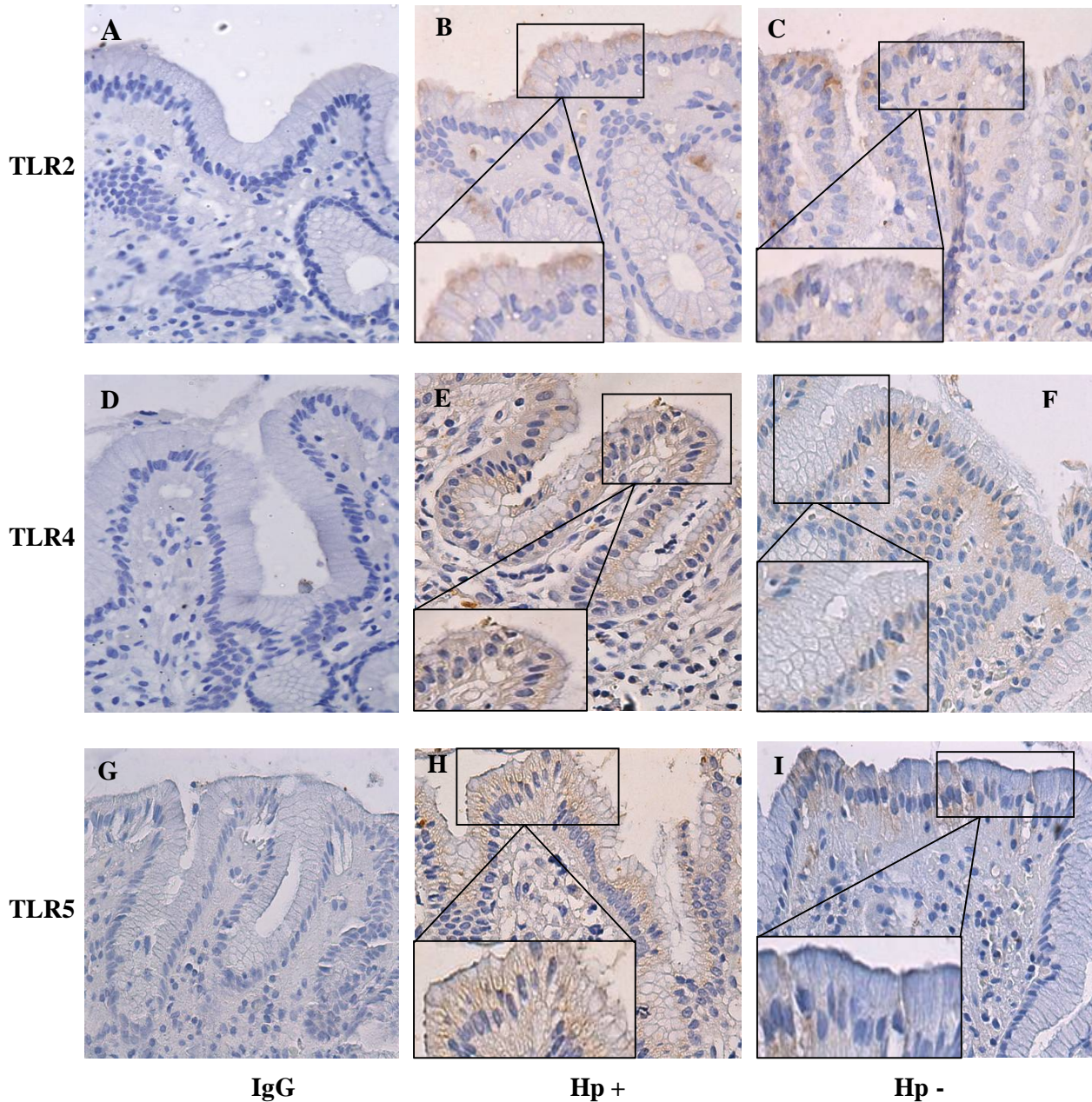


Figura 5. Detección de TLR2, TLR4 y TLR5 en epitelio gástrico de niños sintomáticos infectados y sin infección con *H. pylori* mediante inmunohistoquímica. La tinción para TLR2 se presentó en la superficie de las células epiteliales gástricas (2B y 2C). TLR4 se localizó en la región apical y basolateral de las células epiteliales, así como en células mononucleares de lamina propia (2E y 2F) y en la superficie del epitelio. TLR5 se localizó en la región apical y basolateral de las células epiteliales gástricas (2H y 2L). A, D y G testigos de isotipo, contratinción con H-E 40x.

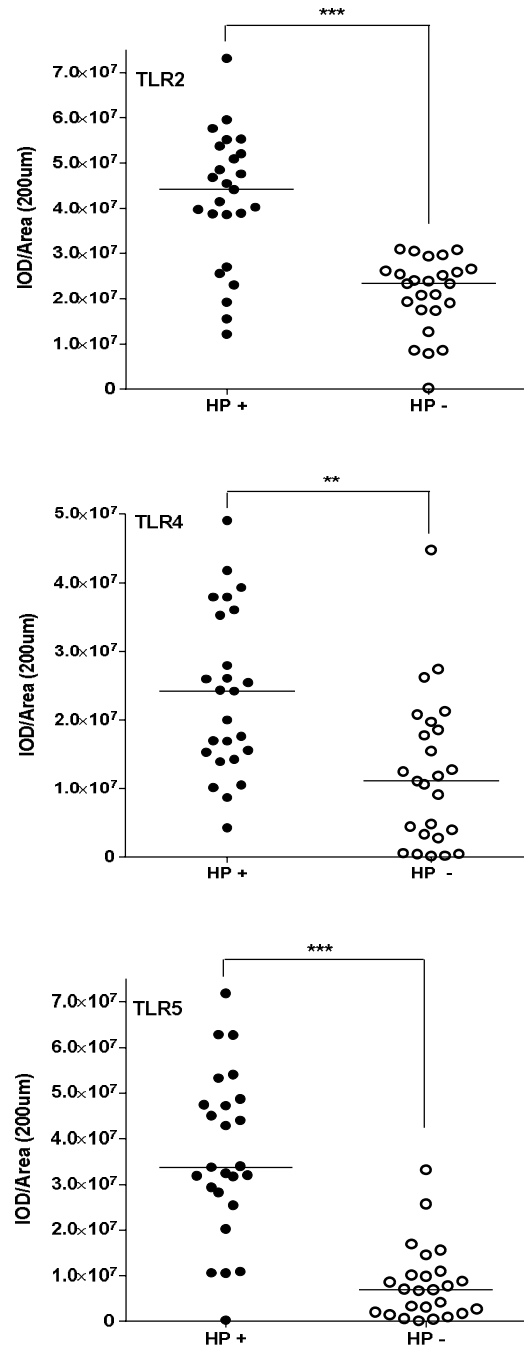


Figura 6. Cuantificación de la expresión de TLRs en biopsias gástricas de niños sintomáticos infectados y no infectados por *H. pylori*. TLR2 ($p=0.0001$); TLR4 ($p=0.0013$); TLR5 ($p=0.0001$). La barra representa la mediana ($*p<0.05$ Mann-Whitney).

De forma similar al procedimiento realizado con los TLRs, se realizó la detección de CXCL8, IL-10 y TNF- α en el epitelio gástrico de niños sintomáticos por medio de inmunohistoquímica, **Figura 7**. Los tres marcadores, mostraron un nivel de tinción mayor en el grupo infectado CXCL8 se localizó en la región apical y en la región basolateral de las células epiteliales gástricas. IL-10 se ubicó principalmente en la región apical, al igual que TNF- α . La cuantificación de estos resultados se muestra en la **figura 8**, los tres marcadores presentaron un aumento estadísticamente significativo en la población infectada respecto a la no infectada.

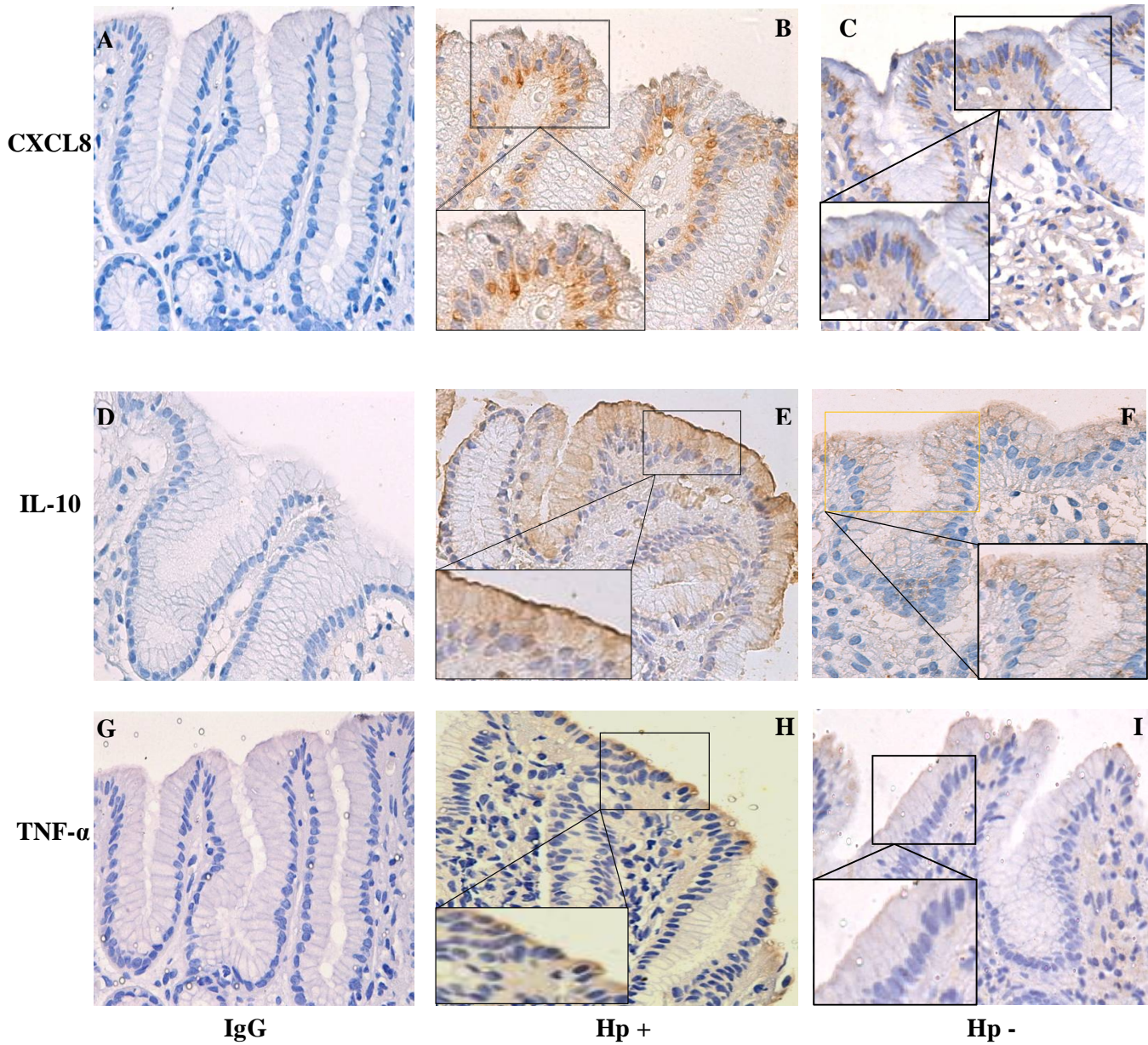


Figura 7. Tinción de CXCL8, IL-10 y TNF- α en tejido gástrico de niños sintomáticos infectados y no infectados con *H. pylori*. CXCL8 se localizó en el epitelio gástrico y la región basolateral de las células epiteliales, IL-10 se observó principalmente en la región apical al igual que TNF- α . A, D, y G controles de isotipo, contratinción con H-E, 40x.

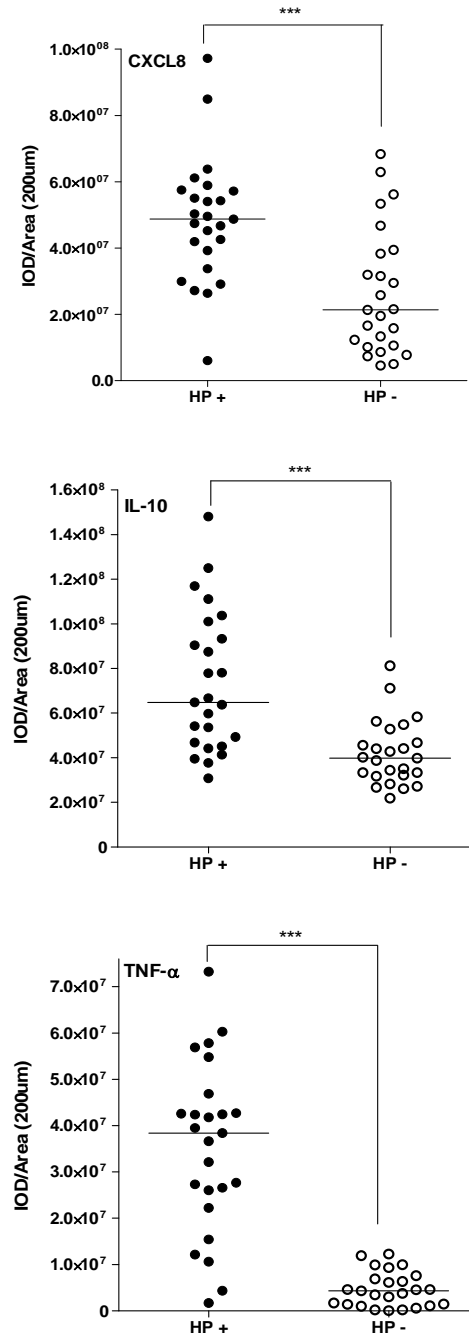


Figura 8. Cuantificación de CXCL8, TNF- α e IL-10 en biopsias gástricas, CXCL8 ($p=0.0001$), IL-10 ($p=0.0001$) y TNF- α ($p=0.0001$), en los tres casos el grupo infectado mostró un aumento significativo en la expresión de cada citocina comparado con el grupo no infectado, la barra representa la media (* $p < 0.05$ Mann-Whitney).

Respuesta inflamatoria del hospedero

La evaluación del grado de inflamación en la mucosa gástrica de los niños sintomáticos se realizó con base en el sistema Sidney. Se encontró que todos los niños presentaron infiltrado de células mononucleares y neutrófilos, tanto infectados y no infectados en el antro y el cuerpo de la mucosa gástrica. Sin embargo, la población no infectada (84%) presentó un nivel de infiltrado de ninguno a medio ($p=0.05$), mientras que alrededor del 60% de la población infectada mostró un nivel de inflamación de moderado a grave de células mononucleares. En relación a los neutrófilos, alrededor del 90% de la población no infectada presentó un nivel de inflamación de ninguno a medio, mientras que la población infectada cercana al 60% mostró un nivel de ninguno a medio ($p=0.05$). Los folículos linfoides se observaron en antro y cuerpo, sin embargo la población infectada mostró una mayor presencia de los mismos (60% y 72%, respectivamente) comparado con la población negativa de las dos regiones del estómago (20% y 16%, respectivamente) **Tabla 3.**

Tabla 3. Evaluación de la intensidad de la respuesta inflamatoria en el antro y el cuerpo de niños, infectados con *H. pylori*.

Intensidad	Antro, No. (%)			Cuerpo, No. (%)		
	<i>Hp+</i>	<i>n= 25</i> <i>Hp-</i>	<i>p</i> ^a	<i>Hp+</i>	<i>n= 25</i> <i>Hp-</i>	<i>p</i> ^a
Mononucleares						
Ninguno-Medio	10(40)	21(84)	0.013	9(36)	21(84)	0.009
Moderado-grave	15(60)	4 (16)	0.118	16(64)	4 (16)	0.085
Neutrófilos						
Ninguno-Medio	16(64)	23(92)	0.030	14(56)	21(88)	0.029
Moderado-grave	9(36)	2 (8)	0.257	11(44)	4(16)	0.319
Folículos linfoides						
Presente	15(60)	5 (20)	0.121	18(72)	4(16)	0.037

^aPrueba de proporciones

Expresión de TLRs en células mononucleares de sangre periférica

Para comprobar, si la infección por *H. pylori* alteraba la expresión de TLR2, TLR4 y TLR5 en células mononucleares de sangre periférica de niños sintomáticos se tomaron muestras de sangre de esta población y se realizó la PCR en tiempo real. Sin embargo, debido al no consentimiento de varios padres para tomar la muestra adicional y al poco volumen de sangre obtenida en muchos casos, solo se logró obtener 25 muestras de pacientes (11 Hp + y 14 Hp -). Para graficar los resultados, se normalizó a 1 la expresión de las muestras negativas a la infección por *H. pylori* y se comparó con las muestras positivas, el resultado muestra que los tres TLRs presentaron niveles de expresión por abajo del testigo negativo a la infección. Para comparar el nivel de expresión estos mismos TLRs en población asintomática, se tomaron muestras de sangre de 25 niños (11 Hp+ y 14 Hp -) que participaron en un estudio de nutrición, los cuales estaban infectados por *H. pylori* y no presentaban síntomas. Para graficar, se normalizó a uno la población no infectada a fin de compararlo con la infectada, el resultado muestra que la expresión de TLR4 fue mayor en el grupo infectado ($p=0.004$), en el caso de TLR2 se presentó una tendencia a incrementar su expresión aunque esta no fue estadísticamente significativa, por el contrario TLR5 mostró disminución en su expresión, como se aprecia en la **Figura 9**.

