



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGIA EXPERIMENTAL

PARTICIPACIÓN DE LA FAMILIA DE IL-10 EN PACIENTES CON COLITIS
ULCEROSA CRÓNICA IDIOPÁTICA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

GABRIELA COLUMBA FONSECA CAMARILLO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JESÚS KAZUO YAMAMOTO FURUSHO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DR. JULIO GRANADOS ARRIOLA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.
DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, UNAM.

MÉXICO, D.F. JUNIO, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGIA EXPERIMENTAL

PARTICIPACIÓN DE LA FAMILIA DE IL-10 EN PACIENTES CON COLITIS
ULCEROSA CRÓNICA IDIOPÁTICA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

GABRIELA COLUMBA FONSECA CAMARILLO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JESUS KAZUO YAMAMOTO FURUSHO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DR. JULIO GRANADOS ARRIOLA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.
DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, UNAM.

MÉXICO, D.F. JUNIO, 2014

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 24 de marzo de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **FONSECA CAMARILLO GABRIELA COLUMBA** con número de cuenta **510007135** con la tesis titulada **"PARTICIPACIÓN DE LA FAMILIA IL-10 EN PACIENTES CON COLITIS ULCEROSA CRÓNICA IDIOPÁTICA"**, realizada bajo la dirección del **DR. JESÚS KAZUO YAMAMOTO FURUSHO**:

Presidente: DRA. ANTONIA ISABEL CASTILLO RODAL
Vocal: DR. GILBERTO VARGAS ALARCÓN
Secretario: DR. JULIO GRANADOS ARRIOLA
Suplente: DRA. INGEBORG DOROTHEA BECKER FAUSER
Suplente: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 03 de junio de 2014

M. del Cor Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Agradezco ampliamente al **Posgrado en Ciencias Biológicas de UNAM**, por haberme permitido continuar con mi formación académica.

Agradezco al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo otorgado con la beca 229049 para la realización de este trabajo de tesis.

Agradezco ampliamente a mi distinguido tutor principal el **Dr. Jesús Kazuo Yamamoto** y a los miembros del Comité Tutor, integrado por el **Dr. Julio Granados** y al **Dr. Alejandro Zentella** por su valioso apoyo incondicional a lo largo del desarrollo de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi madre por apoyarme en todo momento, por los valores que me ha inculcado, por su incondicional amor y sabios consejos. Sobre todo por ser un excelente ejemplo de vida a seguir. A mi hermana Nayeli por ser parte de mi vida, por ser un ejemplo de constancia y por llenar mi vida de tantas alegrías.

Con especial agradecimiento al doctor Jesús Kazuo Yamamoto, director de esta investigación, por la orientación, el seguimiento y la supervisión continúa de la misma, por su invaluable participación durante mi formación académica, sus enseñanzas, pero sobre todo por la motivación y el apoyo recibido a lo largo de estos años.

Quiero agradecer de igual forma a los miembros del Comité tutorial al doctor Julio Granados, por su amistad, apoyo constante y su consejo siempre sabio, al doctor Alejandro Zentella por su apoyo incondicional y su disposición para apoyar la realización de este trabajo.

Agradezco ampliamente a la doctora Janette Furuzawa por haber sido una luz en mi camino, una guía inigualable y maestra en mi formación académica y personal.

Un agradecimiento muy especial merece a mis queridos amigos Pao, César, Hugo, Andrea, Jorge, Ilse, Lupita, y Emilio por formar parte del camino, por su comprensión, paciencia y ánimo, gracias por compartir esta felicidad.

Por último quiero agradecer a mi familia, que enmarca mi vida en todos sentidos, sin la cual nada de esto hubiera sido posible. Agradezco a mis tíos Karina y Jorge por ser una parte importante en mi vida, por motivarme a seguir adelante en los momentos de desesperación, por su incondicional apoyo, pero sobre todo por su amor incondicional. A mis tíos Paco y Vero por su enorme apoyo y cariño.

Gracias a todos....

Gabriela Fonseca

Dedico este trabajo a:

A mi mamá Raquel Camarillo Merino por ser la persona que me inspira todos los días a seguir adelante con su enorme amor, paciencia, orientación, apoyo y dulzura.

A mis queridos abuelitos: Teresa Merino y Francisco Camarillo, gracias nuevamente por su infinito amor y apoyo. Siempre los llevo en mi corazón.

A mi hermanita Nayeli Fonseca que ha sido parte fundamental en la realización de este trabajo, siendo el mejor ejemplo de constancia, esfuerzo y dedicación.

A mis tíos Jorge y Karina este trabajo es gracias a ustedes.

INDICE

I. RESUMEN	1
I. I ABSTRACT	3
II. INTRODUCCIÓN	4
2.1 GENRALIDADES DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL .	4
2.2 COLITIS ULCEROSA CRÓNICA IDIOPÁTICA	5
2.3 DEFINICION	5
2.4 MANIFESTACIONES CLINICAS DE LA CUCI	6
2.5 ANATOMÍA PATOLÓGICA (ASPECTOS MICROSCÓPICOS)	6
2.6 ASPECTOS MACROSCÓPICOS	7
2.7 EXTENSION DE LA INFLAMACIÓN COLONICA	8
2.8 MANIFESTACIONES EXTRA INTESTINALES	9
2.9 TRATAMIENTO	10
2.10 EPIDEMIOLOGIA Y ETIOLOGIA DE LA CUCI	11
2.11 EPIDEMIOLOGÍA	11
2.12 ETIOLOGIA	12
2.13 FACTORES AMBIENTALES	13
2.14 TABAQUISMO	13
2.15 DIETA	14

2.16 ANTICONCEPTIVOS ORALES (AO)	.	.	.	.	.	.	14
2.17 ANTI INFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (AINES)	.	.	.	.	.	.	15
2.18 APENDICETOMÍA	.	.	.	.	.	.	15
2.19 FACTORES MICROBIOLÓGICOS	.	.	.	.	.	.	16
2.20 AGENTES INFECCIOSOS ESPECÍFICOS	.	.	.	.	.	.	16
2.21 RESPUESTA INMUNOLÓGICA FRENTE A MICROORGANISMOS	.	.	.	.	.	.	16
2.22 ALTERACIÓN DE LA BARRERA EPITELIAL	.	.	.	.	.	.	17
2.23 CÉLULAS EPITELIALES	.	.	.	.	.	.	17
2.24 ENTEROCITOS	.	.	.	.	.	.	18
2.25 CÉLULAS CALICIFORMES INTESTINALES Y MUCINAS	.	.	.	.	.	.	19
2.26 FACTORES GENÉTICOS	.	.	.	.	.	.	21
2.27 INMUNOLOGIA DE LA COLITIS ULCEROSA CRÓNICA IDIOPÁTICA	.	.	.	.	.	.	22
2.28 MEDIADORES DE LA RESPUESTA INMUNITARIA INNATA EN LA CUCI	.	.	.	.	.	.	24
2.29 RECEPTORES DE LA INMUNIDAD INNATA	.	.	.	.	.	.	25
2.30 CITOCINAS	.	.	.	.	.	.	26
2.31 MOLÉCULAS DE ADHESIÓN	.	.	.	.	.	.	26
2.32 QUIMIOCINAS	.	.	.	.	.	.	27
2.33 RESPUESTA INMUNITARIA ADAPTATIVA EN LA EII	.	.	.	.	.	.	28
2.34 LINFOCITOS T	.	.	.	.	.	.	29

III. ANTECEDENTES	32
3.1 INTERLEUCINA 10 (IL-10) EN EL PROCESO INFLAMATORIO DE LA CUCI	32
3.2 FAMILIA DE IL-10	34
3.3 INTERLEUCINA IL-19	35
3.4 INTERLEUCINA IL-20	35
3.5 INTERLEUCINA IL-22	36
3.6 INTERLEUCINA IL-24	36
IV. JUSTIFICACIÓN.	38
V. OBJETIVO GENERAL	39
VI. OBJETIVOS PARTICULARES.	40
VII. HIPOTESIS	41
VIII. MATERIAL Y METODOS	42
1. PACIENTES	42
2. TEJIDO	43
3. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL	43
4. SÍNTESIS DE ADN DE CADENA COMPLEMENTARIA POR PCR- TRANSCRIPTASA REVERSA	44
5. ANÁLISIS DE LA CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE INTERÉS POR PCR EN TIEMPO REAL.	45

6. DETECCIÓN DE LAS INTERLEUCINAS Y RECEPTORES EN TEJIDO	
INTESTINAL	46
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	47
IX. RESULTADOS	48
1. EXPRESIÓN GÉNICA DE IL-10 Y LOS RECEPTORES	
(IL-10R ALFA E IL-10RBETA)	49
2. SÍNTESIS DE IL-10 EN COLON DE PACIENTES CON CUCI Y CONTROLES	50
3. EXPRESIÓN DE IL-19 EN MUCOSA COLÓNICA DE PACIENTES CON CUCI	51
4. SÍNTESIS DE IL-19 EN TEJIDO INTESTINAL DE PACIENTES CON	
CUCI Y CONTROLES	52
5. ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE IL-19 Y LAS CARACTERÍSTICAS	
CLÍNICAS	53
6. EXPRESIÓN GÉNICA DE IL-20 Y SUS RECEPTORES	54
7. SÍNTESIS DE IL-20 Y RECEPTORES (IL-20 RA -IL-20 RB) EN TEJIDO	
COLÓNICO DE PACIENTES CON CUCI Y CONTROLES	55
8. ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE IL-20 Y LAS CARACTERÍSTICAS	
CLÍNICAS	58
9. EXPRESIÓN DE IL-22 EN MUCOSA INTESTINAL	59
10 EXPRESIÓN GÉNICA Y PROTEICA DE IL-24 EN MUCOSA COLÓNICA	60

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

Figura 1. Histología de la CUCI.

Figura 2. Comparación macroscópica de la mucosa colónica normal y en los pacientes con Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática.

Figura 3. El nivel de compromiso intestinal en los diferentes grados de CUCI.

Figura 4. Manifestaciones extra-intestinales de la CUCI.

Figura 5. Componentes de la respuesta inmunológica asociada con el desarrollo de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal. Distintas moléculas (moléculas de adhesión, citocinas y quimiocinas, y sus receptores) y células que participan en la Inmunobiología de la EII son fundamentales para el desarrollo de esta enfermedad.

Figura 6: Familia de IL-10 y receptores.

Figura 7. Bandas de ARN 28S y 18S de pacientes con CUCI en un gel de agarosa al 1 %.

Figura 8. Niveles de RNA mensajero de IL-10, IL-10 RA e IL-10RB en mucosa colónica de pacientes con Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática (activo, remisión y controles).

Figura 9. Detección de IL-10 en tejido colónico de pacientes con Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática en actividad y controles sin inflamación.

Figura 10. Niveles de RNA mensajero de IL-19 en mucosa colónica de pacientes con Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática y controles.

Figura 11. Detección y porcentaje de células positivas de IL-19 en tejido colónico de pacientes con Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática en actividad y controles sin inflamación.

Figura 12. Niveles de RNA mensajero de IL-20, IL-20 RA e IL-20RB en mucosa colónica de pacientes con Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática (activo, remisión y controles).

Figura 13. Detección y porcentaje de células positivas de IL-20RA en tejido colónico de pacientes con Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática en actividad y controles sin inflamación.

Figura 14. Detección y porcentaje de células positivas de IL-20RB en tejido colónico de pacientes con Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática en actividad y controles sin inflamación.

Figura 15. Niveles de RNA mensajero de IL-22 en mucosa intestinal de pacientes con Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática (activo, remisión y controles).

Figura 16. Niveles de RNA mensajero de IL-24 en mucosa colónica de pacientes con Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática (activo, remisión y controles).

Figura 17. Detección de IL-24 en tejido intestinal de pacientes con Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática en actividad y controles sin inflamación.