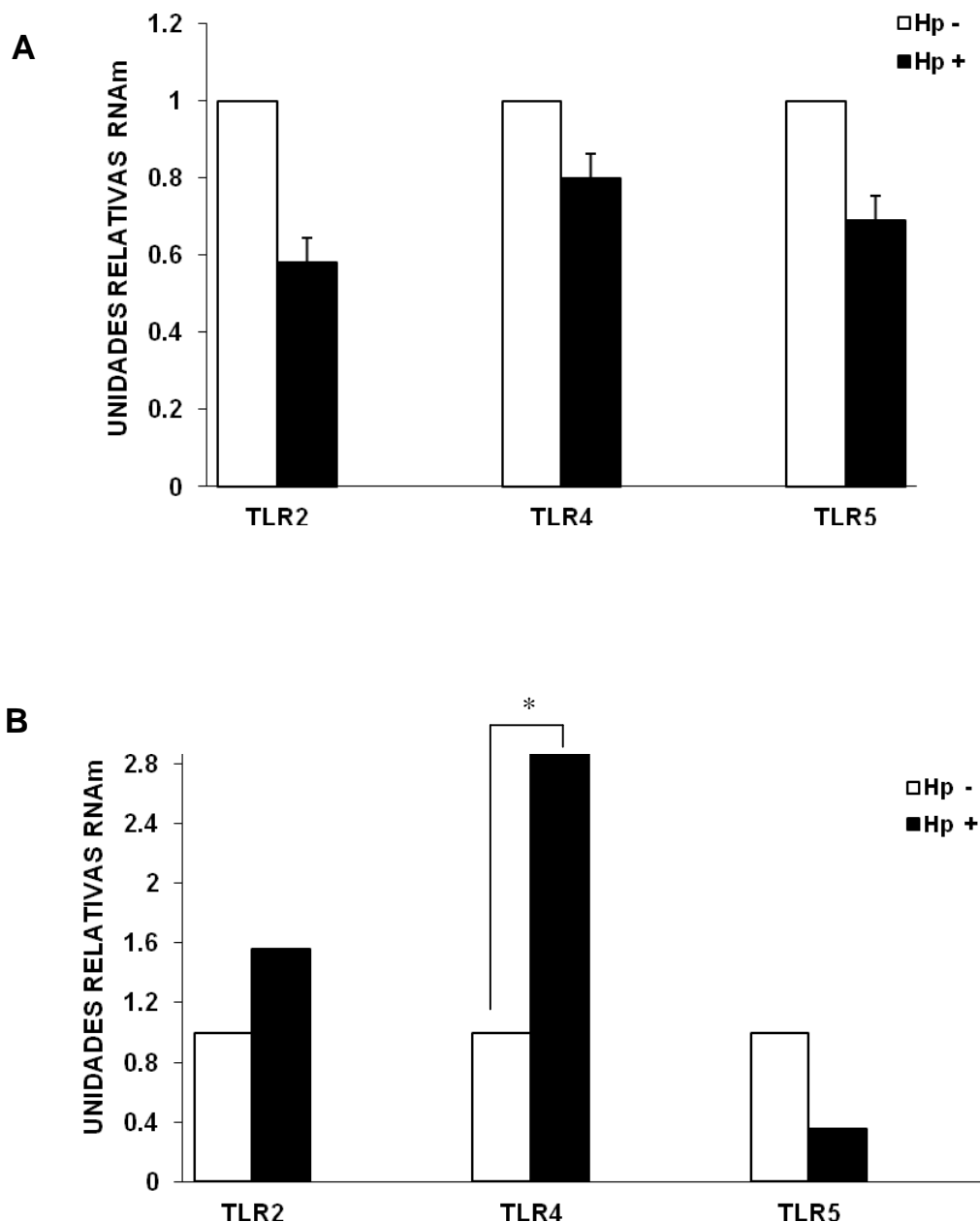


Figura 9. Cuantificación de la expresión relativa de TLR2, TLR4 y TLR5 en células mononucleares de sangre periférica de 25 niños sintomáticos (11 Hp+ y 14 Hp-). En los cuales se observó la expresión disminuida de los pacientes infectados respecto a los no infectados figura **A**. La expresión en la población asintomática 25 niños sintomáticos (11 Hp+ y 14 Hp-) mostró incremento en la expresión de TLR2, aunque no presento diferencia estadística, en el caso de TLR4 el aumento en la expresión fue estadísticamente significativo ($p=0.004$), TLR5 por el contrario presentó disminución en su expresión figura **B**, se uso GAPDH como gen endógeno ($*p<0.05$ Mann-Whitney).

Cuantificación de CXCL8, TNF- α e IL-10 en plasma

La cuantificación de citocinas en plasma de la población sintomática mostró una mayor concentración de CXCL8 en los pacientes infectados ($p=0.02$), no se encontró diferencia con TNF- α e IL-10. En el caso de la población asintomática, se encontró que IL-10 presentó mayor concentración en la población infectada ($p=0.001$), no se observó diferencia con TNF- α e IL-10, como se observa en la **Figura 10**.

Cepas aisladas, integridad de la isla de patogenicidad cag (cag-PAI) y genotipo encontrado

De los 25 pacientes estudiados todos presentaron Dolor Abdominal Recurrente, se logró aislar por cultivo a *H. pylori* en el 36 % de las muestras tomadas, todas las cepas aisladas presentaron el gen *glmM* y fueron positivas por histología. La mayoría de las cepas presentaron un genotipo virulento, la cag-PAI completa se presentó en el 79%, el gen *cagA* en el 79%, el gen *vacA* con el alelo *s1m1* en el 68.42%, el gen de la adhesina *babA2* 42.1 % y el gen *oipA* en el 78.9% **Tabla 5**.

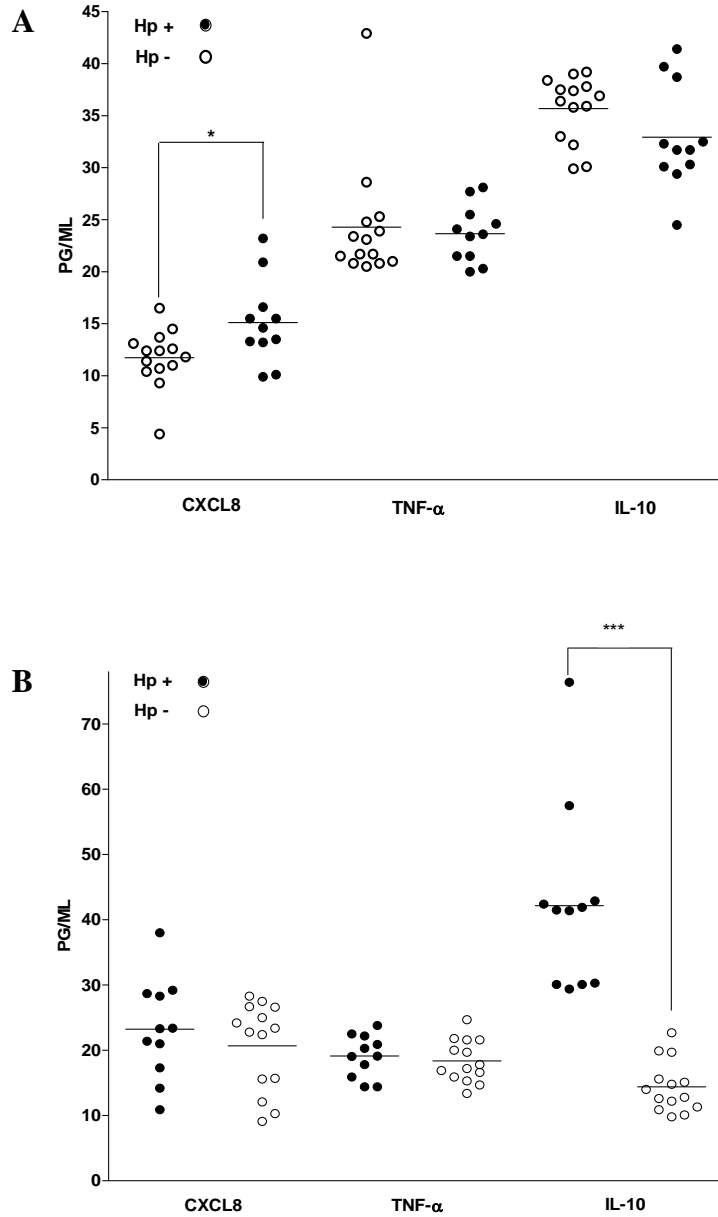


Figura 10. Cuantificación de citocinas en plasma de niños sintomáticos CXCL8 $p=0.02$ **(A)** y asintomáticos IL-10 $p=0.0001$ **(B)** ($*p<0.05$ Mann-Whitney).

Tabla 5. Genotificación de factores de virulencia de las cepas aisladas.

Genotipo		Frecuencia No. (%)
<i>cagA</i>	+	15/19 (79)
	-	4/19 (21)
<i>babA2</i>	+	8/19 (42.1)
	-	11/19 (57.8)
<i>oipA</i>	+	15/19 (78.95)
	-	4/19 (21.05)
<i>vacA</i> *	s1m1	13/19 (68.4)
	s1m2	2/19 (10.5)
	s2m2	4/19 (21.05)

* El 100% de las cepas presentan el gen *vacA*, solo varía el polimorfismo del mismo gen

DISCUSIÓN

La infección por *H. pylori* es muy común en el mundo, desde el momento que esta bacteria ingresa al hospedero la inmunidad innata es la primera en responder a la infección a través de los TLRs, uno de sus principales mecanismos. Los resultados de este trabajo muestran que TLR2, TLR4 y TLR5 se expresan en la mucosa gástrica de niños sintomáticos infectados y no infectados. Los niños, representan el modelo natural más próximo al estado real de la interacción inicial entre TLRs y la bacteria, debido a que no están expuestos a alcohol, tabaco y medicamentos antiinflamatorios que pueden alterar el nivel de inflamación en la mucosa gástrica como en los adultos. Debido a que, se ha observado que la respuesta inflamatoria hacia *H. pylori* en niños es menor que en los adultos (Camorlinga-Ponce M, 2003; Whitney A, 2000).

Nuestros resultados, muestran que la tinción de TLR2, TLR4 y TLR5 fue más intensa en la población infectada. Así, TLR2 se localizó en la región apical del epitelio gástrico, resultado similar a lo encontrado por Uno K, en 2007 en biopsias de adultos. En el caso de TLR4, este se ubicó en la región apical y basolateral así como en células mononucleares de lámina propia, semejante a lo reportado por Ishihara S, en 2004, en población adulta, aunque el autor también observa tinción de TLR4 en citoplasma lo cual contrasta con nuestros resultados y puede deberse al mayor tiempo de expresión (Ishihara S, 2004). Asimismo, MD-2 y CD14 moléculas accesorias esenciales para la activación de TLR4, elevan su expresión en células epiteliales de la mucosa gástrica infectada con *H. pylori*, tanto en el área del antro y el cuerpo gástrico (Ishihara S, 2004; Asahi K, 2007; Li K, 2013).

En relación a TLR5, nosotros observamos una localización principalmente en la región basolateral y poca expresión en la región apical, lo cual difiere a lo encontrado por Schmausser B, 2004 en el epitelio gástrico de adultos con gastritis crónica activa, ya que solo encuentra tinción en la región basolateral del epitelio gástrico.

Referente a esto, la diferencia en la ubicación entre nuestros resultados y la de los otros autores, podría estar reflejando lo que ocurre en el intestino, en el cuál la localización apical o basolateral de TLRs se debe a un principio para discriminar entre bacterias patógenas que invaden el epitelio gástrico y no patógenas que se localizan sobre la superficie luminal. Como lo demostró Cario E, en 2002, *in vitro* al observar la migración de TLR2 y TLR4 en células T84 de epitelio intestinal humano de la región apical a compartimientos citoplasmáticos cerca de la membrana basolateral en respuesta a un gradiente de LPS y peptidoglicano (Cario E, 2002). Asimismo, Schmausser B, en 2004, demostró algo similar en el epitelio gástrico de pacientes adultos con gastritis, el observó que TLR9 puede movilizarse del citoplasma a la región basolateral del epitelio gástrico, lo cual sugiere sea un efecto de la infección por *H. pylori* (Schmausser B, 2004).

El aumento en la expresión de TLR2, TLR4 y TLR5 que nosotros observamos en el tejido gástrico de niños sintomáticos indica que los TLRs podrían estar participando en el repuesta inflamatoria del hospedero hacia *H. pylori* y se está induciendo un nivel de inflamación superior al del grupo testigo. Lo cual a lo largo de los años podría predisponer al desarrollo de diversas patologías relacionadas a la infección por *H. pylori* como lo ha demostrado Pimentel-Nunes P, en 2011; quién, evaluó por medio de inmunohistoquímica la expresión de TLR2, TLR4 y TLR5 en población adulta con mucosa gástrica normal, gastritis crónica, metaplasia intestinal, displasia gástrica y adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal y encontró que la expresión de TLRs en las diversas patologías presentaron un aumento gradual significativo comparado con el nivel basal de la mucosa gástrica normal. Una propuesta interesante para explicar el incremento en la expresión de TLRs es lo señalado por Pimentel-Nunes P, en 2013, quién sugiere que *H. pylori* es el responsable de activar a estos receptores inicialmente, pero en etapas posteriores otros PAMs (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos) y DAMPs (Patrones Moleculares Asociados a Daño) pueden estar jugando un papel importante en el proceso inflamatorio y el desarrollo de carcinogénesis.

Por otra parte, recientemente se demostró que *H. pylori* es capaz de abatir la expresión de TOLLIP y PPAR γ dos proteínas que evitan la respuesta inflamatoria exagerada, por lo que al disminuir la expresión de estas, *H. pylori* estaría induciendo el incremento en la expresión de los TLRs (Pimentel-Nunes P, 2013).

Nosotros, también observamos cierto nivel de expresión de TLRs en la población no infectada, lo cual ha sido visto en otros estudios (Schmauber B, 2004; Uno K, 2007; Ishihara S, 2004; Asahi K, 2007; Pimentel-Nunes P, 2011). Esto, puede ser el resultado de los diferentes antígenos endógenos generados por el constante recambio del tejido gástrico, como proteínas de la matriz extracelular, ácido hialurónico, fibronectina, fragmentos de heparan-sulfato y proteínas de choque térmico los cuales pueden actuar como ligandos endógenos de los TLRs (Schaefer L, 2005; Tsan M, 2009; Scheibner K, 2006; Asahi K, 2007).

Tras observar la elevada expresión de TLR2, TLR4 y TLR5 en tejido gástrico, nosotros evaluamos la expresión de CXCL8, TNF- α e IL-10. Los resultados, muestran que las tres citocinas incrementaron su expresión en el grupo infectado, CXCL8 se localizó en la superficie de las células epiteliales y la región basolateral, lo cual es similar a lo previamente observado por Camorlinga M, en 2003 en biopsias de niños. Al respecto, CXCL8 es una citocina importante en la infección por *H. pylori* ya se ha establecido que participa en la activación y migración de neutrófilos los cuales dañan al epitelio gástrico por las especies reactivas de oxígeno que liberan (Stromber E, 2003). Asimismo, se ha demostrado que favorece el crecimiento del tumor, la invasión y la metástasis por su efecto angiogénico sobre los receptores CXCR1 y CXCR2 (Strieter R, 2001; Kitadai Y, 1999, Kitadai Y, 2000). Por otra parte, la expresión de TNF- α e IL-10 se localizó en la región apical, el incremento observado en la expresión de TNF- α es similar al estudio de Senthilkumar C, en 2011, quién mostró que la expresión de TNF- α se incrementa gradualmente conforme aumentan las lesiones precancerosas, mostrando la participación de esta

citocina en la infección por *H. pylori*. También TNF- α se ha determinado que participa en la apoptosis de las células epiteliales provocada por *H. pylori* lo cual sugiere estar ligado a la carcinogénesis (Stromber E, 2003). Estas características permiten inferir que la expresión constante de CXCL8 y TNF- α podría contribuir al daño en la mucosa gástrica. Aunado a esto, nosotros observamos una mayor expresión de IL-10 incluso mayor a la de CXCL8 y TNF- α , este resultado es similar a lo observado en biopsias de adulto, donde la producción de IL-10 se incrementa en la mucosa gástrica con gastritis crónica causada por *H. pylori* (Bodger K, 1997; Bodger K, 2001). Además, se sabe que IL-10 es una potente citocina anti-inflamatoria que puede inhibir la síntesis de TNF- α e CXCL8 (Fiorentino D, 1991). En relación a esto, se conoce que los cambios gástricos debidos a la infección por *H. pylori* son más marcados en adultos que en niños, lo cual sugiere la existencia de mecanismos regulatorios capaces de atenuar la respuesta inmune para proteger del daño causado por la colonización de esta bacteria. De esta forma, IL-10 podría estar limitando la respuesta inmune a la infección evitando el daño al tejido y a su vez favoreciendo la evasión *H. pylori* de la respuesta inmune del hospedero (Bodger K, 2001).

Nosotros, quisimos observar si existía correlación entre citocinas y TLRs, aunque solo encontramos correlación entre la expresión de TLR2 y CXCL8 ($p=0.017$). De forma similar a lo observado en la expresión de TLRs, nosotros encontramos expresión de CXCL8, TNF- α e IL-10 en la población negativa a la infección. Probablemente, debido a que estas citocinas presentan un estado basal en el hospedero, como fue demostrado en otros estudios (Crabtree J, 1994; Bodger K, en 2001; Senthilkumar C, 2011).

Referente al grado de inflamación, se encontró que el infiltrado de células mononucleares fue asociado a un grado de ninguno a medio cuando se comparo con los no infectados, al igual que en el caso de neutrófilos lo cual concuerda con otros estudios en niños (Muñoz L, 2007; Andersen L, 2005; Noach L, 1994; Ozawa K, 2005), esto indica una pobre respuesta de la mucosa gástrica

de niños hacia *H. pylori*. Igualmente, observamos correlación entre CXCL8 y el infiltrado de células mononucleares y polimorfonucleares en la región del antro ($p=0.026$ y $p=0.013$, respectivamente), indicando que esta citocina está relacionada con el infiltrado de mononucleares y polimorfonucleares.

La presencia de folículos solo fue significativa en el área del cuerpo gástrico en la población infectada ($p=0.037$). Lo cual ha sido observado en otros estudios (Luzza F, 2001; Langner M, 2009). Estudios recientes, han mostrado que la infección por *H. pylori* es capaz de generar una respuesta inmune sistémica (Soares T, 2005; Ohara T, 2000; Kondo Y, 2004). Como una medida, de la respuesta sistémica se han mostrado que *H. pylori* puede inducir el aumento en el número de células circulantes. Kondo Y, en 2004, observó que los pacientes infectados con *H. pylori* incrementaron el número de neutrófilos y monocitos en sangre periférica. Resultados similares a los observados por Soares T, en 2005, quién demostró que además del aumento de linfocitos T CD4+/CD8+, CD4+/CD3+, CD8+/CD3+ y linfocitos B CD19+/CD3-, también encontró un aumento de marcadores co-estimulatorios CD4+/CD28+ en linfocitos T de sangre periférica de niños mayores de 10 años infectados con *H. pylori* mostrando el efecto de esta bacteria en células mononucleares de sangre periférica. Aunque, esto contrasta con otros estudios dónde no encuentran diferencia en el conteo de neutrófilos, linfocitos y monocitos entre sujetos infectados y controles (Sato Y, 2012; Yuceyar H, 2002).

En este sentido, nuestros resultados muestran que el grupo de pacientes sintomáticos presentaron un bajo nivel de expresión de TLR2 TLR4 y TLR5 en células mononucleares de sangre periférica. Al respecto, se ha demostrado que ciertos patógenos son capaces de inhibir pueden inhibir la señalización de los TLRs a través de la secreción de homólogos estructurales al dominio de señalización (TIR) de los TLRs humanos. Ciril C, en 2008, demostró *in silico* que en *B. melitensis* y en *E. coli* uropatogénica CFT073 se encuentran proteínas Tcps (TIR Domain

containing-protein) y son utilizadas para competir por el dominio TIR impidiendo la señalización de los TLRs y la respuesta inmune innata del hospedero (Cirl C, 2008). Asimismo, la proteína TlpA (TIR-like proteína A) de *Salmonella enterica* serovar enteritidis interfiere con la activación mediada por TLRs y MyD88 favoreciendo la acumulación bacteriana intracelular (Newman R, 2006). Nuestros resultados muestran que el grupo testigo sin infección, utilizado para comparar el grupo infectado mostró un nivel de expresión mayor de TLR2, TLR4 y TLR5. Con lo cual podríamos especular que *H. pylori* podría estar utilizando algún mecanismo similar para disminuir la expresión de TLR2, TLR4 y TLR5 en células de sangre periférica de los pacientes sintomáticos, a fin de no inducir una respuesta inflamatoria exacerbada.

Otra explicación interesante a la disminución de la expresión de los TLRs podría ser la tolerancia, el fenómeno de tolerancia definido como un estado disminuido agudo a un segundo desafío de los productos bacterianos como LPS (Wittebole X, 2005). Un estudio que apoya esto, es el realizado en un modelo experimental de endotoxemia humana el cual demostró la modulación diferencial de la expresión de TLR2 y TLR4, esto debido a que se observó disminución en la expresión de TLR4 sobre neutrófilos y una alta expresión de TLR2 en monocitos circulantes (Marsik C, 2003). También la expresión de TLR4 sobre monocitos humanos se ha observado que disminuye después de 24 hrs. tras la estimulación con LPS (Bosisio D, 2002). Asimismo, se ha observado este fenómeno de tolerancia para TLR5. Mizel S, en 2002, demostró que la exposición previa a flagelina recombinante de una bacteria Gram-negativa induce un estado de tolerancia a la misma en monocitos humanos, en células THP1, células Jurkat y células COS-1, el cual se produjo 2 hrs. después de la exposición a flagelina.

Una posibilidad más a la disminución en la expresión de TLR2, TLR4 y TLR5 en células mononucleares podría estar dada por la participación de la citosinas, ya que se ha demostrado que IL-10 puede regular negativamente la expresión de TLRs (Lang T, 2007; Muzio M, 2000). Sin

embargo, nosotros no encontramos correlación alguna entre IL-10 y TLRs en células mononucleares probablemente por la gran variación entre cada paciente.

Con el objeto de comparar este resultado, nosotros cuantificamos la expresión de estos mismos TLRs pero en células mononucleares de individuos infectados asintomáticos. Sorpresivamente, nosotros encontramos, que la expresión de TLR4 en células mononucleares de niños asintomáticos mostró un incremento significativo ($p=0.004$), asimismo TLR2 presentó un incremento en su expresión, aunque este no fue significativo. En el caso de TLR5, este exhibió un nivel muy bajo de expresión.

Nosotros, sugerimos que la expresión de TLR4 en células mononucleares de sangre periférica en el grupo asintomático podría haber sido generada debido a que hubo contacto con LPS de *H. pylori*, ya que se ha demostrado que el LPS de *H. pylori* es 1000 veces menos tóxico que el LPS de *Salmonella minnesota* (Bliss C, 1998). Lo que podría facilitar que esta molécula pudiera permanecer en circulación induciendo la expresión de TLR4, sin provocar una respuesta inflamatoria exacerbada. Asimismo, existe una forma soluble de CD14 la cual aumenta durante la infección por *H. pylori* y se ha observado su presencia en suero de individuos con mucosa gástrica normal y gastritis (Pan Z, 2000). La forma en que este LPS llega a suero no está del todo entendido, sin embargo, probablemente pequeñas cantidades de LPS pueden filtrarse a la circulación y en consecuencia estimular la expresión de TLR4 en células mononucleares de sangre periférica.

Respecto a TLR5, nosotros observamos que el nivel de expresión estuvo muy por debajo del testigo positivo, una probable explicación a este fenómeno podría ser lo hallado por Kwon S, en 2011, quién mostró que al incubar LPS y flagelina con neutrófilos y fagocitos mononucleares aislados de caballos sanos, los neutrófilos respondían produciendo especies reactivas de oxígeno y con la expresión de RNAm para citocinas inflamatorias. Sin embargo, en los fagocitos

mononucleares, no se llevo a cabo la traducción a proteínas mostrando que la flagelina induce diferentes efectos sobre los fagocitos mononucleares y neutrófilos. Lo cuál puede ser debido a un bloqueo específico en la traducción o al rápido recambio de la poca proteína de TLR5 sintetizada en estas células (Kwon S, 2011).

Asimismo, nosotros realizamos la cuantificación de CXCL8, TNF- α e IL-10 en el plasma de sangre periférica del grupo sintomático y asintomático. Diversos estudios muestran que *H. pylori* induce cambios en la concentración de citocinas en suero en ambos grupos (Abdollahi H, 2011; Russo F, 2001; Sack U, 1997; Naito M, 2010).

Nuestros, resultados muestran un incremento significativo en la concentración de CXCL8 en los individuos infectados ($p=0.02$). Hasta el momento, existen muy pocos estudios sobre citocinas en plasma de niños infectados con *H. pylori*. Nuestro resultado, es similar a lo encontrado por Cheng K, en 2004, en población adulta con úlcera duodenal y úlcera gástrica, quién observa que los individuos infectados con *H. pylori* presentan un incremento en los niveles de CXCL8 en suero. Asimismo, Naito M, en 2010, demostró que en adultos japoneses se presentaba una concentración significativa de CXCL8 en plasma, sugiriendo con esto que el aumento en los niveles de CXCL8 están asociados con *H. pylori*.

Nosotros, observamos que CXCL8 presentó un aumento significativo en tejido gástrico y en plasma en el grupo sintomático. Lo cual podría sugerir que esta población probablemente esté más predispuesta a desarrollar alguna patología en la vida adulta. Debido a que, los niveles elevados de CXCL8 en plasma incrementan al doble la probabilidad de desarrollar cáncer gástrico (Epplein M, 2013).

También se observó si existía correlación entre la expresión de TLR2, TLR4 y TLR5 en células mononucleares con la secreción de citocinas en plasma, sin embargo, no la encontramos

probablemente por la gran variabilidad en la expresión de cada individuo. Asimismo, el tamaño de la muestra disminuyó debido a que el volumen de muestra sanguínea fue menor en los individuos, por lo que no se obtenía suficiente rendimiento de RNA para llevar a cabo la obtención de cDNA.

En el caso de la población asintomática, observamos que contrariamente a los sintomáticos, encontramos mayor concentración de IL-10 en el plasma de los individuos infectados ($p=0.001$). Este resultado, contrasta con lo hallado por Russo F, en 2001 quién no encuentra diferencia con la concentración de IL-10 en plasma de adultos asintomáticos infectados con *H. pylori*, aunque se sabe que la respuesta inmune es distinta entre niños y adultos, lo cual podría relacionarse con este resultado. Nosotros, proponemos que la secreción de IL-10 en plasma podría ser inducida por *H. pylori* y de esta forma modular la respuesta inflamatoria, en sangre periférica.

Una explicación probable al aumento de IL-10 en plasma podrían ser las células T reguladoras ya que se ha demostrado son capaces de secretar IL-10 y aumentan su proliferación en la mucosa gástrica infectada por *H. pylori* (Lundgren A, 2005; Harris P, 2008). Sin embargo, existen otras vías por las cuales se pudiera estar efectuando la secreción de IL-10, como las células dendríticas entre otras (Kabisch R, 2014).

Estos resultados, muestran que *H. pylori* modifica el patrón de secreción de citocinas a nivel sistémico, al aumentar la concentración de CXCL8 en el plasma de niños sintomáticos y la concentración de IL-10 en el plasma de niños asintomáticos.

Asimismo, diversos estudios muestran que los factores de virulencia de *H. pylori* pueden desempeñar un papel fundamental en el desarrollo de la respuesta inmune innata del hospedero (Kawahara T, 2001; Torok A, 2005; Pachathundikandi K, 2011). Nuestros resultados, muestran que las cepas aisladas presentaron un genotipo virulento predominando la presencia del gen *cagA* (79%), así como, la presencia de la isla de patogenicidad *cag* (*cag*-PAI) (79%) y el alelo

s1m1 de la citotoxina vacuolizante (68.4%). Diversos estudios, indican que este tipo de factores están relacionados con mayor virulencia y daño al hospedero comparado con las cepas que no presentan este genotipo (Mansour B, 2010; Ko J, 2008; Rudi J, 2000). Se ha demostrado *in vitro* que la cag-PAI puede inducir la secreción de CXCL8 y TNF- α en células THP-1 a través del aumento en la expresión de TLR2 y TLR5 (Pachathundikandi K, 2011). Nosotros, no encontramos asociación entre la presencia de la cag-PAI y la expresión de TLR o la secreción de citocinas en el grupo de pacientes sintomáticos positivos a la infección, esto probablemente a la gran variación en la expresión de los TLRs y citocinas en los pacientes. Asimismo, determinamos la presencia de los genes *cagE*, *cagT* y *cag10*, ya que se ha establecido que estos genes pueden indicar la integridad de la misma (Yakoob J, 2009; Ikenoue T, 2001; Audibert C, 2001; Hsu P, 2002). Se encontró que el 79% de las cepas presento la cag-PAI completa, lo cual es parecido a lo hallado por Cerezo S, en 2006, quien observa que la cag-PAI se presentó en el 90% de las cepas aisladas de niños con gastritis crónica. La cag-PAI se ha asociado con enfermedad gastroduodenal como lo observo Hsu P, en 2002, quién encuentra que la cagPAI se presenta en el 88% de las cepas de pacientes con gastritis, úlcera y cáncer gástrico. Lo que contrasta con lo observado por Talarico S, en 2009, quien observó que las cepas aisladas de niños con gastritis y úlcera gástrica la cag-PAI solo represento el 41%. Este resultado podría indicar que quizá estos pacientes tiendan a desarrollar enfermedad gastroduodenal, que la cag-PAI no es exclusiva de cepas que causan lesiones gástricas o que la cag-PAI es muy inestable y puede perderse fácilmente una vez establecida la infección (Pérez-Pérez G, 2002). En relación a *cagA*, nosotros encontramos que el 79% de las cepas aisladas presentaron este gen lo cual es un porcentaje mayor al 63.4 % observado en cepas del estado de Chiapas, México (Torres J, 2005) y menor al 100% observado en niños estadounidenses infectados con *H. pylori* (Yamaoka Y, 2010).

Concerniente a esto Kim D, en 2013, demostró *in vitro* que la cepa G27 la cuál presenta el gen asociado a la citotoxina A (*cagA*) aumenta la respuesta de TLR2, comparada con la cepa mutante

en *cagA*-. Lo cual sugiere que el gen *cagA* u otra molécula presente en la isla de patogenicidad sea capaz de estimular la secreción de citocinas a través de la activación de TLR2. Sin embargo, no encontramos asociación entre la presencia del gen *cagA* y la expresión de TLRs.

Referente a *vacA* se encontró que el 68.4% de las cepas presentó el alelo s1, seguido por variantes no virulentas. Se ha observado que el alelo s1m1 está relacionado con úlcera y cáncer gástrico en población de América Latina (Sugimoto M, 2009). Nuestro resultado, contrasta con lo observado por González G, en 2000 quien encuentra que el genotipo de *vacA* hallado principalmente en niños es *vacA* s2 y *cagA*-.

Nosotros, también encontramos la presencia de *babA2* y *oipA* dos proteínas también relacionadas a virulencia, la adhesina *babA2* se ha relacionado con úlcera duodenal y cáncer gástrico (Olfat F, 2005; Liu J, 2013). Así como, con el incremento en la secreción de CXCL8 e infiltrado granulocítico provocando una intensa respuesta inflamatoria de la mucosa gástrica (Rad R, 2002). Un hallazgo interesante fue lo demostrado por Ishijima N, 2011, quien demostró que las cepas positivas a *babA2* que se unen a los antígenos de Lewis son potenciadores del sistema de secreción tipo IV (SSTIV), lo que implicaría un posible efecto combinado de *babA2* y otros factores de virulencia relacionados al SSTIV. En relación a *oipA*, nosotros encontramos que este gen se presentó en el 78.95% de las cepas aisladas, similar a lo encontrado por Quiroga A, en 2005, en aislados de pacientes con gastritis no atrófica, gastritis atrófica, metaplasia intestinal y cáncer gástrico. Se ha demostrado que *oipA* desempeña un papel importante en la secreción de CXCL8 e inflamación grave, asimismo, se ha asociado con úlcera péptica y gastritis (Mansour K, 2010; Salih B, 2007). Nosotros, no evaluamos el estado del gen *oipA* (encendido/apagado) por lo que no podemos inferir algún tipo de asociación entre este gen y su participación en la inflamación. Sin embargo, se ha visto que el estado encendido del gen *oipA* se encuentra asociado con el riesgo de desarrollar úlcera péptica en adultos (Liu J, 2013). Varios estudios

muestran que existen diversas variaciones entre los diferentes genes de *H. pylori*, sin embargo, estos hallazgos pudieran reflejar variaciones geográficas entre las cepas de *H. pylori* y los pacientes (Van Doorn N, 1999; Zheng P, 2000).

Nuestros resultados, muestran que la infección por *H. pylori* induce el aumento en la expresión de TLR2, 4 y 5 así como en CXCL8, TNF- α e IL-10 en la mucosa gástrica, asimismo, demostramos que esta bacteria induce una respuesta sistémica en sangre periférica al disminuir la expresión de estos TLRs en células mononucleares de niños sintomáticos e inducir el aumento en la expresión de TLR4 en células mononucleares de sangre periférica de niños infectados asintomáticos. De igual forma, en niños sintomáticos se observaron mayores niveles de CXCL8 en plasma contrario a lo observado en niños asintomáticos donde se encontraron mayores niveles de IL-10. Asimismo, las cepas aisladas de los pacientes sintomáticos presentaron un genotipo mayormente virulento, sin embargo, no se observaron lesiones gástricas. Esto nos indica que *H. pylori* induce una respuesta local y sistémica, la cual podría estar en parte controlada por IL-10 tanto en mucosa gástrica como en sangre periférica.

CONCLUSIONES

- *H. pylori* induce el aumento en la expresión de TLR2, TLR4, TLR5, CXCL8, TNF- α e IL-10 en la mucosa gástrica de niños infectados.
- *H. pylori* modifica el patrón de expresión de TLRs, disminuyendo la expresión de TLR2, TLR4 y TLR5 en células mononucleares de sangre periférica de niños sintomáticos y aumentando la expresión de TLR4 en células mononucleares de sangre periférica de niños asintomáticos.
- *H. pylori* modifica la concentración de CXCL8 en plasma, en el grupo sintomático y una mayor concentración de IL-10 en el plasma del grupo asintomático.
- La mayor parte de las cepas aisladas de la población sintomática infectada presentaron un genotipo virulento.