I. RESUMEN

Nuevas citocinas de la familia de IL-10, que incluyen IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, están involucradas en la respuesta inmune y el proceso inflamatorio, se encargan de regular diversas funciones, las cuales incluyen la supresión inmunológica, amplificación de la respuesta anti-bacterial y antiviral, promueven la actividad antitumoral y favorecen la auto-tolerancia en las enfermedades autoinmunes. No existen estudios previos en la literatura que evalúen los niveles de expresión génica y proteica de IL-19, IL-20, IL-22 e IL-24 y sus receptores en pacientes con CUCI. El objetivo de esta investigación es determinar la expresión génica y proteica de IL-19, IL-20, IL-22 e IL-24 y sus receptores en mucosa de pacientes con CUCI. Se realizó un estudio transversal y comparativo que incluyó 40 pacientes con CUCI y 18 controles sin datos de inflamación intestinal a nivel histológico. A partir de tejido intestinal se realizó reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real para cuantificar la expresión de los genes de interés. La detección de la proteína en tejido se realizó mediante inmunohistoquímica. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS versión 17, empleando la prueba de Kruskal Wallis. Se determinó que la expresión génica y proteica de IL-19, IL-20, IL-22 e IL-24 se encontró aumentada en la mucosa colónica de pacientes con CUCI activo al compararse con CUCI en remisión y controles sin inflamación. La concentración de IL-10 fue menor en el grupo de CUCI activo en comparación con los otros grupos de estudio. En el caso de los receptores ¿cuáles?se observó incremento en la expresión génica en los pacientes con CUCI en remisión, lo que puede explicarse en el hecho de que existe un aumento en la afinidad de la IL-20 a sus receptores en específico por la subunidad IL-20Ra que induce atenuación de la inflamación. Lo que sugiere que estas citocinas parecen estar involucradas en la

fisiopatología del proceso inflamatorio de la CUCI y podrían ser consideradas como blancos terapéuticos.

PALABRAS CLAVE: Interleucinas, (IL)-20, IL-10, IL-19, IL-22, IL-10R1, IL10R2, IL-20R1, IL-20R2, CUCI, GEN, PROTEINA.

1.1 ABSTRACT

The IL-10 family is a recently group of cytokines. The expression in ulcerative colitis (UC) patients has not been yet described. The aim of this study was to evaluate IL-10 family gene and protein expression and their receptors in the mucosa from UC patients. Forty UC patients and 18 non-inflamed controls were studied. IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-10R1, IL-10R2, IL-20R1 and IL-20R2 gene expression was determined by real time RT-PCR in colonic biopsies. Protein expression was evaluated by immunohistochemistry. Patients in remission had significantly higher IL-10 gene expression in mucosa compared with active patients and controls. Conversely, IL-10R1/B gene expression was decreased in remission compared with active UC patients and controls. IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 gene expression were lower in colonic mucosa from UC patients in remission compared with controls and active patients. IL-20R1/B mRNA expression was higher in remission compared with active UC patients and controls. IHQ analysis showed an increased IL-10—, IL-19—,IL-20—,IL-24— and IL-20R2—producing cells in active UC patients. IL-10—, IL-20— and IL-20R2—expressing epithelial and inflammatory cells were increased in active UC patients, meanwhile IL-20R1 was up-regulated only on inflammatory infiltrates vs. controls. This is the first depiction of the presence of IL-20 and its receptors in UC. Much remains to be learned however, about the pathogenic mechanisms that lead to IBD. This cytokine/receptor imbalance may be implicated in the pathogenesis of UC

Key Words: Interleukin (IL)-20, IL-10, IL-19, IL-22, IL-10R1, IL10R2, IL-20R1, IL-20R2, Ulcerative Colitis, gene, protein.

II. INTRODUCCIÓN

2.1 GENRALIDADES DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL.

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es un conjunto de enfermedades caracterizadas por inflamación crónica recurrente del tracto gastrointestinal de etiología desconocida (1). Específicamente, la EII comprende a la colitis ulcerosa crónica idiopática (CUCI) y la enfermedad de Crohn (EC). Ambas entidades pueden diferenciarse por la localización del área afectada, las características de la inflamación y las complicaciones que puede presentar. Tanto la CUCI como la Enfermedad de Crohn están asociadas con el riesgo al desarrollo de cáncer de colon. (2,3)

La EII representa un problema de salud pública importante, ya que incide en las actividades laborales, educativas y sociales, de la población que la padece además de que afecta cada vez más los grupos entre los 20 y 40 años principalmente (3).

La incidencia de la EII varía de acuerdo con la ubicación geográfica, es mayor en el norte y oeste de Europa, así como en el norte de América. Las zonas geográficas de menor incidencia son África, América del Sur, este de Europa y Asia. En diversos estudios se ha encontrado que la incidencia es mayor en los países desarrollados e industrializados (3).

En general, la incidencia de la enfermedad de Crohn en el mundo es de 0.1 a 16 casos por cada 100 000 habitantes, mientras que la CUCI se encuentra entre 0.5 y 24.5 casos por cada 100 000 habitantes (3). La EII es más frecuente en la raza caucásica y especialmente entre los judíos. Se puede presentar a cualquier edad. La mayoría de los casos es en la segunda y tercera década de la vida (4,5).

2.2 COLITIS ULCEROSA CRÓNICA IDIOPÁTICA.

2.3 DEFINICION.

La colitis ulcerosa crónica idiopática (CUCI) es una enfermedad caracterizada por la inflamación y ulceración de mucosa del colon. Los síntomas típicos incluyen diarrea con moco y sangre, pujo, tenesmo rectal, dolor abdominal, pérdida de peso y fiebre en casos graves. Es una enfermedad crónica; sin embargo se puede mantener en remisión por largos períodos (6).

Esta enfermedad se reconoció por primera vez en 1859 como una entidad separada de la disentería bacilar por Samuel Wilks, y la llamo “colitis idiopática simple” además la diferenció de la ulceración causada por la intoxicación por mercurio, la inflamación diftérica y la disentería bacilar (6).

En 1909 Hawkins describió las características clínicas y la evolución natural de la enfermedad, reconoció que el curso podría ser intermitente o crónico y que los primeros episodios de gran intensidad se asocian con mortalidad elevada. (6).

2.4 MANIFESTACIONES CLINICAS DE LA CUCI

2.5 ANATOMÍA PATOLÓGICA (ASPECTOS MICROSCÓPICOS)

La inflamación del colon está limitada predominantemente a la mucosa, la lámina propia se torna edematosa y los capilares están dilatados y congestionados, a menudo con extravasación de eritrocitos. Existe infiltrado inflamatorio por neutrófilos, linfocitos, células plasmáticas, macrófagos eosinófilos y mastocitos (Figura 1). Con el aumento de la inflamación, las células epiteliales superficiales se tornan aplanadas y se ulceran. Las úlceras pueden ser profundas y se encuentra congestión vascular en la submucosa. La lesión histológica característica (microscópica) de la CUCI es el absceso críptico en el cual el epitelio de la cripta se desintegra y la luz se llena con células polimorfonucleares. Mientras más criptas se destruyen, se pierde la arquitectura de la mucosa normal y la cicatrización resultante acorta y reduce el lumen del colon (6).

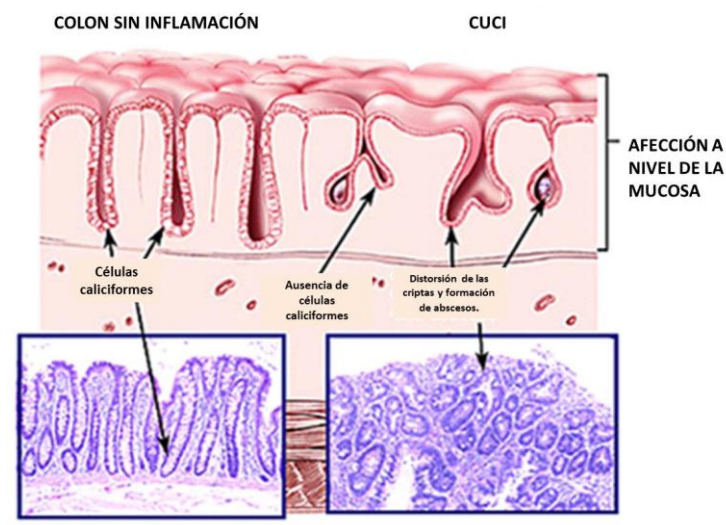


Figura 1. Histología de la CUCI.

2.6 ASPECTOS MACROSCÓPICOS:

Las características macroscópicas al inicio de la enfermedad se manifiestan por una mucosa hiperémica, edematosa y granular (Figura 2). A medida que esta enfermedad avanza la mucosa se vuelve intensamente hemorrágica y resultan visibles pequeñas úlceras puntuales, las cuales aumentan de tamaño y se extienden profundamente hacia la lámina propia, mostrando pólipos inflamatorios (pseudo pólipos), resultado de la regeneración constante del epitelio (6).

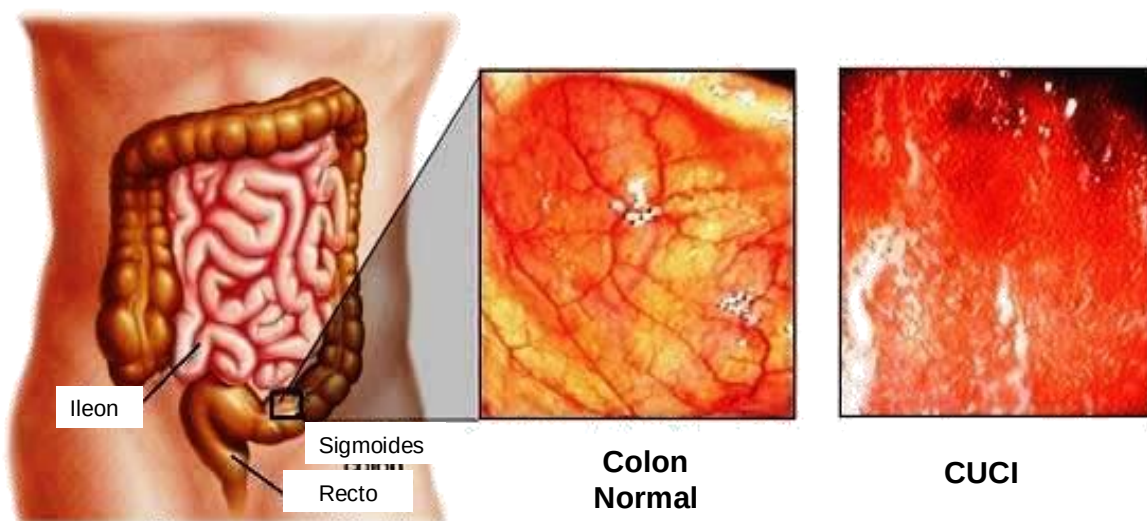


Figura 2. Comparación macroscópica de la mucosa colónica normal y en los pacientes con Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática.

2.7 EXTENSION DE LA INFLAMACIÓN COLONICA

La extensión se determina por colonoscopia larga y se clasifica como:

- Proctitis : Inflamación a nivel de recto.
- Colitis extensa : Cuando la mucosa afectada rebasa el ángulo esplénico.
- Pancolitis: Cuando se encuentra afectado todo el colon incluyendo el recto.
- Colitis distal o proctosigmoiditis: Cuando se encuentra afectado solamente el sigmoides y recto.
- Colitis izquierda: Afecta el colon descendente sin pasar el ángulo esplénico,

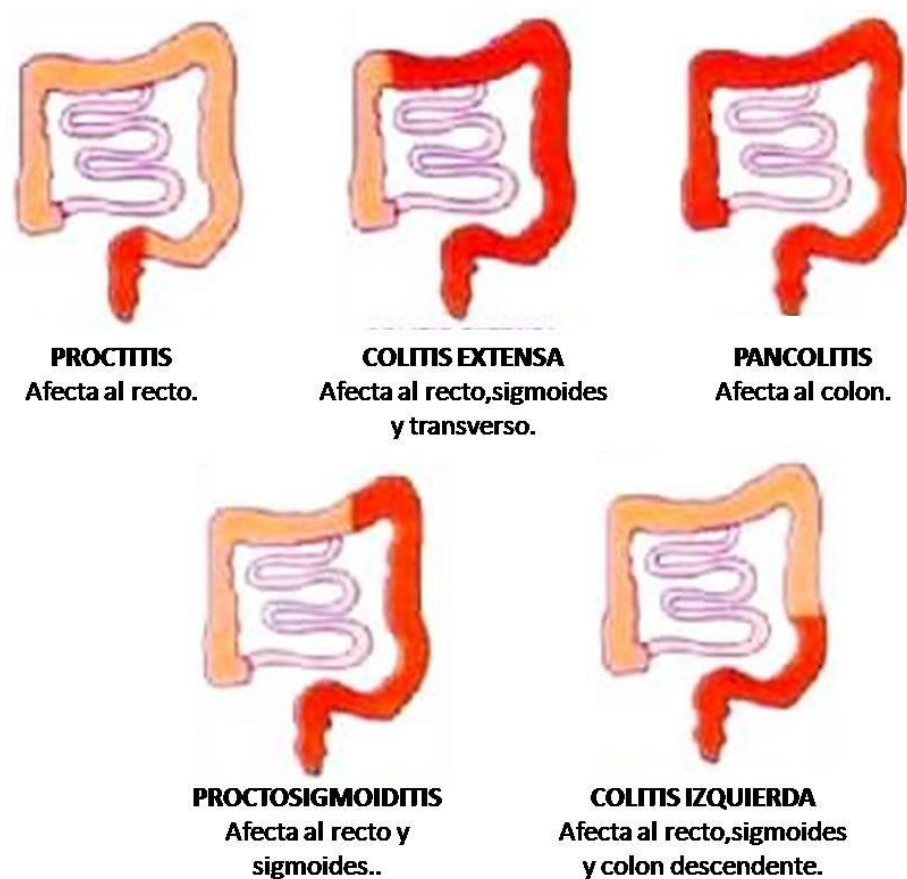


Figura 3. Diferentes tipos de extensión en pacientes con CUCI.