PERSPECTIVAS

Nuestros resultados sugieren que *Helicobacter pylori* induce el aumento en la expresión de TLRs y citocinas en la mucosa gástrica de niños infectados, asimismo *Helicobacter pylori* pareciera modular la expresión de estos TLRs en sangre periférica del grupo sintomático y asintomático. Sin embargo es necesario aumentar el número de muestras para evaluar la probable relación entre la expresión de TLRs y citocinas en sangre, así como en tejido gástrico. Sería también importante, evaluar poblaciones celulares específicas en sangre periférica para valorar la expresión de TLRs, y de esta forma entender como *Helicobacter pylori* es capaz de generar una respuesta inflamatoria sistémica, la cual podría estar asociada a diversas patologías que se han relacionado con esta bacteria.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas A, Lichtman AH, Pillai S. 2008. Inmunología Celular y Molecular (6ta ed.) Elsevier, España; 565 pp.
2. Abdollahi H, Shams S, Zahedi M, Darvish Moghadam S, Hayatbakhsh MM, Jafarzadeh A. (2011) IL-10, TNF- α and IFN- γ levels in serum and stomach mucosa of *Helicobacter pylori*-infected patients. Iran J Allergy Asthma Immunol., 10(4):267-271.
3. Algood H, Cover T. (2006) *Helicobacter pylori* persistence: an overview of interactions between *H. pylori* and host immune defenses. Clin. Microbiol. Rev., 19(4):597-613.
4. Allaken R, Young K, Hardie J, Donlizio P, Meadows N. (2002) Prevalence of *Helicobacter pylori* at oral and gastrointestinal sites in children evidence for possible oral to oral transmission J. Med. Microbiol., 51(4):312-317.
5. Andersen LP, Holck S, Janulaityte-Günther D, Kupcinskis L, Kiudelis G, Jonaitis L, Janciauskas D, Holck P, Bennedsen M, Permin H, Norn S, Wadstrom T. (2005) Gastric inflammatory markers and interleukins in patients with functional dyspepsia, with and without *Helicobacter pylori* infection. FEMS Immunol Med Microbiol., 44(2):233-238.
6. Arancibia SA, Beltrán CJ, Aguirre IM, Silva P, Peralta AL, Malinarich F, Hermoso MA. (2007) Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. Biol. Res., 40(2):97-112.
7. Asahi K, Fu HY, Hayashi Y, Eguchi H, Murata H, Tsujii M, Tsuji S, Tanimura H, Kawano S. (2007) *Helicobacter pylori* infection affects Toll-like receptor 4 expression in human gastric mucosa. Hepatogastroenterology 54(79):1941-1944.
8. Atherton J, Cao P, Peek R, Tummuru K, Blaser M, Cover T. (1995) Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. J. Biol. Chem., 270(30):17771-17777.

9. Atherton J, Peek R, Tham K, Cover T, Blaser M. (1997) Clinical and pathologic importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol.*, 112(1):92-99.
10. Audibert C, Burucoa C, Janvier B, Fauchere J. (2001) Implication of the structure of the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island in induction of interleukin-8 secretion. *Infect Immun.*, 69(3):1625-1629.
11. Avilés-Jiménez F, Reyes A, Nieto-Patlán E, Hansen L, Burgueño J, Ramos I, Camorlinga-Ponce M, Bermúdez H, Blancas J, Cabrera L, Ribas-Aparicio R, Solnick J, Torres-López J. (2012) *In vivo* expression of *Helicobacter pylori* virulence genes in patients with gastritis, ulcer, and gastric cancer. *Infect Immun.*, 80(2):594-601.
12. Bliss C, Golenbock D, Keates S, Linevsky J, Kelly C. (1998) *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide binds to CD14 and stimulates release of interleukin-8, epithelial neutrophil-activating peptide 78, and monocyte chemoattractant protein 1 by human monocytes. *Infect Immun.*, 66(11):5357-5363.
13. Bodger K, Bromelow K, Wyatt J, Heatley R. (2001) Interleukin-10 in *Helicobacter pylori* associated gastritis: immunohistochemical localisation and *in vitro* effects on cytokine secretion. *J. Clin. Pathol.*, 54(4):285-292.
14. Bodger K, Wyatt J, Heatley R. (1997) Gastric mucosal secretion of interleukin-10: relations to histopathology, *Helicobacter pylori* status, and tumour necrosis factor- α secretion. *Gut* 40(6):739-744.
15. Boonyanugomol W, Chomvarin C, Sripan B, Chau-In S, Pugkhem A, Namwat W, Wongboot W, Khampoosa B. (2012) Molecular analysis of *Helicobacter pylori* virulence-associated genes in hepatobiliary patients. *HPB (Oxford)* 14(11): 754-763.
16. Bosisio D, Polentarutti N, Sironi M, Bernasconi S, Miyake K, Webb G, Martin M, Mantovani A, Muzio M. (2002) Stimulation of toll-like receptor 4 expression in human mononuclear phagocytes

- by interferon-gamma: a molecular basis for priming and synergism with bacterial lipopolysaccharide. *Blood* 99(9):3427-3431.
17. Camorlinga P, Àviles-Jimenez F, Cabrera L, Hernández R, Muñoz O, Torres J. (2003) Intensity of inflammation, density of colonization and interleukin-8 response in the gastric mucosa of children infected with *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 8(5):554-560.
18. Cario E, Brown D, McKee M, Lynch-Devaney K, Gerken G, Podolsky D. (2002) Commensal-associated molecular patterns induce selective toll-like receptor-trafficking from apical membrane to cytoplasmic compartments in polarized intestinal epithelium. *Am J Pathol.*, 160(1):165-173.
19. Castillo-Rojas G, Mazari-Hiriart M, López-Vidal Y. (2004) *Helicobacter pylori*: Focus on *cagA* and *vacA* major virulence factors. *Salud Pub. Mex.*, 46(6):538-548.
20. Cerezo S, Ponce M, Gutierrez G. (2006) Microbiologic, serologic diagnosis, and genotypification of *Helicobacter pylori* isolated from biopsies in children and adult people. Molecular detection of the *cag*-pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, 48(2):99-104.
21. Cheng K, Tang H, Chou F. (2004) Serum IL-8 as a possible marker for determining the status of *Helicobacter pylori* infection in patients with untreated and treated peptic ulcer. *Adv Ther.*, 21(1):39-46.
22. Cirl C, Wieser A, Yadav M, Duerr S, Schubert S, Fischer H, Stappert D, Wantia N, Rodriguez N, Wagner H, Svanborg C, Miethke T. (2008) Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins. *Nat Med.*, 14(4):399-406.
23. Claviez A, Meyer U, Dominick C, Beck C, Rister M, Tiemann M. (2006) MALT lymphoma in children: a report from the NHL-BFM study group. *Pediatr. Blood Cancer* 47(2):210-214.
24. Cover T, Blanke S. (2005) *Helicobacter pylori vacA*, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3(4):320-322.
25. Crabtree J, Wyatt J, Trejdosiewicz L, Peichl P, Nichols P, Ramsay N, Primrose J, Lindley I.

- (1994) Interleukin-8 expression in *Helicobacter pylori* infected, normal, and neoplastic gastroduodenal mucosa. *J Clin Pathol.*, 47(1):61-66.
26. Crabtree, J. (1996) Immune and inflammatory responses to *Helicobacter pylori* infection. *Scand. J. Gastroenterol.*, 215:3–10.
27. Reuse H, Labigne A, Mengin-Lecreulx D. (1997) The *Helicobacter pylori ureC* gene codes for a phosphoglucosamine mutase. *J. Bacteriol.* 179(11):3488-3493.
28. Deguchi R, Igarashi M, Watanabe K, Takagi A. (2004) Analysis of the *cag pathogenicity* island and IS605 of *Helicobacter pylori* strains isolated from patients with gastric cancer in Japan. *Aliment Pharmacol Ther.*, 20(1):13-16.
29. Dillon S, Agrawal S, Banerjee K, Letterio J, Denning T, Oswald-Richter K, Kasproicz D, Kellar K, Pare J, van Dyke T, Ziegler S, Unutmaz D, Pulendran B. (2006) Yest zimozan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigens-presenting cells and immunological tolerance. *J. Clin. Invest.*, 116(4): 916-928.
30. Dixon M, Genta R, Yardley J, Correa P. (1996) Classification and grading of gastritis. The update Sydney system. International Workshop on the histopathology of gastritis. *Am. J. Surg. Pathol.*, 20(10):1161-1181.
31. Kim D, Park J, Franchi L, Backert S, Nuñez G. (2013) The *cag pathogenicity* island and interaction between TLR2/NOD2 and NLRP3 regulate IL-1 β production in *Helicobacter pylori* infected dendritic cells. *Eur. J. Immunol.*, 43(10):2650-2658.
32. Dzierzanowska-Fangrat K, Dzierzanowska D. (2006) *Helicobacter pylori*: microbiology and interactions with gastrointestinal microflora. *J. Physiol. Pharmacol.*, 57(3):5-14.
33. Epplein M, Xiang Y, Cai Q, Peek R, Li H, Correa P, Gao J, Wu J, Michel A, Pawlita M, Zheng W, Shu X. (2013) Circulating cytokines and gastric cancer risk. *Cancer Causes Control* 24(12):2245-2250.
34. Fiorentino D, Zlotnik A, Mosmann T, Howard M, O'Garra A. (1991) IL-10 inhibits cytokine

- production by activated macrophages. *J Immunol.*, 147(11): 3815-3822.
35. Fox J. (2002) The non-*H. pylori* helicobacters: their expanding role in gastrointestinal and systematic diseases. *Gut* 50(2):273-283.
36. González Valencia G, Atherton J, Muñoz O, Dehesa M, Garza A, Torres J. (2000). *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genotypes in mexican adults and children. *J. Infect. Dis.*, 182(5):1450-1454.
37. Govindaraj R, Manavalan B, Lee G, Choi S. (2010) Molecular modeling-based evaluation of hTLR10 and identification of potential ligands in toll like receptor signaling. *PloS ONE* 2010, 5(9):e12713.
38. Harris P, Wright S, Serrano C, Riera F, Duarte I, Torres J, Peña A, Viviani P, Guiraldes E, Schmitz J, Lorenz R, Novak L, Smythies L, Smith P. (2008) *Helicobacter pylori* gastritis in children is associated with a regulatory T cell response. *Gastroenterology* 134(2):491-499.
39. Hatakeyama M. (2004) Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Nat. Rev. Cancer* 4(9):688-694.
40. Helmin-Basa A, Michalkiewicz J, Gackowska L, Kubiszewska I, Eljaszewicz A, Mierzwa G, Bala G, Czerwionka-Szaflarska M, Prokurat A, Marszalek A. (2011) Pediatric *Helicobacter pylori* infection and circulating T-lymphocyte activation and differentiation. *Helicobacter* 16(1):27-35.
41. Hidmark A, von Saint P, Dalpke A. (2012) Cutting edge: TLR13 is a receptor for bacterial RNA. *Immunol.*, 189(6):2717-2721.
42. Holck S, Norgaard A, Bennedsen M, Permin H, Norn S, Andersen L. (2003) Gastric mucosal cytokine response in *Helicobacter pylori*-infected patients with gastritis and peptic ulcers. Association with inflammatory parameters and bacteria load. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, 36(3):175-180.
43. Hold G, Mukhopadhyay I, Monie T. (2011) Innate immune sensors and gastrointestinal bacterial infections. *Clin. Dev. Immunol.*, 2011;579-650.
44. Hsu P, Hwang I, Citty D, Lai K, El-Zimaity H, Gutierrez O, Kim J, Osato M, Graham D,

- Yamaoka Y. (2002) Clinical presentation in relation to diversity within the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island. *Am J Gastroenterol.*, 97(9):2231-2238.
45. Ikenoue T, Maeda S, Ogura K, Akanuma M, Mitsuno Y, Imai Y, Yoshida H, Shiratori Y, Omata M. (2001) Determination of *Helicobacter pylori* virulence by simple gene analysis of the *cag* pathogenicity island. *Clin Diagn Lab Immunol.*, 8(1):181-186.
46. Inohara N, Koseki T, Del peso L, Hu Y, Yee C, Chen S, Carrio R, Merino J, Liu D, Ni J, Nuñez G. (1999) Nod1, and Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappa-B. *J. Biol. Chem.*, 274(21):14560-14567.
47. Internacional Agency for Research on Cancer liver flukes and *Helicobacter pylori*: IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans. Vol. 61. Lyon, France, 1994 receptors.
48. Ishihara S, Rumi M, Kadowaky Y, Ortega-Cava C, Yuri T, Yoshino N, Miyaoka y, Kasumori H, Ishimura N, Amano Y, Kinoshita Y. (2004) Essential role of MD-2 in TLR4-dependent signalling during *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *J. Immunol.*, 173(2):1406-1416.
49. Ishijima N, , Suzuki M, Ashida H, Ichikawa Y, Kanegae Y, Saito I, Borén T, Haas R, Sasakawa C, Mimuro H. (2011) BabA-mediated adherence is a potentiator of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system activity. *J Biol Chem.*, 286(28):25256-25264.
50. Ismail H, Fick P, Zhang J, Lynch R, Berg D. (2003) Depletion of neutrophils in IL-10 (-/-) mice delays clearance of gastric infection and decreases the Th1 immune response to *Helicobacter*. *J Immunol.*, 170(7):3782-3789.
51. Karin M, Greten FR. (2005) NF-kappa B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat. Rev. Immunol.*, 5(10):749-759.
52. Kabisch R, Mejias-Luque R, Gerhard M, Prinz C. (2014) Involvement of Toll-like Receptor on *Helicobacter pylori*-induced immunity. *PLoS One* 9(8):e104804.
53. Karttunen R, Karttunen T, Yousfi M, el-Zimaity H, Graham D, el-Zaatari F. (1997) Expression of

- mRNA for interferon-gamma, interleukin-10, and interleukin-12 (p40) in normal gastric mucosa and in mucosa infected with *Helicobacter pylori*. Scand J Gastroenterol., 32(1):22-27.
54. Kawahara T, Teshima S, Kuwano Y, Oka A, Kishi R, Rokutan K. (2001) Type I *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide stimulates Toll-like receptor 4 and activates mitogen oxidase1 in gastric pit cells. Infect. Immun., 69(7):4382-4389.
55. Kawai T, Akira S. (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptor. Nat. Immunol., 11(5):373-384.
56. Kitadai Y, Haruma K, Mukaida N, Ohmoto Y, Matsutani N, Yasui W, Yamamoto S, Sumii K, Kajiyama G, Fidler IJ, Tahara E. (2000) Regulation of disease-progression genes in human gastric carcinoma cells by interleukin 8. Clin Cancer Res., 6(7):2735-2740.
57. Kitadai Y, Takahashi Y, Haruma K, Naka K, Sumii K, Yokozaki H, Yasui W, Mukaida N, Ohmoto Y, Kajiyama G, Fidler I, Tahara E. (1999) Transfection of interleukin-8 increases angiogenesis and tumorigenesis of human gastric carcinoma cells in nude mice. Br J Cancer 81(4):647-653.
58. Ko J, Kim K, Oh Y, Seo J. (2008) *cagA*, *vacA*, and *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* in Korean children. Pediatr Int., 50(5):628-631.
59. Koblansky A, Jankovic D, Oh H, Hieny S, Sungnak W, Mathur R, Hayden M, Akira S, Sher A, Ghosh S. (2013) Recognition of profilin by Toll-like receptor 12 is critical for host resistance to *Toxoplasma gondii*. Immunity 38(1):119-130.
60. Kollwe C, Mackensen AC, Neumann D, Knop J, Cao P, Li S, Wesche H, Martin MU. (2004) Sequential autophosphorylation steps in the interleukin-1 receptor-associated kinase-1 regulate its availability as an adapter in interleukin-1 signaling. J. Biol. Chem., 279(7):5227-5236.
61. Kondo Y, Joh T, Sasaki M, Oshima T, Itoh K, Tanida S, Kataoka H, Ohara H, Nomura T, Itoh M. (2004) *Helicobacter pylori* eradication decreased blood neutrophil and monocyte counts. Aliment. Pharmacol. Ther., 20(1):74-79.
62. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. (1993) Interleukin-10-deficient mice develop

- chronic enterocolitis. *Cell* 75(2):263-274.
63. Kumar H, Kawai T, Akira S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *Int. Rev. Immunol.*, 30(1):16-34.
64. Kwon S, Gewirtz A, Hurley D, Robertson T, Moore J, Vandenplas M. (2011) Disparities in TLR5 expression and responsiveness to flagellin in equine neutrophils and mononuclear phagocytes. *J Immunol.*, 186(11):6263-6270.
65. Labigne A, Cussac V, Courcoux P. (1991) Shuttle cloning and nucleotide sequences of *Helicobacter pylori* genes responsible for urease activity. *J Bacteriol.*, 173(6):1920-1931.
66. Lang T, Mansell A. (2007) The negative regulation of Toll-like receptor and associated pathways. *Immunol Cell Biol.*, 85(6):425-434.
67. Langner M, Machado R, Patrício F, Kawakami E. (2009) Evaluation of gastric histology in children and adolescents with *Helicobacter pylori* gastritis using the update Sydney system. *Arq Gastroenterol.*, 46(4):328-332.
68. Lehmann F, Terracciano L, Carena I, Baeriswyl C, Drewe J, Tornillo L, De libero G, Beglinger C. (2002) *In situ* correlation of cytokine secretion and apoptosis in *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Am. J. Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 283(2):G481-G488.
69. Li K, Dan Z, Hu X, Ouzhu M, Ciren Y, Wang Z, Wang J, Yang X, Ze Y. (2013) CD14 overexpression upregulates TNF- α -mediated inflammatory responses and suppresses the malignancy of gastric carcinoma cells. *Mol Cell Biochem.*, 376(1-2):137-143.
70. Li S, Strelow A, Fontana EJ, Wesche H. (2002) IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(8):5567-5572.
71. Liu J, He C, Chen M, Wang Z, Xing C, Yuan Y. (2013) Association of presence/absence and on/off patterns of *Helicobacter pylori oipA* gene with peptic ulcer disease and gastric cancer risk: a meta-analysis. *BMC Infect Dis.*, 20(13):555.
72. Lundgren A, Trollmo C, Edebo A, Svennerholm A, Lundin BS. (2005) *Helicobacter pylori*-specific

- CD4+ T cells home to and accumulate in the human *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. *Infect Immun.*, 73(9):5612-5619.
73. Luzzi F, Parrello T, Sebkova L, Pensabene L, Imeneo M, Mancuso M, La Vecchia A, Monteleone G, Strisciuglio P, Pallone F. (2001) Expression of proinflammatory and Th1 but not Th2 cytokines is enhanced in gastric mucosa of *Helicobacter pylori* infected children. *Dig Liver Dis.*, 33(1):14-20.
74. Mandell L, Morán A, Cocchiarella A, Houghton J, Taylor N, Fox J, Wang T, Kurt-Jones E. (2004). Intact gram-negative *Helicobacter pylori*, *Helicobacter felis* and *Helicobacter hepaticus* bacteria activate innate immunity via toll-like receptor 2 but not toll-like receptor 4. *Infect. Immun.*, 72(11):6446-6454.
75. Mansour K, Fendri C, Zribi M, Masmoudi A, Labbene M, Fillali A, Ben Mami N, Najjar T, Meherzi A, Sfar T, Burucoa C. (2010) Prevalence of *Helicobacter pylori vacA*, *cagA*, *iceA* and *oipA* genotypes in Tunisian patients. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.*, 19(9):10.
76. Marsik C, Mayr F, Cardona F, Derhaschnig U, Wagner O, Jilma B. (2003) Endotoxaemia modulates Toll-like receptors on leucocytes in humans. *Br. J Haematol.*, 121(4):653-656.
77. Medzhitov R. (2001) Toll-Like Receptor and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 1(2):135-145.
78. Mizel S, Snipes J. (2002) Gram-negative flagellin-induced self-tolerance is associated with a block in interleukin-1 receptor-associated kinase release from toll-like receptor 5. *J Biol Chem.*, 277(25):22414-22420.
79. Mizushima T, Sugiyama T, Komatsu Y, Ishizuka J, Kato M, Asaka M. (2001) Clinical relevance of the *babA2* genotype of *Helicobacter pylori* in Japanese clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 39(7):2463-2465.
80. Mo J, Dimashkieh H, Mallery S, Swedlow S, Bove K. (2004) MALT lymphoma in children: case report and review of the literature. *Pediatr. Dev. Pathol.*, 7(4):407-413.
81. Moura S, Almeida R, Guerra J, Rocha G, Camargos-Rocha A, Melo F, Correa-Oliveira R, Bittencourt P, Carvalho S, Magalhaes-Queiroz D. (2008) Toll-like receptor (TLR2, TLR4 and

- TLR5) gene polymorphisms and *Helicobacter pylori* infection in children with and without duodenal ulcer. *Microbes Infect.*, 10(14-15):1477-1483.
82. Muñoz L, Camorlinga M, Hernández R, Giono S, Ramón G, Muñoz O, Torres J. (2007) Immune and proliferative cellular responses to *Helicobacter pylori* infection in the gastric mucosa of Mexican children. *Helicobacter* 12(3):224-230.
83. Murata-Kamiya N, Kurashima Y, Teishikata Y, Yamahashi Y, Saito Y, Higashi H, Aburatani H, Akiyama T, Peek RM, Azuma T, Hakateyama M. (2007) *Helicobacter pylori* CagA interacts with E-cadherin and deregulates the beta-catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells. *Oncogene* 26(32):4617-4626.
84. Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, van't Veer C, Penton-Rol G, Ruco LP, Allavena P, Mantovani A. (2000) Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol.*, 164(11):5998-6004.
85. Naito M, Eguchi H, Goto Y, Kondo T, Nishio K, Ishida Y, Kawai S, Okada R, Hishida A, Wakai K, Hamajima N. (2010) Associations of plasma IL-8 levels with *Helicobacter pylori* seropositivity, gastric atrophy, and IL-8 T-251A genotypes. *Epidemiol Infect.*, 138(4):512-518.
86. Newman R, Salunkhe P, Godzik A, Reed J. (2006) Identification and characterization of a novel bacterial virulence factor that shares homology with mammalian Toll/interleukin-1 receptor family proteins. *Infect Immun.*, 74(1):594-601.
87. Noach L, Bosma N, Jansen J, Hoek F, van Deventer S, Tytgat G. (1994) Mucosal tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8 production in patients with *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol.*, 29(5):425-429.
88. Ohara T, Arakawa T, Higuchi K, Kaneda K. (2001) Overexpression of co-stimulatory molecules in peripheral mononuclear cells of *Helicobacter pylori*-positive peptic ulcer patients: possible difference in host responsiveness compared with non-ulcer patients. *Eur. J. Gastroenterol.*

- Hepatology, 13(1):11-18.
89. Olfat F, Zheng Q, Oleastro M, Voland P, Borén T, Karttunen R, Engstrand L, Rad R, Prinz C, Gerhard M. (2005) Correlation of the *Helicobacter pylori* adherence factor BabA with duodenal ulcer disease in four European countries. FEMS Immunol Med Microbiol., 44(2):151-156.
90. Ozawa K, Kato S, Sekine H, Koike T, Minoura T, Iinuma K, Nagura H. (2005) Gastric epithelial cell turnover and mucosal protection in Japanese children with *Helicobacter pylori* infection. J Gastroenterol., 40(3):236-246.
91. Pachathundikandi K, Brandt S, Madassery J, Backert S. (2011) Induction of TLR-2 and TLR-5 expression by *Helicobacter pylori* switches cagPAI-dependent signaling leading to the secretion of IL-8 and TNF- α . Plos One 6(5): e19614.
92. Pan Z, Zhou L, Hetherington C, Zhang D. (2000) Hepatocytes contribute to soluble CD14 production, and CD14 expression is differentially regulated in hepatocytes and monocytes. J Biol Chem., 275(46):36430-36435.
93. Paniagua GL, Monroy E, Rodriguez R, Arroniz S, Rodriguez C, Cortéz JL, Camacho A, Negrete E, Vaca S. (2009) Frequency of vacA, cagA and babA2 virulence markers in *Helicobacter pylori* strains isolated from Mexican patients with chronic gastritis. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob., 30:8-14.
94. Paul WE. 1999 Fundamental Immunology (4th ed.) Lippincott-Raven, EU. 1588 pp.
95. Peek R, Miller G, Tham K, Perez-Perez G, Zhao X, Atherton J, Blaser M. (1995) Heightened inflammatory response and cytokine expression *in vivo* to cagA+ *Helicobacter pylori* strains. Lab Invest., 73(6):760-770.
96. Pérez-Pérez G, Salama A, Kosunen T, Daverman B, Rautelin H, Aroma A, Knekt P, Blaser M. (2002) Evidence that cagA(+) *Helicobacter pylori* strains are disappearing more rapidly than cagA(-) strains. Gut 50(3):295-298.
97. Petersen S, Thiel S, Jensenius J. (2001) The mannan-binding lectin pathway of complement

- activation: biology and disease association. *Mol. Immunol.*, 38;(2-3):133-149.
98. Pimentel-Nunes P, Alfonso L, Lopes P, Roncon-Albuquerque R, Gonçalves N, Henrique R, Moreira-Dias L, Leite-Moreira A, Dinis-Ribeiro M. (2011) Increased expression of toll-like receptors (TLR) 2, 4 and 5 in gastric dysplasia. *Pathol Oncol Res.*, 17(3):677-683.
99. Pimentel-Nunes P, Gonçalves N, Boal-Carvalho I, Afonso L, Lopes P, Roncon-Albuquerque R, Henrique R, Moreira-Dias L, Leite-Moreira AF, Dinis-Ribeiro M. (2013). *Helicobacter pylori* induces increased expression of Toll-like receptors and decreased Toll-interacting protein in gastric mucosa that persists throughout gastric carcinogenesis. *Helicobacter* 18(1):22-32.
100. Queiroz D, Bittencourt P, Guerra J, Rocha A, Rocha G, Carvalho A. (2005) IL1RN polymorphism and *cagA*-positive *Helicobacter pylori* strains increase the risk of duodenal ulcer in children. *Pediatr. Res.*, 58(5):892-896.
101. Quiroga A, Cittelly D, Bravo M. (2005) *BabA2*, *oipA* and *cagE* *Helicobacter pylori* genotypes in Colombian patients with gastroduodenal diseases. *Biomedica* 25(3):325-334.
102. Rad R, Gerhard M, Lang R, Schoniger M, Rosch T, Schepp W, Becker I, Wagner H, Prinz C. (2002) The *Helicobacter pylori* blood group antigen-binding adhesin facilitates bacterial colonization and augments a nonspecific immune response. *J. Immunol.*, 168(6):3033-3041.
103. Rudi J, Kuck D, Rudy A, Sieg A, Maiwald M, Stremmel W. (2000) *Helicobacter pylori vacA* genotypes and *cagA* gene in a series of 383 *H. pylori*-positive patients. *Z Gastroenterol.*, 38(7):559-564.
104. Russo F, Jirillo E, Clemente C, Messa C, Chiloiro M, Riezzo G, Amati L, Caradonna L, Di Leo A. (2001) Circulating cytokines and gastrin levels in asymptomatic subjects infected by *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). *Immunopharmacol Immunotoxicol.*, 23(1):13-24.
105. Sack U, Burkhardt U, Borte M, Schadlich H, Berg K, Emmrich F. (1998) Age-dependent levels of select immunological mediators in sera of healthy children. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5(1):28-32.
106. Salih B, Abasiyanik M, Ahmed N. (2007) A preliminary study on the genetic profile of *cag*

- pathogenicity-island and other virulent gene loci of *Helicobacter pylori* strains from Turkey. *Infect Genet Evol.*, 7(4):509-512.
107. Satoh Y, Ogawara H, Kawamura O, Kusano M, Murakami H. (2012) Clinical Significance of Peripheral Blood T Lymphocyte Subsets in *Helicobacter pylori*-Infected Patients. *Gastroenterol. Res. Pract.*, 2012:819-842.
108. Schaefer L, Babelova A, Kiss E, Hausser HJ, Baliova M, Krzyzankova M, Marsche G, Yuong MF, Mihalik D, Gotte M, Malle E, Schaefer RM, Grone HJ. (2005). The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptor 4 and 2 in macrophages. *J Clin. Invest.*, 115(8):2223-2233.
109. Scheibner K, Lutz M, Boodoo S, Fenton M, Powell J, Horton M. (2006) Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *J Immunol.*, 177(2):1272-1281.
110. Schmausser B, Andrusis M, Endrich S, Lee S, Josenhans C, Müller-Hermelink H, Eck M. (2004) Expression and subcellular distribution of toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on the gastric epithelium in *Helicobacter pylori* infection. *Clin Exp Immunol.*, 136(3):521-526.
111. Senthilkumar C, Niranjali S, Jayanthi V, Ramesh T, Devaraj H. (2011) Molecular and histological evaluation of tumor necrosis factor-alpha expression in *Helicobacter pylori*-mediated gastric carcinogenesis. *J Cancer Res Clin. Oncol.*, 137(4):577-583.
112. Singh M, Prasad K, Yachha S, Saxena A, Krishnani N. (2006) *Helicobacter pylori* infection; prevalence, diagnosis and treatment outcome. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 100(3):227-233.
113. Slack J, Schooley K, Bonnert T, Mitcham J, Qwarnstrom E, Sims J, Dower S. (2000) Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signalling pathways. *J Biol Chem.*, 275(7):4670-4678.
114. Slater E, Owen RJ, Williams M, Pounder R. (1999) Conservation of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*: associations with vacuolating cytotoxin allele and IS605 diversity. *Gastroenterology* 117(6):1308-1315.

115. Soares T, Rocha GA, Rocha A, Correa-Oliveira R, Martins-Filho O, Carvalho A, Bittencourt P, Oliveira C, Faria A, Queiroz D. (2005) Phenotypic study of peripheral blood lymphocytes and humoral immune response in *Helicobacter pylori* infection according to age. Scand J. Immunol., 62(1):63-70.
116. Solnick J, Schauer D. (2011) Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. Clin. Microbiol. Rev. 14(1):59-97.
117. Smith M, Michell A, Li G, Ding S, Fitzmaurice A, Ryan K, Crowe S, Golberg J. (2003) Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells. J. Biol. Chem. 278(75):32552-32560.
118. Strieter R. (2001) Chemokines: not just leukocyte chemoattractants in the promotion of cancer. Nat Immunol., 2(4):285-286.
119. Stromberg E, Edebo A, Svennerholm A, Lindholm C. (2003) Decreased epithelial cytokine responses in the duodenal mucosa of *Helicobacter pylori*-infected duodenal ulcer patients. Clin Diagn Lab Immunol., 10(1):116-124.
120. Su B, Ceponis PJ, Lebel S, Huynh H, Sherman P. (2003) *Helicobacter pylori* activates Toll-like receptor 4 expression in gastrointestinal epithelial cells. Infect. Immun., 71(6):3496-34502.
121. Sugimoto M, Zali M, Yamaoka Y. (2009) The association of *vacA* genotypes and *Helicobacter pylori*-related gastroduodenal diseases in the Middle East. Eur J Clin Microbiol Infect Dis., 28(10):1227-1236.
122. Sun L, Chen Z. The novel functions of ubiquitination in signalling. Curr. Opin. Cell. Biol. 2004, 16;2:119-126.
123. Takeda K, Akira S. (2001) Roles of Toll-like receptors in immune responses. Genes Cells 6(9):733-742.
124. Takeda K, Akira S. (2005) Toll-like receptor in innate immunity. Int. Immunol., 17(1):1-14.
125. Talarico S, Gold B, Fero J, Thompson D, Guarner J, Czinn S, Salama N. (2009) Pediatric

- Helicobacter pylori* isolates display distinct gene coding capacities and virulence gene marker profiles. J Clin Microbiol., 47(6):1680-1688.
126. Tato C, Hunter CA. (2002) Host-pathogen interactions: subversión and utilization of NF-kappa B pathway during infection. Infect. Immun., 70(7):3311-3317.
127. Tegtmeyer N, Wessler S, Backert S. (2011) Role of the *cag-pathogenicity* island encoded type IV secretion system in *Helicobacter pylori* pathogenesis. FEBS J., 278(8):1190-1202.
128. Torok A, Bouton A, Goldberg J. (2005) *Helicobacter pylori* induces interleukin-8 by Toll-like receptor 2-and Toll-like receptor 5-dependent and-independent pathways. Infect. Immun., 73(3):1523-1531.
129. Torres J, Leal-Herrera Y, Pérez-Pérez G, Gómez A, Camorlinga-Ponce M, Cedillo-Rivera R, Tapia-Conyer R, Muñoz O. (1998) A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in México. J. Infect. Dis., 178(4):1089-1094.
130. Torres J, López L, Lazcano E, Camorlinga M, Flores L, Muñoz O. (2005) Trends in *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer in México. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 14(8):187-1877.
131. Torres J, Pérez-Pérez G, Goodman K, Atherton J, Gold B, Harris P, la Garza A, Guarner J, Muñoz O. (2000) A comprehensive review of the natural history of *Helicobacter pylori* infection in children. Arch. Med. Res., 31(5):431-469.
132. Tsan M, Gao B. (2009) Heat shock proteins and immune system. J. Leukoc. Biol., 85(6):905-910.
133. Tummuru M, Cover T, Blaser M. (1993) Cloning and expression of high molecular weight major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. Infect. Immun., 61(5):1799-1809.

134. Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, Schlemper R. (2001) *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N. Engl. J. Med.*, 345(11):784-789.
135. Uno K, Kato K, Atsumi T, Suzuki T, Yoshitake J, Morita H, Ohara S, Kotake Y, Shimosegawa T, Yoshimura T. (2007) Toll-like receptor (TLR) 2 induced through TLR4 signaling initiated by *Helicobacter pylori* cooperatively amplifies iNOS induction in gastric epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 293(5):G1004-1012.
136. Van Doorn N, Namavar F, van Doorn L, Durrani Z, Kuipers E, Vandenbroucke-Grauls C. (1999) Analysis of *vacA*, *cagA*, and IS605 genotypes and those determined by PCR amplification of DNA between repetitive sequences of *Helicobacter pylori* strains isolated from patients with non-ulcer dyspepsia or mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *J Clin Microbiol.*, 37(7):2348-2349.
137. Viala J, Chaput C, Boneca I, Cardona A, Girardin S, Moran A, Athman R, Memet S, Huerre M, Coyle A, DiStefano P, Sansonetti P, Labigne A, Bertin J, Philpott D, Ferrero R. (2004) Nod1 responds to peptidoglycan derived by the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island. *Nat Immunol.*, 5(11):1166-1174.
138. Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, Cao Z. (1997) MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* 7(6):837-847.
139. Whitney A, Guarner J, Hutwagner L, Gold B. (2000) *Helicobacter pylori* gastritis in children and adults: comparative histopathologic study. *Ann. Diagn. Pathol.*, 4(5):279-285.
140. Wiens M, Korzhev M, Krasko A, Thakur N, Perovic-Ottstadt S, Breter HJ, Ushijima H, Diehl-Seifert B, Muller IM, Muller W. (2005) Innate immune defense of the sponge *Suberites domuncula* against bacteria involves a MyD88-dependent signaling pathway. Induction of a perforin-like molecule. *J Biol Chem.*, 280(30):27949-27959.
141. Wittebole X, Coyle S, Kumar A, Goshima M, Lowry S, Calvano S. (2005) Expression of tumour

- necrosis factor receptor and Toll-like receptor 2 and 4 on peripheral blood leucocytes of human volunteers after endotoxin challenge: a comparison of flow cytometric light scatter and immunofluorescence gating. *Clin Exp Immunol.*, 141(1):99-106.
142. Yakoob J, Jafri W, Abbas Z, Abid S, Khan R, Jafri N, Ahmad Z. (2009) Low prevalence of the intact *cag*-pathogenicity island in clinical isolates of *Helicobacter pylori* in Karachi, Pakistan. *Br J Biomed Sci.*, 66(3):137-142.
143. Yamaoka Y, Kwon D H, Graham D. (2000) A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (*oipA*) of *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97(13):7533-7538.
144. Yamaoka Y, Reddy R, Graham D. (2010) *Helicobacter pylori* virulence factor genotypes in children in the United States: clues about genotype and outcome relationship. *J. Clin. Microbiol.* 48(7):2550-2551.
145. Young O, Mi-La C, Seon-Yeong L, Hye-Jwa O, Jin-Sil P, Mi-Kyung P, Min-Jung P, Ji-Hyeon J, Sung-Il K, Sung-Hwan P, Ho-Youn K, Jun-Ki M. (2009) Synergism of toll-like receptor (TLR2), TLR4, and TLR6 ligation on the production of tumor necrosis factor (TNF)- α in a spontaneous arthritis animal model of interleukin (IL)-1 receptor antagonist-deficient mice. *Immunol Lett.*, 123(2):138-143.
146. Yokota S, Ohnishi T, Muroi M, Tanamoto K, Fujii N, Amano K. (2007) Highly-purified *Helicobacter pylori* LPS preparations induce weak inflammatory reactions and utilize Toll-like receptor 2 complex but not Toll-like receptor 4 complex. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 51(1):140-148.
147. Yuceyar H, Saruc M, Kokuludag A, Terzioglu E, Goksel G, Isisag A. (2002) The systemic cellular immune response in the *Helicobacter pylori*-associated duodenal ulcer and chronic antral gastritis. *Hepatogastroenterology* 49(46):1177-1179.
148. Zarembek K, Godowski P. (2002) Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leucocytes in response to microbes, their

products, and cytokines. J. Immunol., 168(2):554-561.