2.8 MANIFESTACIONES EXTRA INTESTINALES

Las manifestaciones extra-intestinales se presentan hasta en el 36% de los pacientes y se clasifican de acuerdo al órgano afectado. Las artralgias (dolor en articulaciones) pueden ocurrir en hasta 26% de pacientes con CUCI. La espondilitis puede ocurrir en un 3% de estos pacientes. El eritema nodoso y la pioderma gangrenoso están comúnmente asociados con esta enfermedad. Manifestaciones oculares de la CUCI ocurren en un 5% e incluyen uveítis anterior, episcleritis y queratoconjuntivitis(6).

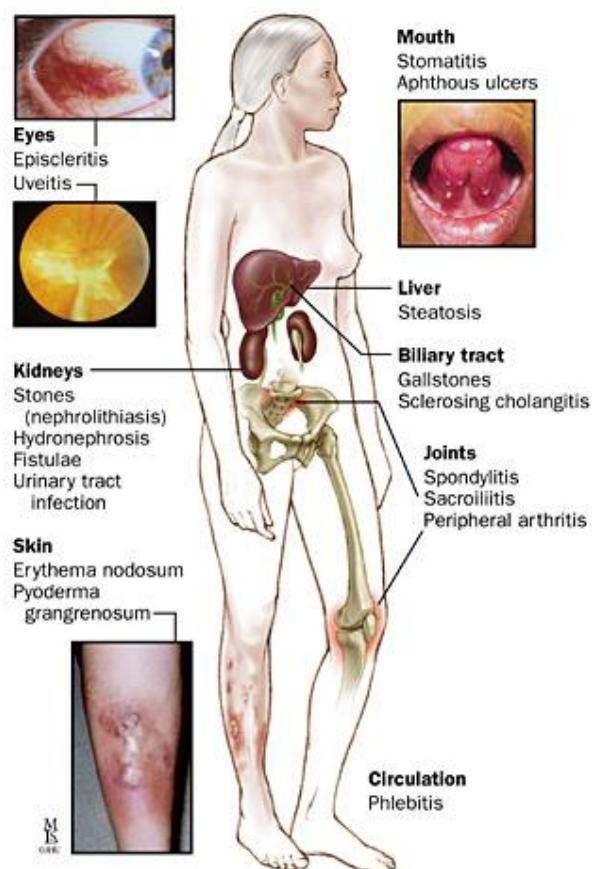


Figura 4. Manifestaciones extra-intestinales de la CUCI.

2.9 TRATAMIENTO

Actualmente no existe un tratamiento que cure la CUCI. En términos del control de la inflamación intestinal, el objetivo principal es inducir la remisión, es decir, controlar la inflamación y posteriormente mantener la enfermedad de manera inactiva. Se han desarrollado una gran cantidad de clases de medicamentos para el tratamiento de la CUCI. Los principales agentes farmacológicos usados son: los anti-inflamatorios tipo 5-aminosalicilatos, esteroides, los inmunomoduladores y la terapia biológica.

2.10 EPIDEMIOLOGIA Y ETIOLOGIA DE LA CUCI.

2.11 EPIDEMIOLOGÍA

La CUCI se presenta en todo el mundo y las áreas de mayor incidencia incluyen Estados Unidos de Norteamérica, Canadá, Norte y oeste de Europa y Australia. En individuos caucásicos la incidencia varía de 3 a 15/100,000 por año, con una prevalencia de 50 a 80 por cada 100, 000 individuos. Las áreas de baja incidencia incluyen Japón y América del Sur, donde la tasa de incidencia es 10 veces más baja que la observada en países europeos (9).

En México, diversos estudios han confirmado que la incidencia y la prevalencia de la EII van en aumento en los últimos años. La incidencia de CUCI en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) en la última década (2000), obtuvo un registro de 76 pacientes diagnosticados por año comparada con la década anterior (1990) que registro un promedio de 28 pacientes por año (10).

2.12 ETIOLOGIA

La fisiopatología de la CUCI es compleja y su etiología, hasta el momento, se desconoce. Sin embargo, existen estudios que demuestran una predisposición genética. En las últimas décadas se ha encontrado un aumento en la incidencia de la CUCI en todo el mundo, esto podría atribuirse a la occidentalización de los estilos de vida, cambios en la dieta y los cambios ambientales debidos a la industrialización y urbanización de las poblaciones. Esta tendencia también se observa en nuestro país (11, 12, 13).

Diversas teorías han intentado explicar los mecanismos fisiopatológicos por los cuales un intestino genéticamente susceptible, interactúa con factores ambientales como bacterias de la flora intestinal, dieta, fármacos (uso de AINES), circunstancias sociales, apendicetomía, tabaquismo etc, que podrían alterar la función de la barrera epitelial intestinal ocasionando una respuesta pro inflamatoria crónica (11, 12,13). A continuación se describen algunos de los factores ambientales, genéticos e inmunológicos relacionados con el desarrollo de CUCI:

2.13 FACTORES AMBIENTALES.

Existen estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales que apoyan la asociación entre la CUCI y factores de riesgo, como son el tabaquismo, los hábitos dietéticos, el consumo de medicamentos, uso de anti conceptivos, el estatus económico y geográfico, el estrés, los agentes microbianos, la permeabilidad intestinal y la apendicetomía, Sin embargo no se conocen los mecanismos fisiopatogénicos de cada uno de ellos (14,15).

2.14 TABAQUISMO

Con los conocimientos actuales es difícil explicar el papel que desempeña el tabaco en la fisiopatología de la CUCI. Solo se sabe que el tabaquismo tiene efectos opuestos en las dos formas de EII, por lo que se infieren diferentes mecanismos para cada uno de ellas.

En la enfermedad de Crohn el tabaquismo es un factor de riesgo que participa en el incremento de su frecuencia, en la recaída y en la necesidad de intervención quirúrgica, mientras que la suspensión de este hábito mejora el curso de la enfermedad. (16)

En contraste, la mayoría de los pacientes con CUCI no son fumadores y dejar de fumar incrementa el riesgo de desarrollarla, por lo que actúa como factor protector. (17).

Los mecanismos detrás del efecto diferencial en la CUCI o la EC no son claros, pero el tabaquismo tiene un efecto sobre la inmunidad sistémica y la mucosa intestinal, alterando las funciones de la inmunidad innata y adquirida (18). Los estudios con respecto a la exposición al tabaco y el papel que desempeña en la fisiopatología de la CUCI no son concluyentes.

En modelos animales de CUCI se observó que la nicotina disminuye la producción de moléculas inflamatorias como la IL-8 (19). Se podría explicar estos datos no con un efecto

etiológico del tabaco, sino como un efecto modulador de la respuesta inflamatoria de los pacientes con CUCI. Existen datos diversos: hay estudios que detectan un mayor riesgo en los pacientes fumadores mientras que en otros no confirman este hallazgo (20).

2.15 DIETA

Se ha propuesto una relación entre la dieta y la fisiopatología de la enfermedad mediante mecanismos inmunitarios desencadenados por los antígenos de los alimentos. No hay estudios que comprueben un efecto causal y solo hay pruebas indirectas de algunos factores dietéticos específicos, como el consumo de azúcar refinada, chocolate y bebidas de cola que pueden facilitar el desarrollo de CUCI y el EC (21). Otros estudios reportan que la ingesta elevada de grasa total, ácidos grasos omega 6 y la carne, se asocian a mayor riesgo de desarrollar CUCI. Mientras que el alto consumo de vegetales y frutas, disminuyen el riesgo de éstas enfermedades. (21,22). Sin embargo, son necesarios más estudios para confirmar el papel de los factores de la dieta sobre el desarrollo de la CUCI.

2.16 ANTICONCEPTIVOS ORALES (AO)

El uso de AO como factor relacionado con la susceptibilidad a padecer EC es más controvertido. Un meta-análisis que incluye nueve estudios, dos de ellos de cohortes y siete estudios casos-control, muestran un riesgo relativo conjunto asociado al consumo de AO de 1,4 (IC 95%: 1.12-1.86) para la EC, lo que sugiere una asociación discreta entre el uso de AO y el riesgo de desarrollar EC (23). El mecanismo de cómo los AO aumentan el riesgo de EII no está aclarado, aunque parece relacionarse con un mayor riesgo de fenómenos trombo-embólicos produciendo un cuadro de isquemia vascular.

2.17 ANTI INFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (AINES)

Diferentes publicaciones han sugerido que el consumo de AINES tiene un papel inductor en la CUCI (24), así como, su asociación con la recidiva con un aumento de las complicaciones de la CUCI (25,26).

2.18 APENDICETOMÍA

En los últimos años se ha encontrado una relación protectora entre la apendicetomía y la CUCI, tanto en la evolución de la enfermedad como en el retraso de su presentación clínica y la necesidad de colectomía. El apéndice, antiguamente considerado como un vestigio, es un órgano linfoide inmunológicamente activo y con alta densidad de vasos linfáticos. La mayoría de los linfocitos del apéndice son células B, con una pequeña población de células T de predominio CD4+. Algunos autores han propuesto que, una vez desarrollada la CUCI, la ausencia de una fuente de activación de linfocitos B podría ser una de las causas de un curso menos agresivo de la enfermedad. El epitelio apendicular de los pacientes con CUCI muestra una intensa regulación de HLA clase II además de un incremento en la activación de macrófagos. El apéndice contiene los elementos necesarios para procesar antígenos, para su presentación y la generación de una respuesta inmune adquirida en forma de epitelio especializado, células dendríticas, linfocitos T y B. Su localización anatómica también juega un papel relevante en las enfermedades inflamatorias intestinales lo que se relaciona con las especies de bacterias que colonizan el apéndice neonatal y su estabilidad en el ambiente del ciego y su proximidad con el íleon distal. Se ha observado que la apendicetomía tiene un efecto benéfico en el curso de la CUCI. Pacientes que son sometidos a apendicetomía tienen menor actividad de la enfermedad y menor riesgo de colectomía. (27)

2.19 FACTORES MICROBIOLÓGICOS

2.20 AGENTES INFECCIOSOS ESPECÍFICOS

En pacientes con CUCI se ha documentado la presencia de cepas de *Escherichia coli* que expresan moléculas de adhesión que les confiere mayor patogenicidad debido al aumento de su capacidad de adherencia y en consecuencia mayor daño a la mucosa colónica. A diferencia de otros agentes microbianos involucrados en la patogenia de la enfermedad de Crohn tales como *Mycobacterium paratuberculosis*, *paramyxovirus* y *Listeria monocytogenes* no participan en la fisiopatología de la CUCI (28, 29,30).

2.21 RESPUESTA INMUNOLÓGICA FRENTE A MICROORGANISMOS

El intestino alberga una gran cantidad de microorganismos (10^{14}), razón por la cual se puede considerar que el intestino es el órgano más grande del sistema inmunitario. Con el objetivo de evitar la translocación de bacterias patogénicas y no patogénicas, el epitelio intestinal establece un estado de inflamación controlada. Requiere lo que se denomina “barrera intestinal” y una importante regulación inmunitaria frente a la gran diversidad de bacterias, virus y hongos (el microbioma intestinal) de la mucosa intestinal (31, 32).

En condiciones normales el intestino es capaz de mantener la inflamación controlada mediante diferentes mecanismos moleculares y celulares, que permiten que la barrera intestinal funcione de manera adecuada y se establece un mecanismo biológico denominado tolerancia inmunológica.