149. Zheng P, Hua J, Yeoh K, Ho B. (2000) Association of peptic ulcer with increased expression of Lewis antigens but not cagA, iceA, and vacA in *Helicobacter pylori* isolates in an Asian population. Gut 47(1):18-22.

Anexo

Tabla 6. Iniciadores utilizados para realizar la amplificación por PCR de los diferentes genes de *H. pylori*.

Gen/ Alelo	Iniciadores	Secuencia de nucleótidos	Tamaño (pb)	Referencia
<i>vacA</i> s1/s2	VA1-F VA1-R	5'ATGGAAATACAACAAACACAC3' CTGCTTGAATGCGCCAAAC	259/286	Atherton J, 1995
<i>vacA</i> m1/m2	VAG-F VAG-R	5'CAATCTGTCCAATCAAGCGAG3' GCGTCAAATAATTCCAAGG	570/645	Atherton J, 1995
<i>cagA</i> 349	F1	5'GATAACAGGCAAGCTTTTTGAGG3'	349	Tummuru M, 1993
	B1	5'CTGCAAAAGAATGTTTGGCAG3'		
<i>cagA</i> region 3'	CAG1	5'ACCCTAGTCGGTAATGGGTTA3'	450-850	Tummuru M, 1993
	CAG2	GTAATTGTCTAGTTTCGC		
<i>babA2</i>	babA2F	5'AATCCAAAAAGGAGAAAAAGTATGAAA3	812	Mizushima T, 2001
	babA2R	TGTTAGTGATTTCCGGTGTAGGAC		
<i>oipA</i>	OIPAfor ^a	5'CCATGAAAAAAGCTCTCTTACT3'	882	Yamaoka Y, 2000
	SO103 ^p	GATCCTCGAGTCAATAAACGCTCACCCTC TTT		
<i>glmM</i>	glmMF	5'GGATAAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGG3'	296	Labigne A, 1991
	glmMR	GCTTACTTTCTAACACTAACGCGC		
<i>cagE</i>		5'GCTAGTCATAGAGCAAGAGGTTCAAAA3'		Avilez-Jimenez F, 2012
		CACAATAACAATCGCTACAATCAAA		
<i>cagT</i>		5'TGTTTTAATCGGTGCGACAA3'		Avilez-Jimenez F, 2012
		GAGCGTAATCTTTTAGAATGGTGAA		
<i>cag10</i>		5'AACGAAGAAGTCTTGATTGATGAAA3'		Avilez-Jiménez F, 2012
		CTGTGTATCGATCAATGCCATAA		

Tabla 7. Condiciones utilizadas en la amplificación por PCR de los genes de *H. pylori*; *glmM*, *vacA*, *cagA*, *babA2* y *oipA*, *cagE*, *cagT*, *cag10*.

Condiciones	<i>glmM</i>	<i>vacA</i>	<i>cagA</i>	<i>babA2</i>	<i>oipA</i>	<i>cagE</i> , <i>cagT</i> , <i>cag10</i>
Pre-calentamiento (Hold)	94 °C/5 min.	94 °C/5 min	95 °C/5 min	95 °C/5 min	96 °C/5 min	92 °C/30 seg
Desnaturalización	94 °C/1 min	94 °C/0.5 min	94 °C/1 min	94 °C/1 min	94 °C/0.5 min	
Alineación	58 °C/1 min.	56 °C/1 min.	55 °C/1 min.	58 °C/1 min.	55 °C/1 min.	45 °C/1 min.
Extensión 1	94 °C/5 min.	94 °C/5 min.	94 °C/5 min.	94 °C/5 min.	94 °C/5 min.	94 °C/5 min.
Extensión 2	72 °C/7 min.	72 °C/7 min.	72 °C/6 min.	72°C/10 min.	72 °C/6 min.	72 °C/6 min.
Enfriamiento	4 °C	4 °C	4 °C	4 °C	4 °C	4 °C

Tabla 8. Iniciadores utilizados para amplificar los TLRs 2, 4 y 5

TLR	Secuencia sentido 5' --- 3'	Secuencia antisentido 5'-----3'	Sonda 5'----3'	Bibliografía
TLR2	GGCCAGCAAATTACCTGTG TG	AGGCGGACATCCTGAACCT	TCCATCCCATGT GCGTGGCC	Zarembek K, 2002
TLR4	CCAGTGAGGATGATGCCAG AAT	GCCATGGCTGGGATCAGAGT	TGTCTGCCTCGC GCCTGGC	Zarembek K, 2002
TLR5	TGCCTTGAAGCCTTCAGTTA TG	CCAACCACCACCATGATGAG	CCAGGGCAGGTG CTTATCTGACCTT AACA	Zarembek K, 2002
GAPDH	ATCGTGAAGGACTCATGA CCACA	TAGAGGCAGGGATGATGTTCT GGA		Zarembek K, 2002

Toll-Like Receptors and Cytokines are Upregulated during *Helicobacter pylori* Infection in Children

Hugo Lagunes-Servin,* Javier Torres,* Carmen Maldonado-Bernal,[†] Martha Pérez-Rodríguez,[‡] Sara Huerta-Yépez,[†] Armando Madrazo de la Garza,[§] Leopoldo Muñoz-Pérez,* Lourdes Flores-Luna,[¶] Guillermo Ramón-García** and Margarita Camorlinga-Ponce*

*Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Mexico City, México, [†]Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas, Hospital Infantil de México Federico Gómez, SS, Mexico City, México, [‡]Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Mexico City, México, [§]Departamento de Gastroenterología y Endoscopia, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Mexico City, México, [¶]Centro de Investigación en Salud Poblacional, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, México, **Departamento de Anatomía Patológica, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Mexico City, México

Keywords

H. pylori, cytokines, TLR, Children, gastric mucosa.

Reprint requests to: Margarita Camorlinga-Ponce, UIIMEIP, Hospital de Pediatría CMN Siglo XXI Av. Cuauhtémoc 330, 2^oP. Col Doctores, México City CP 06720, México.

E-mail: margaritacamorlinga@yahoo.com

Abstract

Background and Aim: *Helicobacter pylori* infection is mainly acquired during childhood, and establishes a chronic infection that may lead to peptic ulcer or gastric cancer during adulthood. Toll-like receptors (TLRs) are expressed by distinct cell types throughout the gastrointestinal tract, and play an important role in regulation of the innate immune response. Few works have addressed TLRs expression in gastric epithelia of adults, and scarce studies have done it in children. The aim of this work was to analyze the expression of TLR2, TLR4, TLR5, TLR9, and IL-8, IL-10 and TNF- α in the gastric mucosa of children with and without *H. pylori* infection.

Methods: Gastric biopsies were collected by endoscopy from 50 children with recurrent abdominal pain, 25 with *H. pylori* infection and 25 without infection. In the gastric biopsies the expression of TLRs and cytokines was studied by immunohistochemistry, and the degree of mucosal inflammation was determined using the Sydney system.

Results: We found that *H. pylori* infection was associated with a significant increased expression of TLRs 2, 4, 5 and 9, although expression varied between surface epithelia and glands. Epithelial cells expressing IL-8, IL-10 and TNF- α were increased in gastric mucosa of children with *H. pylori* infection.

Conclusion: This study shows the gastric epithelia of children respond to *H. pylori* infection by increasing the expression of TLR2, TLR4, TLR5, TLR9 and the cytokines IL-8, IL-10 and TNF- α .

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is a Gram-negative bacterium that colonizes the human gastric epithelium of approximately 50% of the world population [1,2]. Infection by *H. pylori* is usually acquired in childhood and persists in the gastric mucosa during the lifetime of the individual, despite the activation of mechanisms of innate and adaptive immunity against different antigens of the bacterium. The reasons for the failure of the immune system to eradicate the infection are not yet fully understood [3]. Furthermore, different lines of evidence suggest that the immune response contributes to the pathogenesis of *H. pylori*-associated diseases [4].

Infection by *H. pylori* invariably induces chronic inflammation in the gastric mucosa, although only a fraction of those infected develop disease, about 10% peptic ulcer and <3% gastric cancer [5]. The early acquisition of *H. pylori* during childhood and bacterial virulence factors, environmental factors, and host genetics are important factors influencing the final outcome of the infection.

In children, infection with *H. pylori* has been associated with delayed growth, anemia, and iron deficiency, and it has also been associated with recurrent abdominal pain (RAP), although this association is still contro-

versial [6,7]. Whereas in adults the infection is characterized by a strong infiltration of mononuclear and neutrophil cells, in children, the inflammatory response is predominantly lymphocytic with few neutrophil and mononuclear cells [8,9].

The presence of infecting microorganisms in the gastrointestinal tract is sensed by Toll-like receptors (TLRs). TLRs are a family of transmembrane glycoproteins consisting of 10 members in humans, which recognize conserved microbial components called pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) that are absent in host cells [10,11]. The interaction of PAMPs with TLRs leads to the activation of intracellular signaling pathways and the induction of genes involved in the host response, such as those encoding inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8), regulatory cytokines (IL-10), antigen-presenting molecules, and costimulatory molecules that initiate the activation of the adaptive immune response [12].

Gastric epithelial cells express TLR2, TLR4, TLR5, and TLR9, which interact with bacterial lipoproteins, lipopolysaccharide (LPS), flagellin, and CpG motifs, respectively [12]. The most studied in the context of *H. pylori* infection are TLR2, TLR4, and TLR5, although there is no consensus on the role they play in the recognition and in the immune response to the infection. Studies in HEK293 cells transfected with TLRs showed that *H. pylori* LPS activated the NF- κ B nuclear factor, with the production of IL-8, in cells transfected with TLR2 and TLR5 but not with TLR4 [13]. Another study reported that *H. pylori* activates the expression of TLR4 in epithelial cells [14]. Concerning the role of TLR5 in the recognition of *H. pylori* flagellin, reports are contradictory showing either a positive [15] or a negative recognition [16–18]. On the other hand, it has been shown that TLRs 4, 5, and 9 are expressed in gastric epithelial cells of adults infected with *H. pylori* [19]. It has been suggested that a low activation of TLRs by *H. pylori* in the gastric mucosa may contribute to its long-term persistence in the host [10].

Up to date, no study has examined the gastric expression of TLRs and cytokines in the gastric mucosa of children infected with *H. pylori*. Therefore, the aim of this work was to analyze the expression of TLR2, TLR4, TLR5, and TLR9 and correlate with the expression of IL-8, TNF- α , and IL-10 in the gastric mucosa of children with and without *H. pylori* infection.

Materials and Methods

Patients

We studied children attended at the Gastroenterology Unit of the Hospital de Pediatría, Centro Médico

Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), in Mexico City. The IMSS offers medical care to families of low to medium income, mostly mestizo population, which has been reported to still conserve Amerindian genetic markers [20]. We selected children that fulfilled Apley's criteria for recurrent abdominal pain (RAP) [21], with more than 6 months of evolution. All children underwent endoscopy as part of the standard diagnostic protocol, and none of them presented peptic ulcer or gastric atrophy. We selected 50 children for the study, 25 *H. pylori*-infected (mean age 11.08 ± 3.36 years, 10 boys, 15 girls) and 25 uninfected children (mean age 11.04 ± 3.44 years, 15 boys, 10 girls). The parents of the children were informed about the study, and if agreed, they were asked to sign a consent letter before inclusion of the patients. The study was approved by the Ethics Committee of the Hospital de Pediatría, IMSS.

Biopsies

Two gastric biopsies were obtained from the antrum and two from the corpus of each child. From each site, one biopsy was for culture of *H. pylori* and the other for histologic examination and to study the antrum expression of TLRs and cytokines by immunohistochemistry.

Helicobacter pylori Infection

Infection was diagnosed by urea breath test, culture, and histology, as previously described [22]. Infection was considered positive if at least two of the above test were positive. The absence of infection was defined when all three tests were negative.

Histologic Assessment of Inflammation

Paraffin sections of antrum and corpus biopsies were fixed in formalin and paraffin-embedded and stained with hematoxylin–eosin. A pathologist graded the inflammatory infiltrate according to the Sydney system [23].

Immunohistochemistry

Biopsies were fixed in 4% formaldehyde in 0.1 mol/L phosphates buffer (PBS) 0.1 mol/L, pH 7.2, and embedded in paraffin. Five microns sections were placed on slides and either stained with Mayer's hematoxylin and eosin (H&E) for histopathology examination or used for the immunohistochemical techniques. Briefly, antigen retrieval was performed by immersing the slides in 0.01% sodium citrate, pH 6.0, in boiling water for 25 minutes. Endogenous peroxidase activity was

inhibited by immersing the slides in 3% H₂O₂–methanol for 25 minutes, and nonspecific binding was reduced by incubating slides with 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 60 minutes. Next, the slides were incubated overnight with antibodies against TLR2, TLR4, TLR5, TLR9, and TNF- α , all at a 1:250 dilution, while IL-8 and IL-10 antibodies were at a 1:50 dilution (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). After washing, the slides were incubated with a biotinylated secondary antibody (Dako, Carpinteria, CA, USA) followed by an incubation with a streptavidin–HRP conjugate and revealed with 3,3'-diaminobenzidine tetra-hydrochloride (Dako). The reaction was arrested with distilled water, and the slides were counterstained with hematoxylin. To reduce variability, all samples were processed at the same time in a single experiment, using a single batch of each antibody.

Morphometric Analysis

Toll-like receptors and cytokines markers were read under light microscopy (Olympus BX40, Olympus Latin America, Miami, FL, USA), and expression was quantified using the Microsuite Biological Suite program (Olympus BX40, Olympus Latin America). For each marker, five 40 \times fields were measured per biopsy, and results were expressed as density of expression in 200 μm^2 of area. For each patient, result is the mean of the five fields per biopsy analyzed.

Statistical Analysis

To analyze the intensity of inflammation in the gastric mucosa, we calculated the mean of the inflammation score per patient, and the differences between children with and without *H. pylori* infection were determined by the proportions test. The nonparametric Mann–Whitney *U*-test was used to analyze differences in expression of TLRs and cytokines between children with and without *H. pylori* infection. The Spearman's rank correlation coefficient was used to evaluate correlation between severity of inflammation and expression of TLRs and cytokines. A *p* value <.05 was considered as statistically significant. Data were analyzed using the Prism[®] program (version 5.0; GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

Results

Histopathology Analysis

Table 1 describes the degree of infiltration of mononuclear cells (MN) and polymorphonuclear cells (PMN) in

Table 1 Evaluation of intensity of inflammatory response in the antrum and corpus of children, according to *H. pylori* infection

Intensity	Antrum, no. (%) n = 25			Corpus, no. (%) n = 25		
	Hp+	Hp–	Value <i>p</i> ^a	Hp+	Hp–	Value <i>p</i> ^a
Mononuclear cells						
None–mild	10 (40)	21 (84)	.013	9 (36)	21 (84)	.009
Moderate–severe	15 (60)	4 (16)	.118	16 (64)	4 (16)	.085
Neutrophils						
None–mild	16 (64)	23 (92)	.030	14 (56)	21 (88)	.029
Moderate–severe	9 (36)	2 (8)	.257	11 (44)	4 (16)	.319
Lymphoid follicles						
Present	15 (60)	5 (20)	.121	18 (72)	4 (16)	.037

^aTests of proportions.

the gastric mucosa of children with and without *H. pylori* infection. Most of the noninfected children (around 80%) showed a none-to-mild infiltration of MN cells (*p* < .05), whereas about 60% of the infected children exhibited a moderate-to-severe infiltration. Regarding PMN infiltration, almost all *H. pylori*-negative children (around 90%) presented none-to-mild infiltration, whereas in the infected children, as much as 64% had also a none-to-mild infiltration (*p* < .05). Intensity values for infiltration of MN and PMN cells were similar in both antrum and corpus.

Lymphoid follicles were observed in 60% and 72% of the infected children and in 20% and 16% of the noninfected children in antrum and corpus, respectively. Neither gastric atrophy nor intestine metaplasia was observed in any of the studied patients.