En la CUCI la respuesta inmunitaria es mucho más compleja de lo que se creía hace algunos años. La pérdida de la función normal de la barrera intestinal y la falta de tolerancia inmunitaria frente al microbioma son componentes fundamentales en la

patogénesis de la misma (33,34). De la barrera intestinal aún es poco lo que se sabe, mientras que a nivel inmunitario se han reportado evidencias de que el factor desencadenante puede ser una respuesta inflamatoria frente a la microbiota intestinal.

2.22 ALTERACIÓN DE LA BARRERA EPITELIAL.

2.23 CÉLULAS EPITELIALES.

El epitelio que recubre el tracto intestinal está compuesto por una monocapa de células polarizadas y dispuestas en microvellosidades, y entre cada microvellosidad están las criptas, las cuales presentan una alta tasa de recambio celular (35). Las células del epitelio intestinal se originan a partir de las células madre (pluripotenciales) situadas en la base de las criptas, que durante la diferenciación celular se movilizan hacia la parte superior de estas. Los principales linajes epiteliales del intestino son:

- 1) Los enterocitos: responsables del transporte de micronutrientes y macronutrientes en el intestino delgado y transporte de iones en el colon (formación de heces).
- 2) Las células caliciformes intestinales: responsables de la producción de moco y péptidos treofílicos necesarios para el crecimiento y reparación del epitelio intestinal.
- 3) Las células de Paneth: secretan péptidos antimicrobianos como las defensinas, enzimas digestivas y factores de crecimiento .

La mucosa gastrointestinal forma una barrera entre el organismo y un ambiente luminal, el cual está cargado de microorganismos.

Un aspecto fundamental para el establecimiento de la barrera intestinal consiste en que las células del epitelio intestinal se encuentran unidas fuertemente entre sí. Esta unión física entre las diferentes células epiteliales es permeable a nutrientes e impermeable a los

microorganismos, siendo indispensable la integridad de la barrera física y el epitelio intestinal. El conjunto de las uniones celulares que ocurre entre las células epiteliales se conoce como complejo de unión apical (AJC). Dicho complejo está compuesto por las denominadas uniones estrechas y uniones adherentes, importantes en la regulación de la adherencia y la circulación paracelular de los fluidos. Esta unión impermeable para los microorganismos que ocurre entre las células epiteliales del intestino une las membranas de las células entre sí mediante la interacción de diferentes proteínas ancladas al citoesqueleto de las células epiteliales, como claudinas y ocludinas (33,34). La modulación de la expresión de las proteínas estructurales de las uniones intracelulares por efecto de citocinas, como la IL-13, IL-1 β y TNF- α , ha sido considerada como uno de los factores responsables de la ruptura de la barrera intestinal en el desarrollo de la CUCI (15).

2.24 ENTEROCITOS

Los enterocitos del epitelio intestinal son parte de la monocapa celular que recubre el intestino delgado y el colon, y su principal función es la de absorber nutrientes e iones (Cl^+ , Na^+ , Ca^{+2}). Están compuestos por estructuras llamadas enterocilios, formados por un haz central de filamentos de actina (25 a 30 filamentos en el eje y por microvellosidades, que son unas expansiones cilíndricas de la membrana del polo luminal que aumentan la superficie de contacto de las células intestinales. La vilina, un polipéptido que mantiene unido el haz de actina y la parte terminal de anclaje (miosina, tropomiosina y otros polipéptidos). En la respuesta inmunitaria los enterocitos expresan receptores de la inmunidad innata en la región basolateral y el estímulo de los mismos por translocación de bacterias es capaz de inducir la producción de citocinas y quimiocinas. El transporte de iones Na^+ en la CUCI se encuentra alterado, lo cual se relaciona directamente con la diarrea

y se correlaciona con el grado de actividad que se presente. Por otro lado, la constante agresión al tejido por la respuesta inflamatoria descontrolada induce un importante daño en el epitelio.

2.25 CÉLULAS CALICIFORMES INTESTINALES Y MUCINAS

Las células caliciformes (globet) del epitelio intestinal y son responsables de la protección del epitelio intestinal mediante la formación de una capa protectora de moco. El moco tiene un grosor de varios cientos de micrones y está compuesto por glucoproteínas pequeñas, llamadas mucinas, que inhiben la motilidad de las bacterias flageladas y la adherencia y penetración de otras bacterias. Además, el moco actúa como matriz para el establecimiento de factores proteicos importante para la defensa del intestino, como las inmunoglobulinas, y de otros factores de crecimiento (36).

En la CUCI se han reportado defectos en la producción de moco, en especial el grosor y la calidad de las estructuras de las proteínas que lo compone, que disminuyen cuando las enfermedades se encuentran activas; se ha reportado que la recuperación del moco se correlaciona con la recuperación de la fisiología del intestino y la remisión de la enfermedad. La baja producción de moco, particularmente en el desarrollo de la CUCI, se debe a la disminución del número de células calciformes.

La capa de moco actúa como una barrera física lubricante y de protección. El principal componente del moco es agua, mientras que su componente orgánico más importante es la mucina. Esta última es responsable de la característica viscosidad del moco. Las mucinas (MUC) son glicoproteínas constituidas de esqueletos polipeptídicos cuya parte central está altamente glicosilada con O-glicanos principalmente, en grupos de secuencias repetitivas,

mientras que los extremos amino y carboxilo presentan una menor glicosilación. Se han identificado más de 20 tipos de mucinas. Los tipos de mucinas que se encuentran mayormente en el intestino delgado y grueso son MUC2 y MUC3 producidas por las células caliciformes. La MUC2 es secretada en los gránulos apicales de las células caliciformes. La síntesis, secreción y sulfatación de las proteínas MUC2 y MUC3 se encuentran disminuidas en pacientes con CUCI activo comparado con los niveles encontrados en la mucosa de íleon de pacientes con enfermedad de Crohn (36).

La mucina 9 (MUC9) también conocida como glicoproteína oviductal 1 (OVGP1) se encontró disminuida significativamente en el grupo de los pacientes con CUCI, lo cual sugiere que la disminución en los niveles de RNA mensajero de este gen pudiera relacionarse con la alteración de la permeabilidad en los pacientes con CUCI (37).

2.26 FACTORES GENÉTICOS

La interacción entre la influencia genética y el ambiente se encuentra directamente relacionada con el desarrollo de CUCI. Los cromosomas a los que se les han descrito regiones susceptibles para el desarrollo de CUCI incluyen: 1, 3, 4, 5,10, 12, 14, 16,19 (38).

Los estudios de asociación del genoma (GWAS) han demostrado que existen diversos alelos del HLA- DR que participan en la susceptibilidad genética a la CUCI tales como HLA-DRB1*0103, DRB1*1502 y DRB1*12, los dos primeros encontrados también a nivel de la población mexicana (39). Los HLA de tipo DR1 y DR3 también se han relacionado en forma indirecta con ciertos fenotipos; el DRB1 se relaciona con fístulas en pacientes con EII. El gen del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) dentro de la clase III del MHC codifica para una citocina pro-inflamatoria cuyas concentraciones se encuentran incrementadas a nivel de la mucosa colónica en pacientes con CUCI (39-40).

Los avances en el área de investigación han llevado al descubrimiento de genes asociados a la susceptibilidad de desarrollar CUCI, y se han clasificado en la siguiente manera:

1. Inmunidad Innata.
2. Moléculas presentadoras de antígeno.
3. Transportadoras de medicamentos.
4. Integridad epitelial y adhesión celular.

2.27 INMUNOLOGIA DE LA COLITIS ULCEROSA CRÓNICA IDIOPÁTICA.

El intestino constituye la mayor superficie de contacto del organismo con el medio ambiente externo. Los mismos componentes celulares del intestino, responsables de la absorción de nutrientes, interactúan con más de 400 especies distintas de bacterias comensales y hacen frente a los microorganismos potencialmente patógenos (41). La defensa contra el microorganismo requiere, la regulación adecuada de esta barrera química y física, cuyo principal objetivo es evitar la traslocación de bacterias del lumen intestinal hacia la lámina propia.

En la defensa y la tolerancia del organismo frente a los microorganismos de la microbiota intestinal participan además de las células tradicionalmente consideradas de tipo inmunitario. La red establecida entre los diferentes tipos de células epiteliales, células inmunitarias y citocinas se muestran en la (Figura 5) . El establecimiento de una adecuada barrera intestinal depende de la interacción y la unión entre células, la producción de moco y la síntesis de moléculas de defensa inespecífica como las defensinas.

El entendimiento del componente inmunológico involucrado en la fisiopatología de la CUCI se empieza a conocer y podría reportar grandes beneficios en cuanto al diagnóstico de pacientes con esta patología. A la luz de los antecedentes antes expuestos, la identificación de moléculas involucradas en la respuesta inmune podría utilizarse como una herramienta de diagnóstico diferencial en la CUCI.

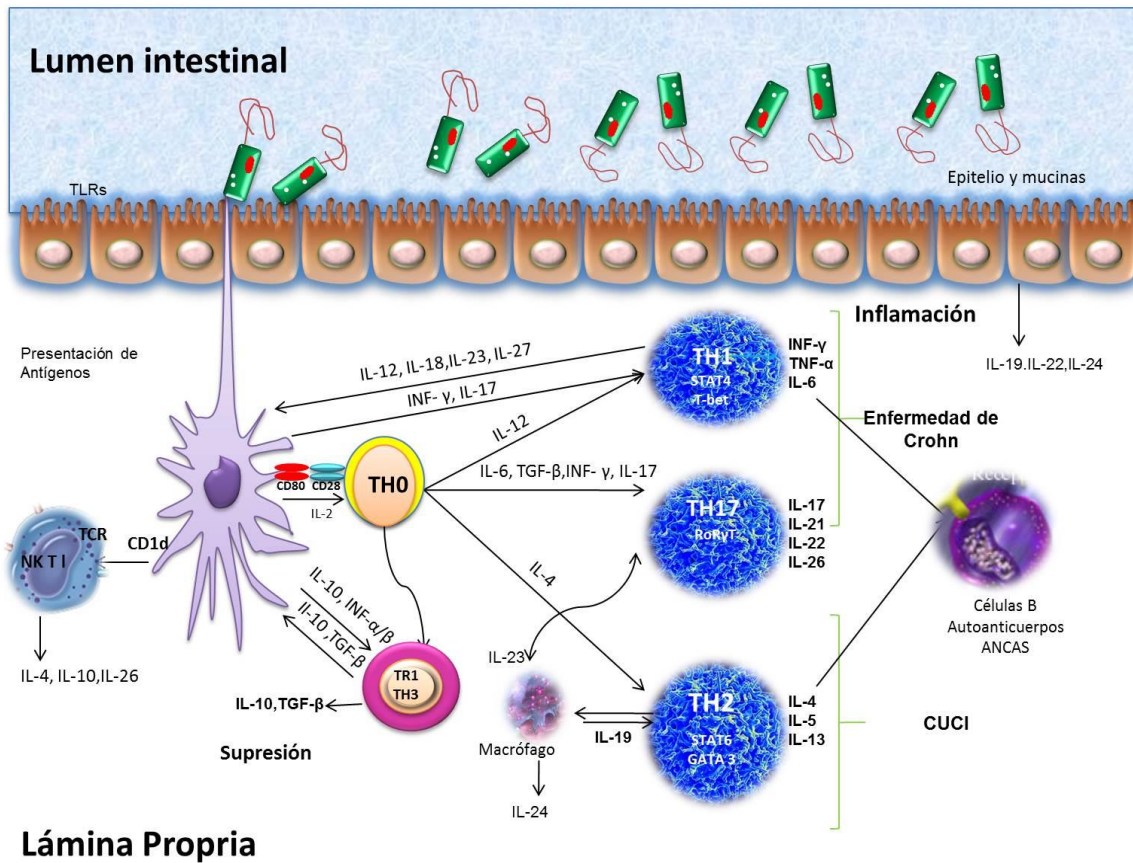


Figura 5. Componentes de la respuesta inmunológica asociada con el desarrollo de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal. Distintas moléculas (moléculas de adhesión, citocinas y quimiocinas, y sus receptores) y células que participan en la inmunobiología de la EII son fundamentales para el desarrollo de esta enfermedad.

2.28 MEDIADORES DE LA RESPUESTA INMUNITARIA INNATA EN LA CUCI

El sistema inmunitario innato tradicionalmente se considera como la primera línea de defensa contra las infecciones microbianas y es capaz de establecer una respuesta rápida frente a estas (42). Algunos de los mecanismos pro-inflamatorios de la inmunidad innata se encuentran inmunomodulados en el intestino. Un ejemplo de esto es el fenotipo de las células presentadoras de antígeno (células dendríticas), consideradas como parte de la inmunidad innata, que en condiciones normales presentan fenotipos que no responden a las bacterias y los antígenos provenientes del lumen intestinal, asociado con su capacidad para producir IL10 (43).

Anteriormente se consideraba que la respuesta inmunitaria innata era inespecífica; sin embargo, actualmente se conoce que dicha respuesta ocurre también mediante el reconocimiento de patrones moleculares asociados con patógenos (PAMPs: pathogen associated molecular patterns) por células del huésped a través de receptores específicos.

La mucosa del tracto intestinal humano responde de manera constante a la enorme cantidad de flora microbiana; numerosos estudios han demostrado el papel clave de la microbiota intestinal en pacientes con EII. La monocapa de células epiteliales en la EII responde a los cambios que ocurren en la población bacteriana de lumen mediante la respuesta inmunitaria innata. Lo anterior ocurre a través de la detección de PAMP, bacterias y virus, como el lipopolisacárido, los peptidoglicanos, la flagelina y otras lipoproteínas. En este sentido, el conocimiento acerca de la inmunidad innata ha avanzado a partir del descubrimiento de estos sensores de productos microbianos llamados PRR. Los principales PRR en el intestino son los receptores de la familia muramil dipéptido (NOD), que desempeñan

funciones importantes en el mantenimiento de la homeostasis en la mucosa y sus alteraciones contribuyen a la patogénesis de la CUCI (44).

2.29 RECEPTORES DE LA INMUNIDAD INNATA

Las células del intestino poseen diferentes repertorios de los receptores de la inmunidad innata, lo cual le permite al intestino en su conjunto establecer respuestas rápidas que controlen los constantes cambios de las bacterias y otros microorganismos del microbioma.

A nivel celular los PRR se encuentran en la superficie de la membrana celular, en los endosomas y en el citosol. El repertorio de estos receptores varía de acuerdo con las diferentes células; las células epiteliales sólo expresan algunos de estos receptores, mientras que las CD expresan todos. Los principales receptores son los (Toll like receptors) TLR y los NOD; en términos generales, el reconocimiento de las moléculas bacterianas por parte de estos receptores conlleva la activación de la producción de diferentes citocinas y quimiocinas (44).

La activación de la respuesta inmunitaria innata por vía de los PRR (Receptores de reconocimiento de patrón) en respuesta al reconocimiento de los productos microbianos es importante para la activación del proceso inflamatorio crónico que caracteriza a la CUCI. Mediante la localización espacial y funcional de los TLR el intestino, en condiciones normales, mantiene un estado de inflamación controlada y en condiciones de enfermedad induce la inflamación crónica persistente y descontrolada en respuesta a la flora normal y a las bacterias patógenas. Se ha demostrado que tanto las variantes genéticas de los PRR del hospedero como la fisiología de la respuesta a la activación de los mismos participan en el desarrollo y la susceptibilidad a padecer CUCI. A nivel celular estos receptores transducen

la señal, activando diferentes vías de señalización, donde participan factores de transcripción cruciales en la inducción de la respuesta innata, entre los que se encuentra el factor nuclear kappa B (NF-κB) (44).

2.30 CITOCINAS

Un componente de la respuesta innata indispensable para dirigir la respuesta inmunitaria adaptativa es la secreción de citocinas. Las citocinas son polipéptidos que se producen en respuesta a microorganismos y en la inflamación aguda regulan la inducción de muchos procesos asociados con la misma (45). La secreción de citocinas es casi siempre un acontecimiento breve. Las respuestas celulares a la mayoría de las citocinas consisten en cambios en la expresión génica en las células diana, lo cual da lugar a la expresión de nuevas funciones y en ocasiones a la proliferación de estas (45,46).

Además se han observado incrementos de los mediadores bioquímicos pro-inflamatorios tales como interleucina 1, interleucina 2, interleucina 6, factor de necrosis tumoral alfa, tromboxano A2 y leucotrieno B4 así como también un defecto en la producción de mediadores bioquímicos anti-inflamatorios tales como el antagonista del receptor de Interleucina 1, el factor de crecimiento y transformación beta, la Interleucina 4 y la 10, además de prostaglandina E2 y prostaciclina 12. (45) Tabla 1.

2.31 MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

Las moléculas de adhesión constituyen un grupo de moléculas proteicas producidas por las células endoteliales que actúan de manera fundamental para inducir la movilización de las células inmunitarias a los sitios de inflamación (diapédesis). En general participan en

diferentes procesos biológicos, como la embriogénesis, la reparación tisular, la diferenciación, el crecimiento, comunicación y movilización celular (47).

En la CUCI se han descrito diversas alteraciones de las moléculas de adhesión siendo más evidente en aquellas áreas de mayor actividad o con ulceraciones. La adhesión de células circulantes al endotelio vascular ocurre en las fases tempranas de la inflamación y está mediada por moléculas de adhesión específicas. Algunas de las moléculas implicadas en este proceso se han encontrado en la mucosa intestinal normal. Las más representativas son la molécula de adhesión intercelular - 1 (ICAM-1), el antígeno asociado de función de los linfocitos (LFA-1) y la molécula de adhesión de plaquetas a células endoteliales-1 (PECAM-1).

2.32 QUIMIOCINAS

Las quimiocinas constituyen una familia pequeña de moléculas proteicas, cuya función principal en las respuestas inmunitarias es la de inducir la movilización por quimiotaxis selectiva de las células de la inmunidad a los sitios de inflamación. En la CUCI participan durante el desarrollo de la enfermedad y los periodos de exacerbación de la misma. Las quimiocinas y sus receptores son fundamentales a nivel funcional para los procesos de restitución y reparación de la mucosa en condiciones de inflamación. En resumen, son indispensables para que el intestino restablezca la función barrera.

Las quimiocinas y los receptores de quimiocinas más relacionados con la CUCI son los que se asocian con el receptor CXCR3 como eje de respuesta a las quimiocinas CXCL9, CXCL10 y CXCL11, entre otras (48). Tabla 2

2.33 RESPUESTA INMUNITARIA ADAPTATIVA EN LA EII

La respuesta inmunitaria adaptativa se ha definido como la que en procesos de infección tarda días en establecerse y busca generar memoria inmunitaria. En el proceso de inflamación crónica, la respuesta inmune adaptativa se ve alterada; se ha demostrado sobre todo una importante participación de las células presentadoras de antígenos activadas (CD y macrófagos) sobre la diferenciación de linfocitos hacia linajes mayormente pro-inflamatorios .

En condiciones normales las CD del intestino se encargan de regular los procesos que inducen estados de anergia; dentro de la respuesta inmunitaria adaptativa inducen la producción de células T reg. En particular en la CUCI, no sólo la presentación de antígenos por parte de las CD desempeña un papel importante, sino que también los macrófagos tienen un papel primordial.

En este sentido, la activación de las células dendríticas y macrófagos en la CUCI secretan citocinas que en combinación con otras del medio, participan activamente en la respuesta inflamatoria inclinando el balance de la diferenciación de los distintos linajes en el intestino hacia los linfocitos Th1, Th2 y la Th17. Además, en el epitelio intestinal dañado por la inflamación crónica los antígenos-amplifican la producción de citocinas como son la IL-1, IL-5 y TNF- α (14,15).

2.34 LINFOCITOS T

Los linfocitos T colaboradores (del inglés "T Helper Cells"), también conocidos como linfocitos Th son un subgrupo de linfocitos que tienen un papel muy importante en establecer y maximizar las capacidades de defensa del sistema inmune. El linaje de linfocitos T que se desarrolla a células efectoras se diferencia en dos grandes tipos de linfocitos conocidas como Th1 y Th2. Además, en fechas recientes se describieron otros linajes de linfocitos T, como los T reg que pueden influir en la función y activación de los linfocitos T cooperadores y de los Th17, de importante función efectora (nombrados por su capacidad para producir IL-17). Una diferencia importante entre los linfocitos T reguladores, y los linajes Th1, Th2 y Th17 es que estos siempre suprimen las acciones del sistema inmunitario.

La producción de las citocinas TGF- β e IL-10 es clave en la modulación del balance de la diferenciación de los linfocitos.

En condiciones normales la actividad inflamatoria está regulada por el balance entre las diferentes poblaciones de los linfocitos T y de las citocinas que se secretan en la lámina propia mucosa con actividad pro-inflamatoria, como el TGF- β e IL-10, de tal forma que se mantiene el nivel de actividad inflamatoria dentro de los niveles fisiológicos.

En la CUCI el infiltrado inflamatorio propio es de predominio linfocitario de linfocitos T *helper*, que se consideran responsables de la destrucción tisular que acontece en la mucosa inflamada, dada su capacidad de secreción de citocinas y respuesta frente a los antígenos locales.

Además, se presenta un elevado grado de activación celular acompañado de un fenómeno de resistencia a la apoptosis, que conduce a una acumulación local de linfocitos T y a la perpetuación de la respuesta inflamatoria. La inflamación producida en el intestino a causa de las EII posee características predominantes para cada tipo de enfermedad.

La falta de una regulación adecuada de linfocitos T y células asesinas naturales (NK, “Natural Killer) participa en el desarrollo y exacerbación de la CUCI. En general, las células presentadoras de antígeno, los linfocitos Th1, Th2, Th17 y células T reguladoras, recientemente se han caracterizado y sus citocinas desempeñan un papel complejo en la CUCI (46).

En general la función efectora principal de los linfocitos Th2 se relaciona con las reacciones inmunitarias mediadas por la inmunoglobulina E (IgE) y los eosinófilos/mastocitos. Esta respuesta es inducida por IL-4, IL-5 e IL-13, y tradicionalmente se consideran como una respuesta inmunomoduladora (13).

En CUCI, la respuesta de los linfocitos T cooperadores es predominantemente tipo Th2 y las principales citocinas que se producen son la IL-5 e IL-13. En células periféricas de pacientes con CUCI, se observó que las células marcadas con los anticuerpos de CD161 y CD1d que corresponde a células NK eran la principal fuente de IL-5 e IL-13 (46).

Debido a que la expresión de IL-4 no se encuentra aumentada, la respuesta Th2 en la CUCI es atípica. En biopsias de pacientes con CUCI se ha observado que las células de linajes tipo Th2 son hiperreactivas.

Existe un linaje de linfocitos T capaz de producir la IL-17, conocido como Th17. Se desconoce la función de estas células en condiciones normales y hasta el momento la

mayoría del conocimiento sobre ellas proviene del estudio de enfermedades con procesos de inflamación crónica y autoinmunidad (47-50).

Sobre todo en la CUCI aumentan la presencia y la concentración de IL-17 en suero y en la mucosa intestinal. La respuesta Th17 es pro inflamatoria y se ha observado que la producción de IL-23 en la transición es fundamental para diferenciar el linaje TH0 al TH17 y sostener la función efectora de las células Th17 (51).

La polarización de la respuesta inmunitaria hacia Th1, Th2 o Th17 depende tanto de los eventos intrínsecos de las células como del medio ambiente. La T-bet y el GATA-3 son factores de transcripción asociados con el desarrollo de respuestas inflamatorias de tipo Th1 y Th2. Además de las células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺ expresan el factor de transcripción FOXP3, hay evidencias que indican que la existencia de células T reguladoras que son inducidas en la periferia son llamadas Treg adaptativas. Otras células que participan en la respuesta inmunitaria adaptativa y han sido caracterizadas en relación con la CUCI consisten en una sub población de células B capaces de inmunomodular en gran medida la inflamación mediante la producción de IL-10 (42).

III. ANTECEDENTES

3.1 INTERLEUCINA 10 (IL-10) EN EL PROCESO INFLAMATORIO DE LA CUCI.

La Interleucina (IL-10) es una citocina inmunorreguladora importante, producida por células Th2, células TCD8+, monocitos, queratinocitos y células B. Actúa en las células presentadoras de antígeno (células dendríticas, macrófagos y células T) mediante la inhibición tanto de la síntesis de citocinas como de moléculas co-estimuladoras y moléculas HLA clase II (52).