Quantitative and Qualitative Analysis of the Expression of TLRs 2, 4, 5, and 9 by Gastric Epithelial Cells

Figure 1 presents the expression of each of the studied TLRs as assessed by immunohistochemistry. The results showed that the expression of all TLR2, TLR4, TLR5, and TLR9 was significantly higher in the gastric mucosa of children infected with *H. pylori* as compared with the expression obtained in uninfected children. We also examined which cells were involved in the expression of TLRs in the gastric mucosa of infected children (Fig. 2) and found that TLR2 and TLR4 were expressed

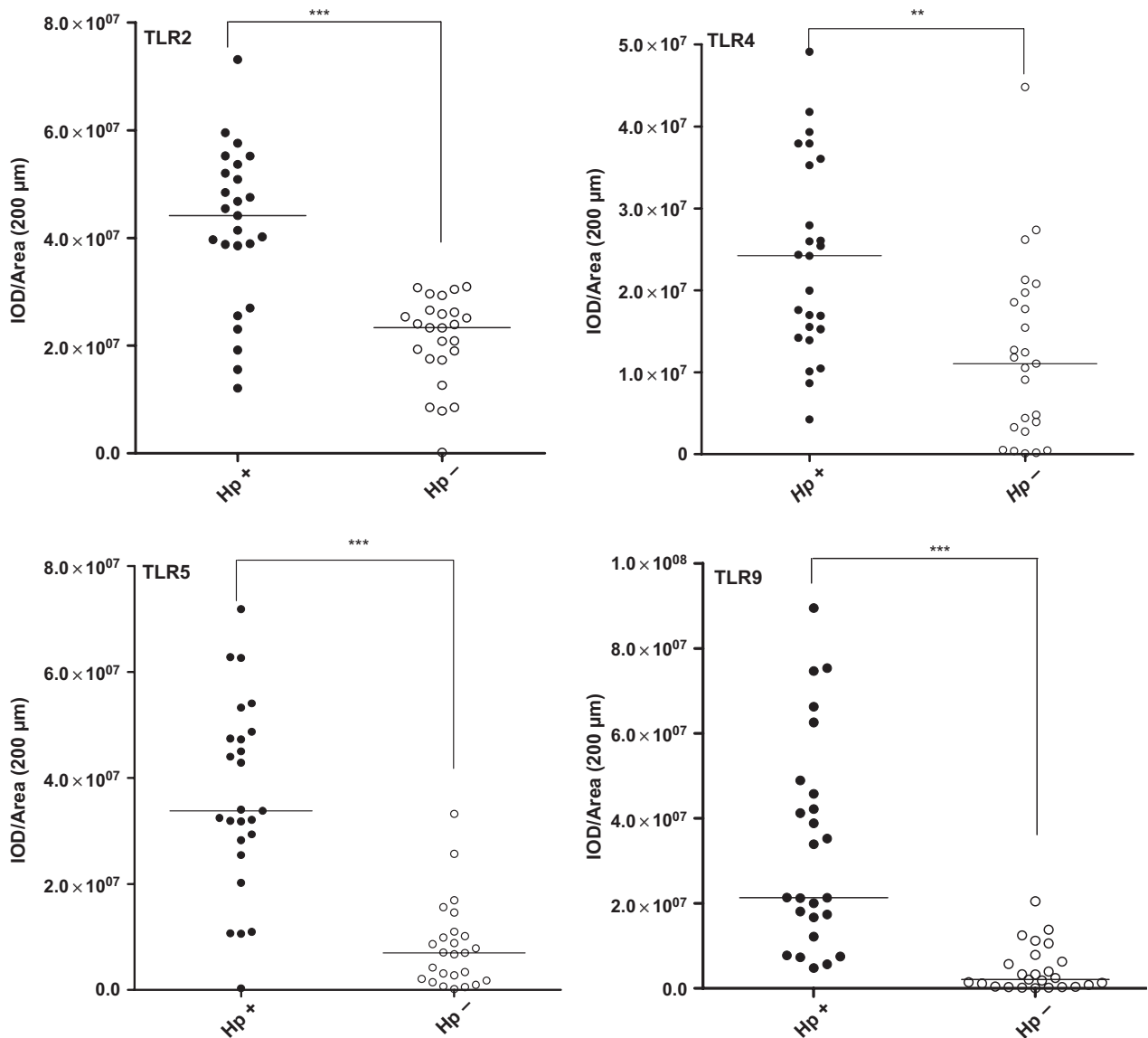


Figure 1 TLR2, TLR4, TLR5 and TLR9 expression in gastric epithelial cells from children with and without *Helicobacter pylori* infection, showing density of expression in 200 μ m² of tissue (* p < .05 Mann–Whitney). The bar represents the median. *** p = .0001; ** p = .001.

mainly by epithelial cells as shown in Fig. 2B,C,E,F, although there was expression in some mononuclear cells. On the other hand, TLR5 was expressed by epithelial cells in the villi and less by the epithelia in glandular region, whereas neutrophils in the lamina propria did not express TLR5 (Fig. 2H,I).

Expression of TLR9 was located mainly on epithelial cells in the villi and neck glands and only in some mononuclear cells, and no expression was observed by neutrophils (2K and 2L).

We examined whether levels of TLRs expression were associated with the degree of infiltration of MN

and PMN cells in the gastric mucosa of children with and without *H. pylori* infection. Of the four TLRs examined, no significant correlation was observed.

Quantitative and Qualitative Analysis of the Expression of IL-8, IL-10, and TNF- α by Gastric Epithelial Cells

Immunohistochemical analysis (Fig. 4) was used to detect and quantify the IL-8, IL-10, and TNF- α cytokines in biopsies of *H. pylori*-infected and noninfected children. The expression of IL-8 was significantly higher

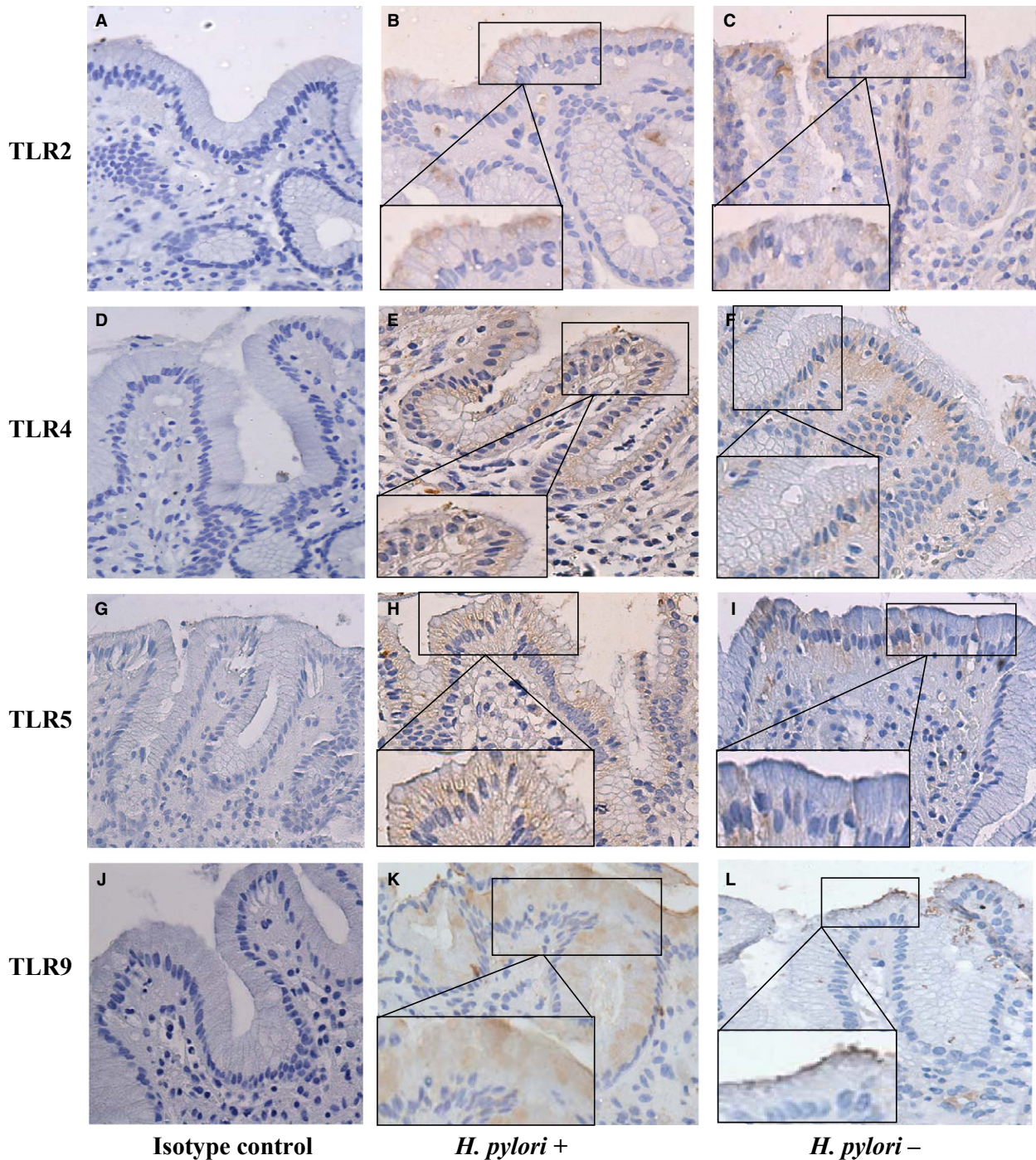


Figure 2 Immunohistochemistry of TLR2, TLR4, TLR5 y TLR9 in the gastric mucosa of children with or without *H. pylori* infection. Sections from paraffin-embedded tissue of *H. pylori* infected and uninfected children showing epithelial TLR2 staining on neck glands and some mononuclear cell in the lamina propria, respectively (2B and C). TLR4 staining on the glands (2E) and epithelial surface (2F), respectively. TLR5 staining on the mucosal superficial epithelium (2H and 2I). TLR9 staining on epithelial surface and neck glands, (2K and L) respectively. Isotype controls for TLR2, TLR4, TLR5 and TLR9 (2A, D, G, and J respectively). The sections were counterstained with hematoxylin. Gastric Original Magnification 40 \times .

in children infected by *H. pylori* ($p = .001$) (Fig. 3B), and expression was limited to epithelial cells in the villi and glands.

Expression of IL-10 was increased in biopsies of *H. pylori*-infected children compared with noninfected children ($p = .001$). The staining was more intense in

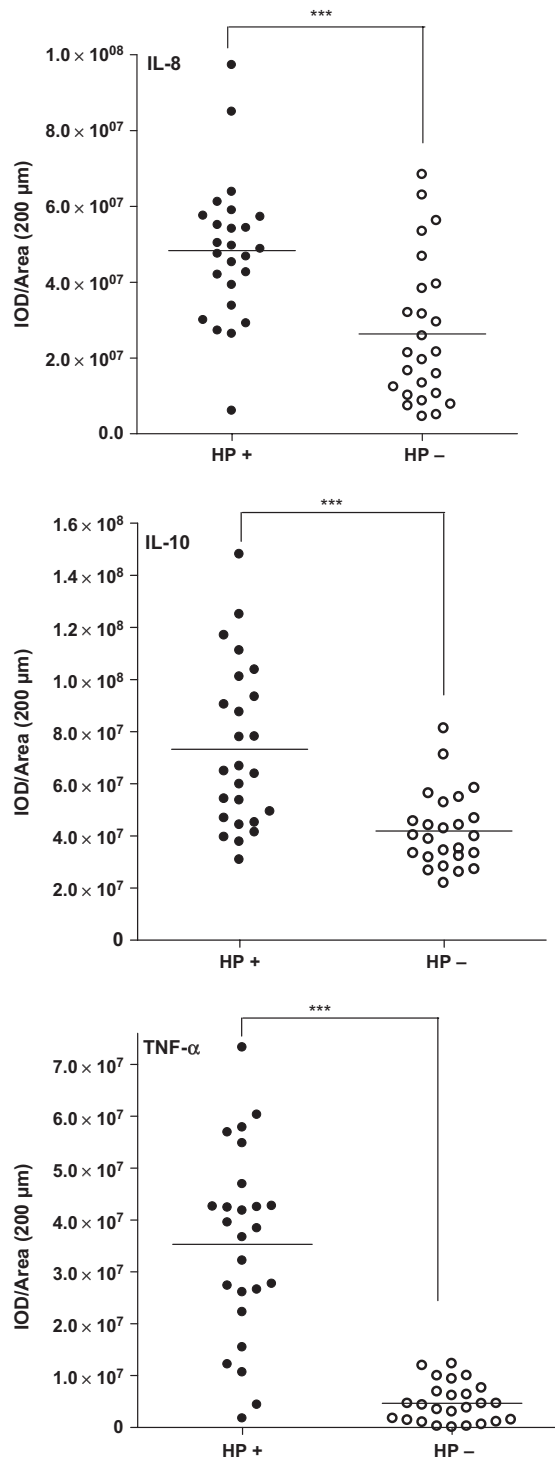


Figure 3 Expression of cytokines in gastric biopsies in *H. pylori* infected and uninfected children. IL-8 (A), IL-10 (B) y TNF- α (C). The bar represents the median (* $p < .05$ Mann-Whitney).*** $p = .0001$.

the surface of epithelial cells, with less intensity in the glands (Fig. 4E), whereas some mononuclear cells were stained in the lamina propria. The expression of TNF- α

was also significantly higher in the mucosa of infected children (Fig. 4H) than in uninfected patients (Fig. 4I) ($p = .001$), mostly in the apical surface of epithelial cells.

We tested for any possible correlation between expression of TLRs and cytokines, but none was found, except for IL-8 that showed a positive correlation between its level of expression and that of TLR2 ($p = .017$). We examined the relation between expression of cytokines and histologic findings. The mucosal level of IL-8 was significantly correlated with infiltration of MN and PMN in the antrum ($p = .026$ and $p = .013$, respectively).

Discussion

Previous studies on the role of TLRs in the immune response against *H. pylori* have been conducted in adult patients. In this study, we analyzed the expression of TLR2, TLR4, TLR5, and TLR9 and of cytokines in response to *H. pylori* infection in a group of children with or without infection.

We found that the presence of *H. pylori* in the gastric mucosa of children was associated with a higher infiltration of MN and PMN cells when compared to noninfected children. However, we also noted that the degree of MN and PMN infiltration was from absent to mild in almost half of the patients, which contrast with the observed inflammation in adults, but it is in agreement with previous studies by us [8] and others in children [24–26] that suggest a low reactivity of the gastric mucosa of children to the presence of *H. pylori*.

This reduced inflammation may be due to the modulation of the response by components of innate immunity, such as Toll-like receptors. TLRs are a main part of the immune response, sending signals to initiate the inflammatory response, and lead to the elimination of invading pathogens. Especially TLR2, TLR4, TLR5, and TLR9 play a critical role in the recognition of the bacterium by the innate immune system.

Few studies have addressed the expression of TLRs during infection with *H. pylori*, and most of them have been in vitro studies showing that epithelial cells recognize and respond to *H. pylori* infection via TLR2, TLR4, and TLR5 [13,27], producing some cytokines. In a recent study, we showed that human neutrophils infected with *H. pylori* increase the expression of TLR2 and TLR4, leading to the production of IL-8 and IL-10 [28]. To our knowledge, only one work has analyzed the expression and distribution of TLRs on gastric epithelium in adults infected with *H. pylori* [29] and demonstrated that TLR4 is strongly expressed in tumor cells of gastric cancer, whereas TLR9 showed increased