El papel de la IL-10 en el sistema inmunitario de las mucosas ha sido ampliamente estudiado, en modelos murinos la IL-10 ejerce una potente actividad moduladora, al antagonizar la expresión de moléculas co-estimuladoras y la liberación de citocinas pro-inflamatorias y en la inhibición de la maduración de las células presentadoras de antígeno (APC). En pacientes con CUCI, los linfocitos T en circulación secretan elevadas concentraciones de esta citocina (53).

Se ha visto que en ratones knock-out IL-10^{-/-} se induce un aumento en la gravedad de la colitis por el incremento de la producción de IL-12 e IFN- γ (54-55). Se ha propuesto que IL-10 actúa directamente en la proliferación y diferenciación de los linfocitos T responsables de la respuesta inmune tipo Th2 característica de la CUCI y los tipos Th1 y Th17 presentes en Enfermedad de Crohn . En general no se conoce el mecanismo de acción de la IL-10 en el proceso inflamatorio crónico de la CUCI.

Los receptores de IL-10 están formados por dos moléculas de alfa (IL10R1) y dos moléculas de beta (IL10R2). En ratones deficientes de estas moléculas se desarrolla colitis

grave, lo que sugiere el papel de los receptores de IL-10 en la regulación del proceso inflamatorio intestinal (56,57). Existen estrategias en el tratamiento de la EII que incluyen la administración de IL-10 recombinante y microesferas de gelatina que contienen IL-10 (52)

3.2 FAMILIA DE IL-10 (IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28A, IL-28B E IL-29)

Nuevas citocinas de la familia de IL-10 (IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28A, IL-28B e IL-29) están involucradas con la respuesta inmune y el proceso inflamatorio, regulando diversas actividades, las cuales incluyen la supresión inmunológica, amplificación de la respuesta anti-bacterial y antiviral, actividad antitumoral y favorecen la auto-tolerancia en las enfermedades autoinmunes. Cada interleucina representa un punto especial dentro del mecanismo inflamatorio (Figura 6). La IL-10 y esta nueva familia de citocinas pueden propiciar nuevas alternativas en el tratamiento de la EII (58). Es poco lo que se conoce del papel biológico de estas citocinas en la regulación en la enfermedad inflamatoria intestinal y no existen estudios previos en la literatura que evalúen los niveles de expresión en pacientes con CUCI.

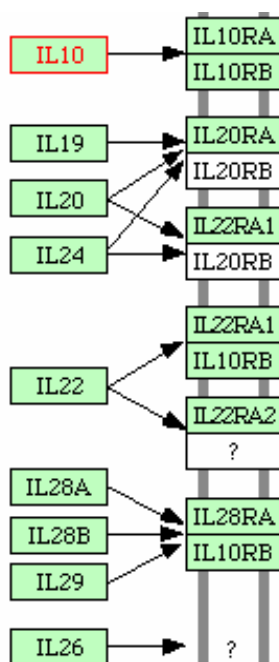


Figura 6: Familia de IL-10 y receptores.

3.3 INTERLEUCINA IL-19

La interleucina 19 se expresa en células epiteliales, macrófagos y células B (59). Se ha observado en estudios *in vitro* que el lipopolisacárido (LPS) induce un incremento de la expresión de IL-19 en monocitos de humanos (60), y activa la secreción de TNF- α y la IL-6.

En pacientes con psoriasis y asma se sabe que su expresión está incrementada. La IL-19 altera el equilibrio de las células Th1/Th2 a favor de Th2 induciendo la producción de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 por las células Th2 e inhibiendo la producción de IFN- γ por las células Th1 (61).

Azuma y cols. (62) determinaron mediante la técnica de PCR en tiempo real disminución significativa en la expresión de los niveles de ARNm del gen de IL-19 en muestras de intestino de ratones en condiciones de inflamación aguda en comparación con los ratones sin inflamación.

3.4 INTERLEUCINA IL-20

La IL-20 se expresa en bajos niveles en tejidos como la piel, la tráquea, y pulmones (63). En la psoriasis se encuentra incrementada la producción de IL-20 y se ha visto que induce a la proliferación de queratinocitos, sugiriendo el papel de esta citocina en la función epidérmica y reparación epitelial.

El descubrimiento de receptores para IL-20 (IL-20R α e IL-20R β) en las células entéricas ha planteado la posibilidad de utilizar esta interleucina por vía intra rectal , ya que de esta

forma se lograría aumentar sus concentraciones en la mucosa colónica y mejorar su eficacia y generar el desarrollo de terapias alternativas para el tratamiento de pacientes con CUCI.

3.5 INTERLEUCINA IL-22

La IL-22 originalmente se nombró IL-TIF (IL-10-related T cell-derived inducible factor). Se ha reportado que induce la respuesta inflamatoria en miofibroblastos en el epitelio colónico (64).

IL-22 es una citocina con una doble función tanto pro-inflamatoria como anti-inflamatoria. Es producida por diversas fuentes celulares que incluyen células Th17, células NK y células Th22. Recientemente ha sido ligada a enfermedades autoinmunes.

En pacientes con EC activo, se ha observado incremento en la secreción de IL-22 y favorece la migración de las células epiteliales intestinales (64). Recientemente en un modelo murino de CUCI, se reportó que IL-22 promueve la atenuación de la inflamación intestinal y la cicatrización del epitelio, originada por la producción aumentada de moco por las células caliciformes (65).

3.6 INTERLEUCINA IL-24

La IL-24 es una citocina anti-inflamatoria, originalmente identificada como una molécula supresora de tumores que se expresa en los melanocitos sanos. Originalmente fue nombrada como proteína asociada a la diferenciación de melanoma-7 (MDA-7). Se expresa en ciertos tipos celulares, como son melanocitos, queratinocitos, monocitos estimulados con lipopolisacárido, fibroblastos, linfocitos T cooperadoras (Th2) y vírgenes CD4+CD45RA+ (66). Además, promueve la apoptosis de las células tumorales aparentemente sin

especificidad a tejido no neoplásico. Comparte una homología del 20-30% de su secuencia de aminoácidos con IL-10, IL-20, IL-22 y señala a través de un heterodímero que consta de las cadenas de IL-20R1 e IL-20R2 y conduce a la activación de STAT3. Se ha reportado que actúa sobre las células epiteliales de colon a través de JAK1/STAT3 e induce la activación y la expresión de SOCS-3 y mucinas, lo que sugiere el papel protector sobre la mucosa colónica (67).

IV. JUSTIFICACIÓN

El conocimiento en los mecanismos inmunológicos que intervienen en la EII, ha abierto nuevas líneas de trabajo con fines terapéuticos como son: la neutralización de citocinas pro-inflamatorias (IL-6 y el TNF- α) y la administración de citocinas anti-inflamatorias (IL-10 e IL-4), que se encuentran en diferentes fases de investigación (4). La CUCI presenta una respuesta inmune anormal a nivel de la mucosa intestinal. En la CUCI se ha reportado un aumento en la respuesta del sistema inmune que conduce a la producción de mediadores inflamatorios como citocinas y moléculas de adhesión que llevan a la destrucción celular (1). Por lo anterior, es importante considerar el papel que pueden desarrollar esta nueva familia de citocinas en las diferentes condiciones de enfermedad (actividad y remisión), con el fin de desarrollar nuevos métodos diagnósticos y terapéuticos. Existen estudios donde se reportan diferencias en la expresión génica de citocinas entre los pacientes con CUCI y controles. Dentro de las investigaciones de expresión de citocinas en EII, en pocos estudios se analiza la relación entre la expresión génica y la actividad de la enfermedad (clínica e histológica), en particular, es menor la cantidad de estudios, donde se mide la expresión génica de citocinas durante las diferentes condiciones de la enfermedad (remisión, actividad leve, moderada y grave). La expresión de estas nuevas citocinas no ha sido caracterizada en pacientes con CUCI, así como la relación de estas con las características clínicas de la enfermedad tampoco ha sido estudiada.

V. OBJETIVO GENERAL

Este estudio pretende aumentar el conocimiento de la Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática.

El conocimiento acumulado de diversos aspectos de la etiopatogenia de la enfermedad podrá correlacionarse con implicaciones clínicas y terapéuticas potenciales.

El objetivo del presente trabajo es cuantificar los niveles de RNA mensajero de las interleucinas de (IL-10, IL-19, IL-20, IL-22 e IL-24) en mucosa colónica de pacientes con CUCI en las diferentes condiciones de enfermedad (actividad y remisión) y controles.

VI. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar los niveles de RNA mensajero del conjunto de receptores (IL-10RA, IL-10RB, IL-20RA e IL-20 RB) en mucosa colónica de pacientes con CUCI en las diferentes condiciones de enfermedad (actividad y remisión) y controles.
- Realizar la detección y cuantificación de las interleucinas y del complejo de receptores trans membranales *in situ*.
- Determinar la asociación de la expresión génica con el grado de actividad histológico y endoscópico de la enfermedad con algunas variables clínicas (edad, género, extensión de la CUCI, manifestaciones extra intestinales, curso clínico y respuesta al tratamiento).

VII. HIPOTESIS

Nula: La familia de IL-10 no participa en la etiopatogenia de la Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática.

Alternativa: La familia de IL-10 está involucrada en la etiopatogenia de la Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática.

VIII. MATERIAL Y METODOS

1. PACIENTES

Estudio transversal y comparativo que incluyó a un total de 40 pacientes con CUCI (25 activos y 15 en remisión) y 18 controles sin datos clínicos y endoscópicos de inflamación intestinal o de alguna enfermedad sistémica (cáncer, enfermedad autoinmune, enfermedad diverticular, colitis medicamentosa, colitis post-radiación, colitis infecciosa, colitis isquémica). Los controles consistieron en individuos que acudieron por pérdida de peso y anemia en estudio. Todos los sujetos con CUCI pertenecían a la Clínica de Enfermedad Inflamatoria Intestinal del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” y firmaron su consentimiento a participar en el estudio. Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética del INCMNSZ. La evaluación de la actividad de CUCI en la mucosa se basó en hallazgos endoscópicos e histológicos, según la puntuación MAYO e índice de Riley (68) respectivamente. El diagnóstico de CUCI se confirmó por criterios histopatológicos.

Criterios de inclusión:

- Nacidos en México.
- Pacientes con diagnóstico confirmado por histopatología de CUCI
- Rango de edad de entre 18 y 70 años de edad.
- Cualquier género.

Criterios de exclusión:

- Pacientes con diagnóstico de colitis aguda autolimitada, colitis microscópica, colitis medicamentosa, colitis isquémica, enterocolitis posradiación, diverticulitis, apendicitis, enterocolitis neutropénica, síndrome de la úlcera rectal solitaria, cáncer y linfoma.
- Pacientes con patología autoinmune concomitante.
- Que no deseen participar en el estudio.

Criterios de eliminación:

- Falta o pérdida de las muestras biológicas.

2. TEJIDO

Para la cuantificación de la expresión génica de (IL-10, IL-19, IL-20, IL-22 e IL-24), se obtuvieron 58 biopsias de mucosa colónica. Las biopsias de colon se colocaron en tubos crioviales con 1 mL de preservador de ácidos nucleicos (RNA later®), se mantuvieron a temperatura ambiente por un período de 6 a 8 horas, posteriormente fueron almacenadas a -70°C hasta el momento de la extracción del ARN.

3. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL.

A partir de las biopsias de colon se obtuvo el ARN total empleando un kit de extracción de ARN (High Pure RNA Tissue Kit de Roche) según la metodología sugerida por el fabricante. Las biopsias se mezclaron usando el homogenizador durante 1 minuto con amortiguador de lisis, se lavó con etanol al 100%, empleando las columnas de purificación, se centrifugó la mezcla a 13.000 xg durante 15 segundos, lavándose con amortiguador de

lavado a 13.000 xg durante 15 segundos, finalmente se agregó 100 µl de buffer de elución al ARN total.

La cuantificación de la concentración de RNA con nanodrop se leyó a una longitud de onda de 260 y 280 nanómetros.

Una alícuota de cada uno de los productos de ARN se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% y fue visualizado por tinción con bromuro de etidio. Se documentó con un transiluminador con luz ultravioleta como se observa en la siguiente imagen:

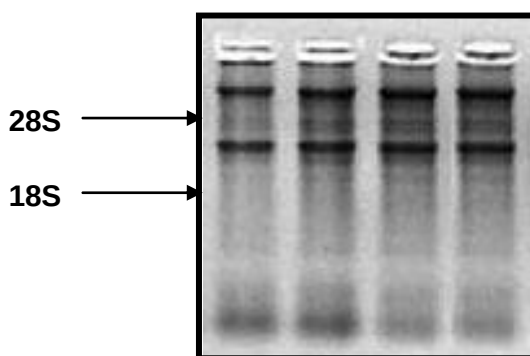


Figura 7. Bandas de ARN 28S y 18S de pacientes con CUCI en un gel de agarosa al 1 %.