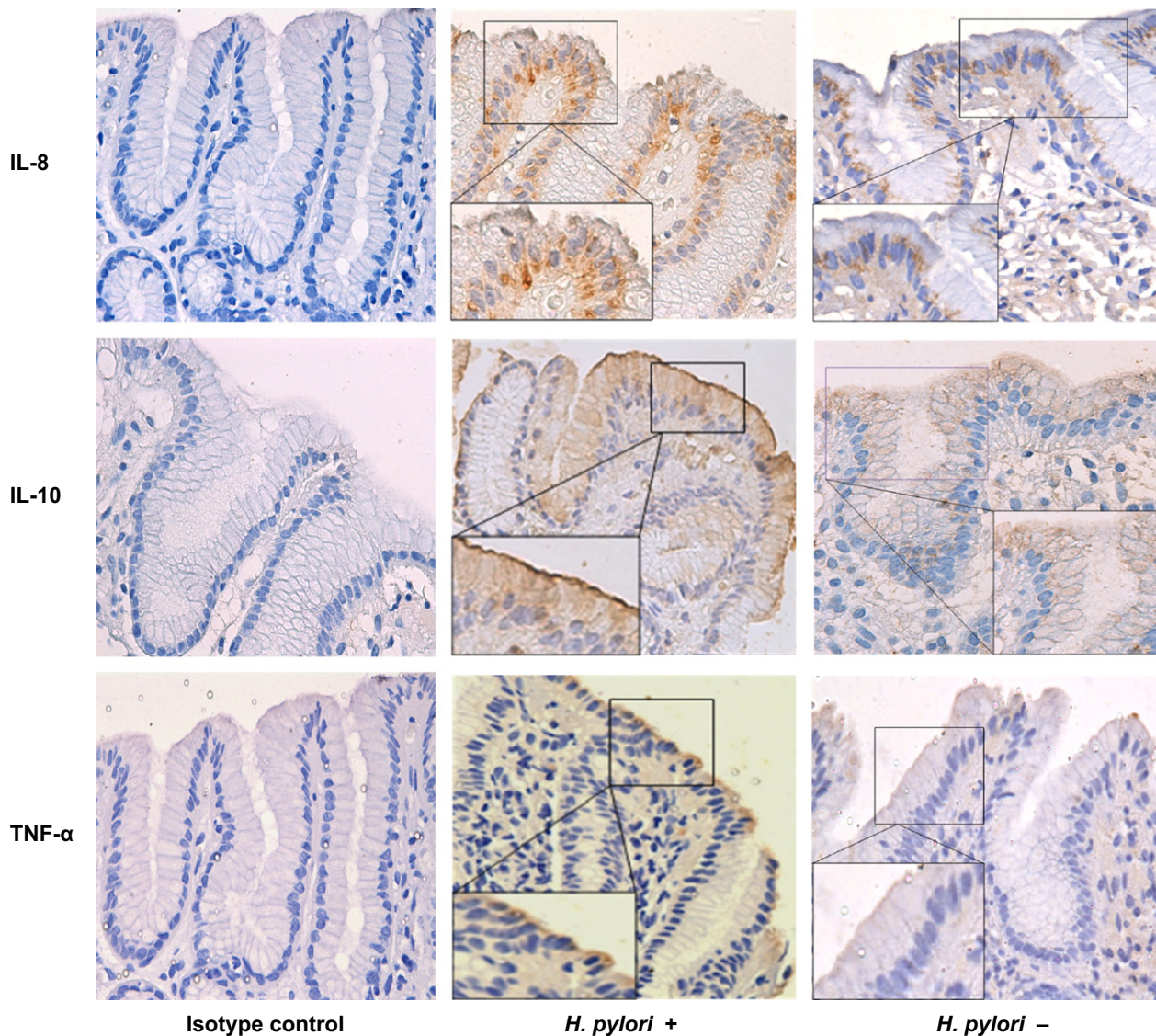


Figure 4 Immunohistochemical localisation of cytokines in the gastric mucosa of children infected and uninfected with *H. pylori* (immunoperoxidase staining). Sections of biopsy embedded in paraffin showing the expression of cytokines. Isotype controls for IL-8, IL-10 and TNF- α are shown in figures A, D, G respectively; (B) staining of IL-8 in *H. pylori* infected children, showing strong positivity in the epithelium and in mononuclear cells of lamina propria; (C) *H. pylori* negative children showing a weak expression of IL-8; (E and F) show the staining of IL-10, which is mainly observed in epithelium. *H. pylori* infected children (E) showed stronger epithelial stain that uninfected children (F). TNF- α showed higher expression in the surface epithelium of villi in infected children that in uninfected children (Figures H and I respectively).

expression on the basolateral membrane. Despite the fact that the infection starts in childhood, there are no studies addressing the expression of TLRs in children. Accordingly, we chose to study the expression of TLR2, TLR4, TLR5, and TLR9 in children infected and noninfected with *H. pylori*. We found that infection was associated with a marked increase in the expression of the four TLRs studied, which is similar to the findings in adults [29], including the expression of TLR9 in the basolateral membrane. These results confirm the ability

of *H. pylori* to increase the in vivo expression of TLRs by gastric epithelial cells, early during infection in children. It should be noted that other mechanisms such as inflammasomes might lead to activation of NF- κ B and release of pro-inflammatory cytokines in the gastric mucosa [30], and the participation of these alternative pathways in children during *H. pylori* infection needs to be addressed.

We observed that some of the noninfected children also showed expression of the four TLRs and infiltration

of MN or PMN cells, to a lower-level though. This inflammatory response in the absence of *H. pylori* infection may be due to the presence of some food antigens or even to endogenous antigens resulting from the inflammatory process, such as extracellular matrix proteins and heat shock proteins [31,32]; viral infections like Epstein-Barr virus (EBV) infection may also induce infiltration and activation of inflammatory cells in children, as we recently reported [33]. We next asked if the activation of TLRs was associated with increased levels of cytokines, it is known that activation of TLRs induces synthesis of IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α , and pro-IL-1 via NF- κ B [34,35]. There is an increased expression of IL-8, IL-10, and TNF- α in the infected gastric mucosa of children, suggesting activation of TLRs by *H. pylori* affecting cytokine expression. These results are in contrast with a previous study in children that found no significant differences in the expression of IL-8 and TNF- α between infected and noninfected children [34]. In both studies, immunohistochemistry was the method used, and both groups have children with similar age. The results may reflect differences in the pathogenicity of infecting *H. pylori* strains or ethnic differences between the groups studied [34]. Another important difference is the size of the studied groups, which was higher in our study (25 patients per group) than in the previous one (10 patients per group). In fact, the increased level of expression of IL-8 in infected children that we found confirms previous reports in children where we and others also found significant expression of IL-8 in the gastric mucosa of children infected with *H. pylori* [9,36]. Our results also agree with findings in adults, where levels of IL-8 and TNF- α in gastric tissue were significantly higher in patients with *H. pylori*-associated gastritis and duodenal ulcer [37,38], although the clinical course and mucosal histopathologic changes differ markedly between adults and children infected with *H. pylori* [1,36]. IL-8 is a powerful chemoattractant secreted by epithelial cells, which recruits PMN to the site of infection and may therefore influence development of gastric disease. In fact, we found a significant correlation between the gastric expression of IL-8 and the intensity of mucosal inflammation and PMN infiltration. On the other hand, of the two pro-inflammatory cytokines, IL-8 was the one that showed a positive correlation between the level of expression of cytokine and that of TLR2 ($p = .017$). This would suggest that the *H. pylori*-induced expression of TLR2 may in turn be inducing the expression of IL-8 and, hence, that TLR2 would also be associated with MN and PMN infiltration, which we did not observe. The significant correlation of one variable (IL-8) with a first (TLR2) variable and a third (Inflammation) variable does not

always preclude significant association between the first variable and third variable in terms of statistical analyses. Also, expression of TLR2 besides inducing IL-8 may also result in activation of other inflammatory mediators, which modulate IL-8 activity. As discussed above, we also found increased expression of IL-10 in infected children, which may modulate the pro-inflammatory activity of IL-8.

Increased levels of TNF- α , IL1 β , IL-6, IL-8, and IL-10 have been reported in gastric biopsies of *H. pylori*-infected patients [24,25]. Our study provides evidence that *H. pylori* induces the production of TNF- α in the gastric mucosa of children, in agreement with a previous report that showed increased levels of TNF- α in children infected with *H. pylori* [39]. IL-10 is an immunoregulatory cytokine, which is characterized by inhibiting the synthesis of pro-inflammatory cytokines such as IL-8 and TNF- α , reducing inflammation and cytotoxic effects of these cytokines [40,41]. Several studies have shown that IL-10 is expressed in the gastric mucosa of adult patients infected with *H. pylori* and is thought to reduce tissue damage caused by IL-8 and TNF- α , and it may also contribute to a reduced immune response that fails to eliminate the infection [42]. We found increased levels of IL-10 in the gastric mucosa of children infected with *H. pylori*, which suggest that in this age group, we already see the regulating anti-inflammatory activity of this interleukin. It is possible that an increased expression of IL-10 would help explain the reduced recruitment of PMN observed in these children even in the presence of a strong *H. pylori* infection. Children may be infected for years with *H. pylori* without presenting mucosal tissue damage, a fact that could be explained in part by the presence of strong anti-inflammatory cytokines such as IL-10 soon after *H. pylori* acquisition during childhood.

Few works have reported the in situ expression of these cytokines in the gastric mucosa of children, and most of these studies have focused on the determination of protein of these cytokines in gastric homogenates [39,42–44]. However, these methods do not allow the identification and location of the cytokines in situ, as we did in this study by immunohistochemistry. Our results clearly show the importance of the epithelial gastric cells in the recognition of *H. pylori* by TLRs and also in the response by expressing both pro- and anti-inflammatory cytokines and suggest that the gastric epithelium plays an important role not only by promoting inflammation after *H. pylori* infection, but also by regulating this response by expressing potent anti-inflammatory mediators.

In conclusion, in this study, we showed that the expression of TLR2, TLR4, TLR5, and TLR9 increases in

the gastric epithelium of children infected with *H. pylori* and that this expression was associated with an increase in the expression of IL-8, TNF- α , and IL-10. This indicates that early during infection, *H. pylori* induces the expression of TLRs and of pro- and anti-inflammatory cytokines by the gastric epithelial cells, starting a chronic and balanced inflammatory process that will continue for decades. Eventually, when this dialog bacteria-host, turns unbalanced may contribute to the development of *H. pylori*-associated diseases later in adulthood.

Acknowledgements and Disclosure

This work has received research funding from IMSS-2004/009 and IMSS-2005/1/110 (México). Javier Torres is a recipient of an exclusivity scholarship from Fundación IMSS, México. This work was carried out in fulfillment of the requirements to obtain the Doctor's Degree (Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM) by HE. Lagunes-Servin, who was supported by CONACYT (174761).

Competing interests: the authors have no competing interests.

References

- Torres J, Pérez-Pérez G, Goodman KJ, Atherton JC, Gold BD, Harris PR, la Garza AM, Guarner J, Muñoz O. A comprehensive review of the natural history of *Helicobacter pylori* infection in children. *Arch Med Res* 2000;31:431–69.
- Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, Schlemper RJ. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 2001;11:784–9.
- Cooke CL, Huff JL, Solnick JV. The role of the genome diversity and immune evasion in persistent infection with *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005;45:11–23.
- Suarez G, Reyes VE, Beswick EJ. Immune response to *H. pylori*. *W. J Gastroenterol* 2006;12:5593–8.
- Wen S, Moss SF. *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. *Cancer Lett* 2009;282:1–8.
- Yang JJ, Sheu BS, Lee SC, Yang HB, Wu JJ. Children of *Helicobacter pylori*-infected mothers are predisposed to *H. pylori* acquisition with subsequent iron deficiency and growth retardation. *Helicobacter* 2005;10:249–55.
- Mansour MM, Al Hadidi KHM, Omar MA. *Helicobacter pylori* and recurrent abdominal pain in children: is there any relation. *Trop Gastroenterol* 2012;33:55–61.
- Muñoz L, Camorlinga M, Hernández R, Giono S, Ramon G, Muñoz O, Torres J. Immune and proliferative cellular responses to *Helicobacter pylori* infection in the gastric mucosa of Mexican Children. *Helicobacter* 2007;12:224–30.
- Camorlinga-Ponce M, Avilez-Jimenez F, Cabrera L, Hernández-Pando R, Muñoz O, Sosa J, Torres J. Intensity of inflammation, density of colonization and interleukin-8 response in the gastric mucosa of children infected with *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2003;8:54–60.
- Peek R, Fiske C, Wilson TK. Role of innate immunity in *Helicobacter pylori* induced gastric malignancy. *Physiol Rev* 2010;90:831–58.
- Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005;17:1–14.
- Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 2011;30:16–34.
- Smith MF, Mitchell A, Li G, Ding S, Fitzmaurice AM, Ryan K, Crowe S, Goldberg JB. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NK-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells. *J Bio Chem* 2003;278:32552–60.
- Su S, Ceponis JM, Lebel S, Huynh H, Sherman PM. *Helicobacter pylori* activates Toll-like receptor 4 expression in gastrointestinal epithelial cells. *Infect Immun* 2003;71:3496–502.
- Torok AM, Bouton AH, Goldberg JB. *Helicobacter pylori* induces interleukin-8 by Toll-like receptor 2- and Toll-like receptor 5-dependent and independent pathways. *Infect Immun* 2005;73:1523–31.
- Lee SK, Stack A, Katzowitsch E, Aizawa SI, Suerbaum S, Josenhans C. *Helicobacter pylori* flagellins have very low intrinsic activity to stimulate human gastric epithelial cells via TLR5. *Microbes Infect* 2003;5:1345–56.
- Gewirtz AT, Yu Y, Krishna US, Israel DA, Lyons SL, Peek RM Jr. *Helicobacter pylori* flagellin evades toll-like receptor 5-mediated innate immunity. *J Infect Dis* 2004;189:1914–20.
- Anderssen-Nissen E, Smith KD, Strobe KL, Barret SL, Cookson BT, Logan SM, Aderem A. Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:9247–52.
- Schmauser B, Andrusis M, Endrich S, Lee SK, Josenhans C, Miller-Hermelink HK, Eck M. Expression and subcellular distribution of Toll-like receptor TLR4, TLR5 and TLR9 on the gastric epithelium in *Helicobacter pylori* infection. *Clin Exp Immunol* 2004;136:521–6.
- Juarez-Cedillo T, Zuniga J, Acuna-Alonzo V, Perez-Hernandez N, Rodriguez-Perez JM, Barquera R. Genetic admixture and diversity estimations in the Mexican Mestizo population from Mexico City using 15 STR polymorphic markers. *Forensic Sci Int Genet* 2008;2:37–9.
- Apley J, Naish N. Recurrent abdominal pain: a field survey of 1000 school children. *Arch Dis Child* 1957;33:165.
- Camorlinga-Ponce M, Torres J, Pérez-Pérez GI, Leal-Herrera Y, González-Ortiz B, Madrazo de la Garza A, Gómez A, Muñoz O. Validation of a serologic test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and the immune responses to urease and CagA in children. *Am J Gastroenterol* 1998;93:1264–70.
- Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The update Sydney System. International Workshop on the Histopathology of gastritis. *Am J Surg Pathol* 1996;20:1161–81.
- Andersen LP, Holck S, Janulaityte-Gunther D, et al. Gastric inflammatory markers and interleukins in patients with functional dyspepsia with and without *Helicobacter pylori* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005;44:233–38.
- Noach LA, Bosma NB, Jansen J, Hoek FJ, van Deventer SJ, Tytgat GN. Mucosal tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta and interleukin-8 production in patients with *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol* 1994;19:425–9.
- Ozawa K, Kato S, Sekine H, Koike T, Minoura T, Linuma K, Nagura H. Gastric epithelial cell turnover and mucosal protection in Japanese children with *Helicobacter pylori* infection. *J Gastroenterol* 2005;40:236–46.
- Kawahara T, Kumano Y, Teshima-Kondo S, Hawaii T, Nikawa T, Kishi K, Rokutan K. Toll-like receptor 4 regulates gastric pit

- cell responses to *Helicobacter pylori* infection. *J Med Invest* 2001;48:190–7.
- 28 Alvarez-Arellano M, Camorlinga-Ponce M, Maldonado Bernal A, Torres J. Activation of human neutrophils with *Helicobacter pylori* and the role of Toll-like receptors 2 and 4 in the response. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007;51:473–479.
- 29 Schmausser B, Andrusis M, Endrich S, Muller-Hermelink H, Eck M. Toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on gastric carcinoma cells: an implication for the interaction with *Helicobacter pylori*. *Int J Med Microbiol* 2005;295:179–85.
- 30 Hitzler I, Sayi A, Kohler E, Engler D, Koch K, Hardt W, Müller A. Caspase-1 Has Both Proinflammatory and regulatory properties in *Helicobacter pylori* infections, which are differentially mediated by its substrates IL-1 β and IL-18. *J Immunol* 2012;188:3594–602.
- 31 Schaefer L, Babelova A, Kiss E, et al. The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptor 4 and 2 in macrophages. *J Clin Invest* 2005;115:2223–33.
- 32 Tsan MF, Gao B. Heat shock proteins and immune system. *J Leukoc Biol* 2009;85:905–10.
- 33 Cárdenas-Mondragón MG, Carreón-Talavera R, Camorlinga-Ponce M, Gomez-Delgado A, Torres J, Fuentes-Pananá EM. Epstein Barr Virus and *Helicobacter pylori* co-Infection are positively associated with severe gastritis in pediatric patients. *PLoS ONE* 2013;24:e62850.
- 34 Lopes AI, Quiding-Jarbrink M, Palha A, Ruiivo J, Monteiro L, Oleastro M, Santos A, Fernandes A. Cytokine expression in pediatric *Helicobacter pylori* infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005;12:994–1002.
- 35 Ioannou S, Voulgarelis M. Toll-like receptors, tissue injury, and tumorigenesis. *Mediators Inflamm* 2010;2010:1–9.
- 36 Shimizu T, Haruna H, Ohtsuka Y, Kaneko K, Gupta R, Yamashiro Y. Cytokines in the gastric mucosa of children with *Helicobacter pylori* infection. *Acta Pediatr* 2004;93:322–6.
- 37 Crabtree JE. Role of cytokines in pathogenesis of *Helicobacter pylori* induced mucosal damage. *Dig Dis Sci* 1998;43:46S–55S.
- 38 Lindholm C, Quiding-Jarbrink M, Lonroth H, Hamlet A, Svennerholm AM. Local cytokine response in *Helicobacter pylori*-infected subjects. *Infect Immun* 1998;66:5964–71.
- 39 Guiraldes E, Duarte I, Peña A, Godoy A, Espinoza MN, Bravo R, Larrain F, Schultz M, Harris P. Proinflammatory cytokine expression in gastric tissue from children with *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001;33:127–32.
- 40 Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001;19:683–765.
- 41 Bodger K, Wyatt JI, Heatley RV. Gastric mucosal secretion of interleukin-10: relations to histopathology, *Helicobacter pylori* status, and tumour necrosis factor-alpha secretion. *Gut* 1997;40:739–44.
- 42 Bodger K, Bromelow K, Wyatt JL, Heatley RV. Interleukin-10 in *Helicobacter pylori* associated gastritis: immunohistochemical localisation and in vitro effects on cytokine secretion. *J Clin Pathol* 2001;54:285–92.
- 43 Maciorkowska E, Panasiuk A, Kaczmarek M. Concentrations of gastric mucosal cytokines in children with food allergy and *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol* 2005;43:6751–6.
- 44 Bontems P, Robert F, Van Gossum A, Cadranet S, Mascart F. *Helicobacter pylori* modulation of gastric and duodenal mucosal T cell cytokine secretions in children compared to adults. *Helicobacter* 2003;8:216–26.