4. SÍNTESIS DE ADN DE CADENA COMPLEMENTARIA POR PCR-TRANSCRIPTASA REVERSA.

El ADN de cadena complementaria se obtuvo por Transcripción Reversa. La reacción se llevó a cabo con 20 µl de la siguiente forma: Preincubación: 25°C X 10 minutos, Incubación: 55°C x 30 minutos, seguida de la desnaturalización: 85°C x 5 minutos en un termociclador (Perkin-Elmer).

5. ANÁLISIS DE LA CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE INTERÉS POR PCR EN TIEMPO REAL.

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó empleando como sustrato el ADN complementario que resultó de la retrotranscripción. Para la amplificación de las regiones de interés, la reacción fue llevada a cabo en 10 µl. La amplificación se realizó bajo las siguientes condiciones: un programa de desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, 45 ciclos de amplificación (95°C-10 segundos, alineación 60°C 10 segundos, extensión 40°C-30 segundos) y un ciclo de enfriamiento a 40°C durante 30 segundos. Para determinar la expresión relativa de los genes blanco y GAPDH (Gliceraldehído Fosfato Deshidrogenasa, como gen de referencia) se utilizó el Termociclador Light Cycler 2.0 Roche ® empleando ensayos validados para la cuantificación (reproducibilidad y linealidad), con iniciadores sentido y antisentido de Invitrogen® y sondas TaqMan para cada gen (Universal Probe Library Set, Human de Roche ®) como se ilustra en la tabla 3.

6. DETECCIÓN DE LAS INTERLEUCINAS Y RECEPTORES EN TEJIDO INTESTINAL.

La detección de (IL-10, IL-19, IL-20, IL-22 e IL-24) *in situ* en tejido intestinal se realizó por inmuno-histoquímica con anticuerpos específicos (SANTACRUZ).

Las muestras de tejido intestinal se desparafinaron durante 45 min a 54°C en el horno, y se hidrataron en: xileno, alcohol al 100%, alcohol al 96%, alcohol al 50% y agua destilada durante 3 min y en agitación.

Posteriormente las laminillas se incubaron con una solución de peróxido al 3 % en metanol absoluto (1:9 vol/vol) durante 20 min, para eliminar la actividad de peroxidasa endógena. Los sitios de pegado inespecífico se bloquearon con anticuerpos provenientes del Kit ABC staining (Vector Staining) durante 30 min a temperatura ambiente en cámara húmeda. Los tejidos se incubaron durante 24 horas a 4 grados C con el anticuerpo primario diluido a una concentración de 10 µg/ml en albúmina al 3%.

Los tejidos se incubaron con el anticuerpo secundario biotinado correspondiente durante 1 hr a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó el complejo avidina-peroxidasa, con el que se incubó durante 1 hr a temperatura ambiente. La reacción se desarrolló empleando una solución de 6 mg de diaminobencidina en 10 ml de Tris-HCl 0.05 M, pH 7.6 y 10 µl de H₂O₂ al 30% durante 10 min. Esta reacción produjo un precipitado de color sepia en las células Inmunorreactivas. Las muestras se contra-tiñieron con hematoxilina de Harris y se deshidrató el tejido con alcohol al 96%, alcohol absoluto, solución de alcohol absoluto/xileno (vol/vol), xileno y se montaron con resina.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS versión 17.0. La comparación de los datos de grupos independientes se analizó mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. La asociación de la expresión génica de (IL-10, IL-19, IL-20, IL-22 e IL-24) con las variables clínicas se realizó con la correlación de Spearman y se consideró como significativo un valor de $p < 0.05$.

IX. RESULTADOS

Se determinó la expresión génica de (IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 y receptores) en mucosa, así como la detección de la proteína en pacientes con CUCI y controles. Estudiándose un total de 40 pacientes con CUCI (14 hombres y 26 mujeres con una edad media de 41 años) y 18 controles (10 hombres y 8 mujeres con una edad media de 44 años). Las características clínicas y demográficas se presentan en la Tabla 4.

1. EXPRESIÓN GÉNICA DE IL-10 Y LOS RECEPTORES (IL-10R ALFA E IL-10RBETA).

La expresión génica de IL-10 fue mayor en mucosa colónica de pacientes con CUCI en remisión en comparación con los pacientes con CUCI activo ($p=0.000$) y con el grupo control ($p=0.000$). (Figura 8 a). La expresión génica del conjunto de receptores (IL-10R alfa e IL-10Rbeta) se encuentra incrementada en los pacientes con CUCI activo en comparación a los pacientes con CUCI en remisión y controles como se muestra en la figura 8 (b-c).

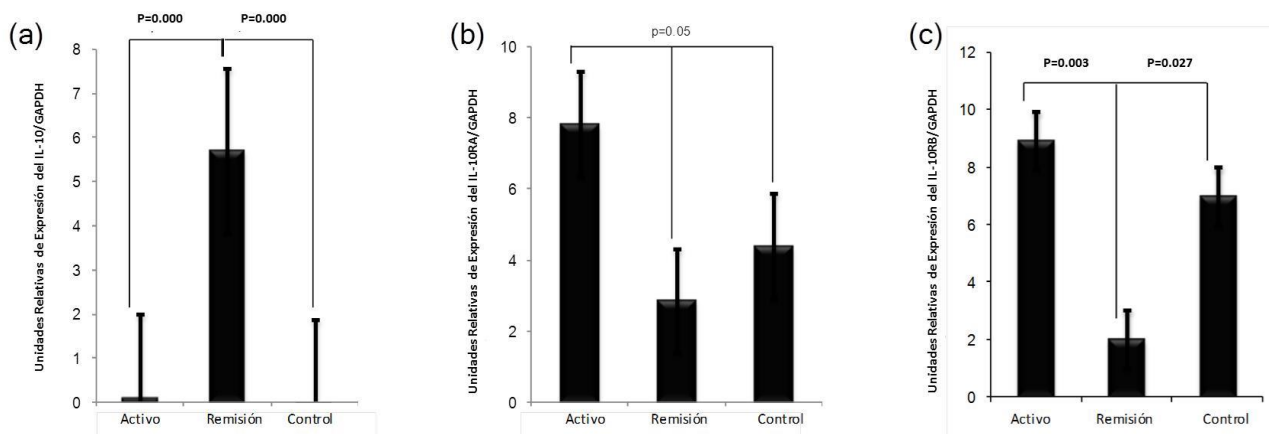


Figura 8. Niveles de RNA mensajero de IL-10, IL-10 RA e IL-10RB en mucosa colónica de pacientes con Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática (activo, remisión y controles).

2. SÍNTESIS DE IL-10 EN COLON DE PACIENTES CON CUCI Y CONTROLES.

En lo referente a la producción de la proteína de IL-10, se observó una correlación histomorfológica de la síntesis de esta citocina con las células mononucleares, predominantemente de estirpe macrofágica, siendo incipiente en los linfocitos, no sólo de infiltrados perivasculares, sino también de los distribuidos en el parénquima principalmente en los sitios de ulceración en la lámina propia (Figura 9).

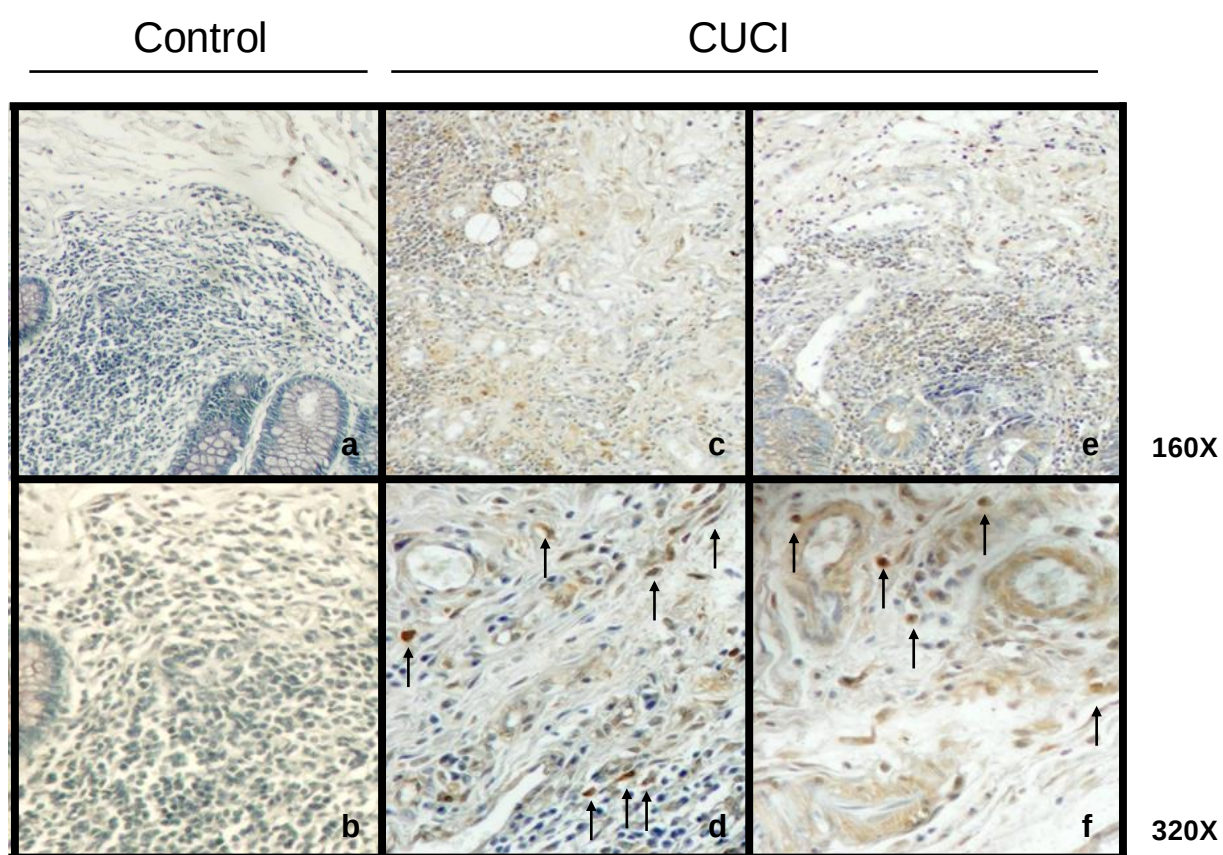


Figura 9. Detección de IL-10 en tejido colónico de pacientes con Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática en actividad y controles sin inflamación.

3. EXPRESIÓN DE IL-19 EN MUCOSA COLÓNICA DE PACIENTES CON CUCI.

La expresión génica de IL-19 fue mayor en mucosa colónica de pacientes con CUCI activo en comparación con el grupo control ($p=0.003$) y con CUCI en remisión ($p=0.05$). Además se observó diferencia significativa en los pacientes con CUCI en remisión comparado con el grupo control ($p=0.04$) (Figura 10).

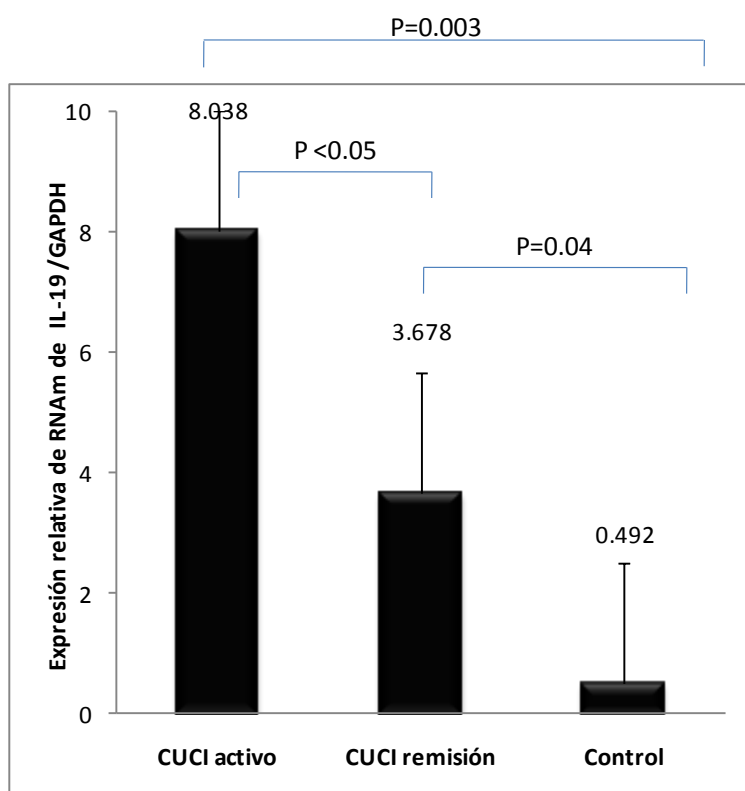


Figura 10. Niveles de RNA mensajero de IL-19 en mucosa colónica de pacientes con Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática y controles.

4. SÍNTESIS DE IL-19 EN TEJIDO INTESTINAL DE PACIENTES CON CUCI Y CONTROLES.

En el análisis inmuno-histoquímico, se observó que en los cortes de pacientes con CUCI activo, la fuente principal de IL-19 estaba constituida principalmente por linfocitos intra-epiteliales, células plasmáticas y células epiteliales del colon (Figura 11 a-b). A diferencia de los pacientes controles no inflamados donde se observó una menor producción de IL-19 a nivel de mucosa, submucosa y lamina propia. En el análisis cuantitativo mostro que al comparar la producción de IL-19 en pacientes con CUCI activo y controles no inflamados existen diferencias significativas a nivel de mucosa y serosa.

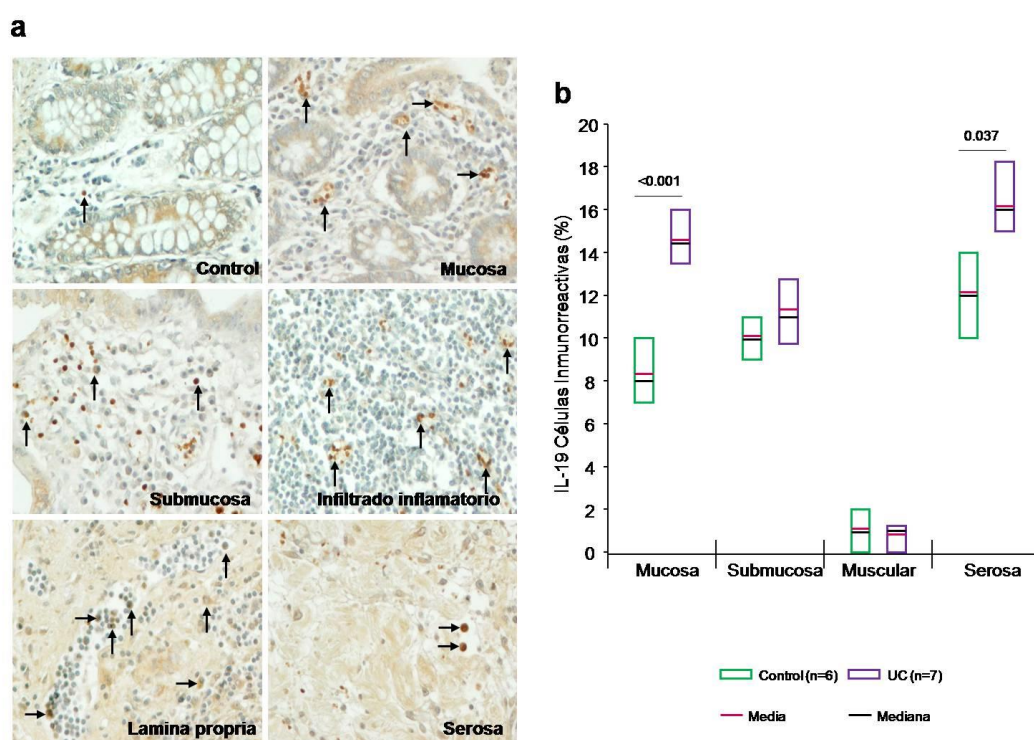


Figura 11. Detección y porcentaje de células positivas de IL-19 en tejido colónico de pacientes con Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática en actividad y controles sin inflamación.

5. ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE IL-19 Y LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.

El curso clínico leve manifestado por menos de una recaída al año de la enfermedad mostró asociación con la disminución de la expresión del gen de IL-19 de manera significativa ($p=0.03$) al comparar con aquellos pacientes que presentan un curso más agresivo con niveles elevados de expresión de IL-19 al asociarlos con variables clínicas como la edad, extensión, manifestaciones extra intestinales y respuesta al tratamiento no mostraron diferencia significativa.

6. EXPRESIÓN GÉNICA DE IL-20 Y SUS RECEPTORES.

La expresión génica de IL-20 es mayor en mucosa colónica de pacientes con CUCI activo en comparación con el grupo control ($p=0.04$) y con CUCI en remisión ($p=0.05$). No se observó diferencia significativa en los pacientes con CUCI en remisión comparado con el grupo control. A nivel de receptores la expresión génica de IL-20R α e IL-20 R β estuvo incrementada en los pacientes con CUCI en remisión en comparación con los controles. (Figura 12 a-c)

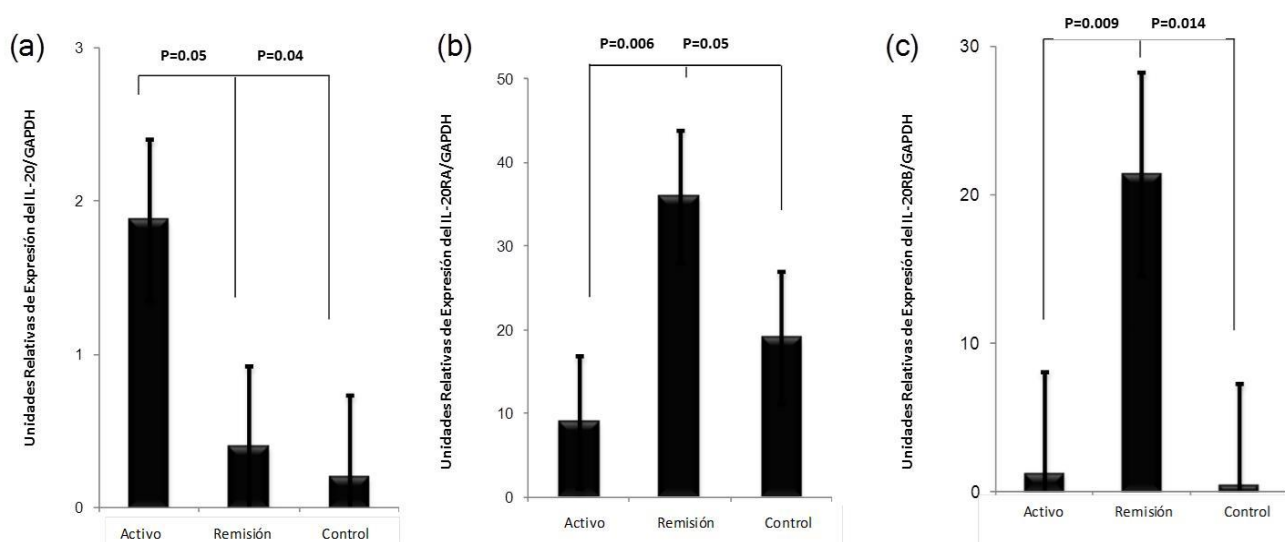


Figura 12. Niveles de RNA mensajero de IL-20, IL-20 RA e IL-20RB en mucosa colónica de pacientes con Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática (activo, remisión y controles).

7. SÍNTESIS DE IL-20 Y RECEPTORES (IL-20 RA -IL-20 RB) EN TEJIDO COLÓNICO DE PACIENTES CON CUCI Y CONTROLES.

El análisis inmuno-histoquímico mostró incremento en la producción de IL-20 en pacientes con CUCI. Las biopsias de los pacientes con CUCI presentaron infiltrados inflamatorios abundantes, predominantemente de células mononucleares, los cuales se extendían desde la capa serosa hasta la mucosa, siendo más abundantes en el epitelio y en la serosa. En todos los casos se observó una destrucción importante de la mucosa. En lo referente a la producción de la proteína de IL-20, se observó incremento en los pacientes con CUCI en comparación con los controles (Figura 12). La expresión de IL-20 R α a nivel de proteína es menor en comparación con IL-20 R β que se encuentra en el infiltrado inflamatorio de pacientes con CUCI activo (Figura 13-14).

Figura 13. Detección y porcentaje de células positivas de IL-20RA en tejido colónico de pacientes con Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática en actividad y controles sin inflamación.

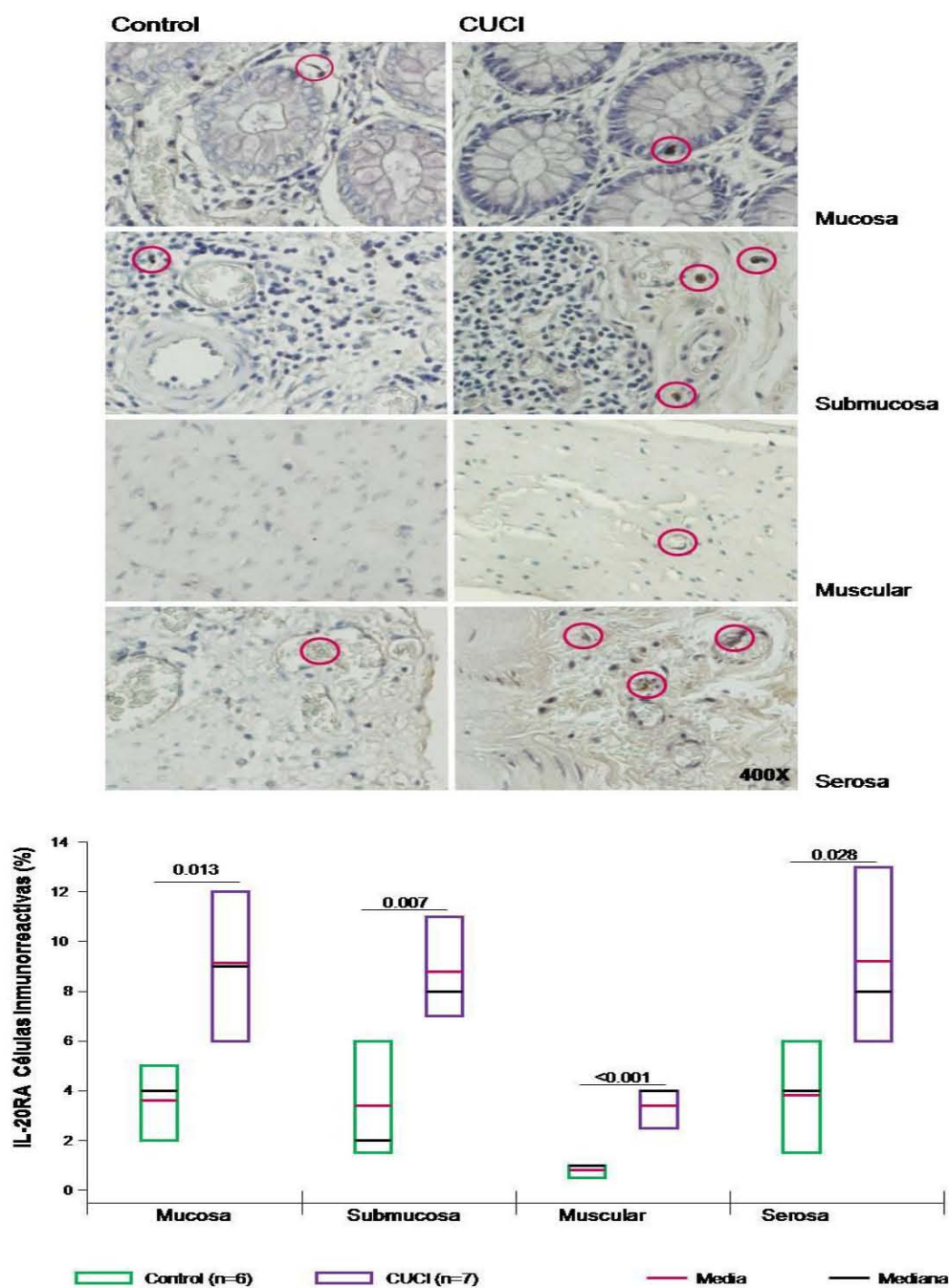
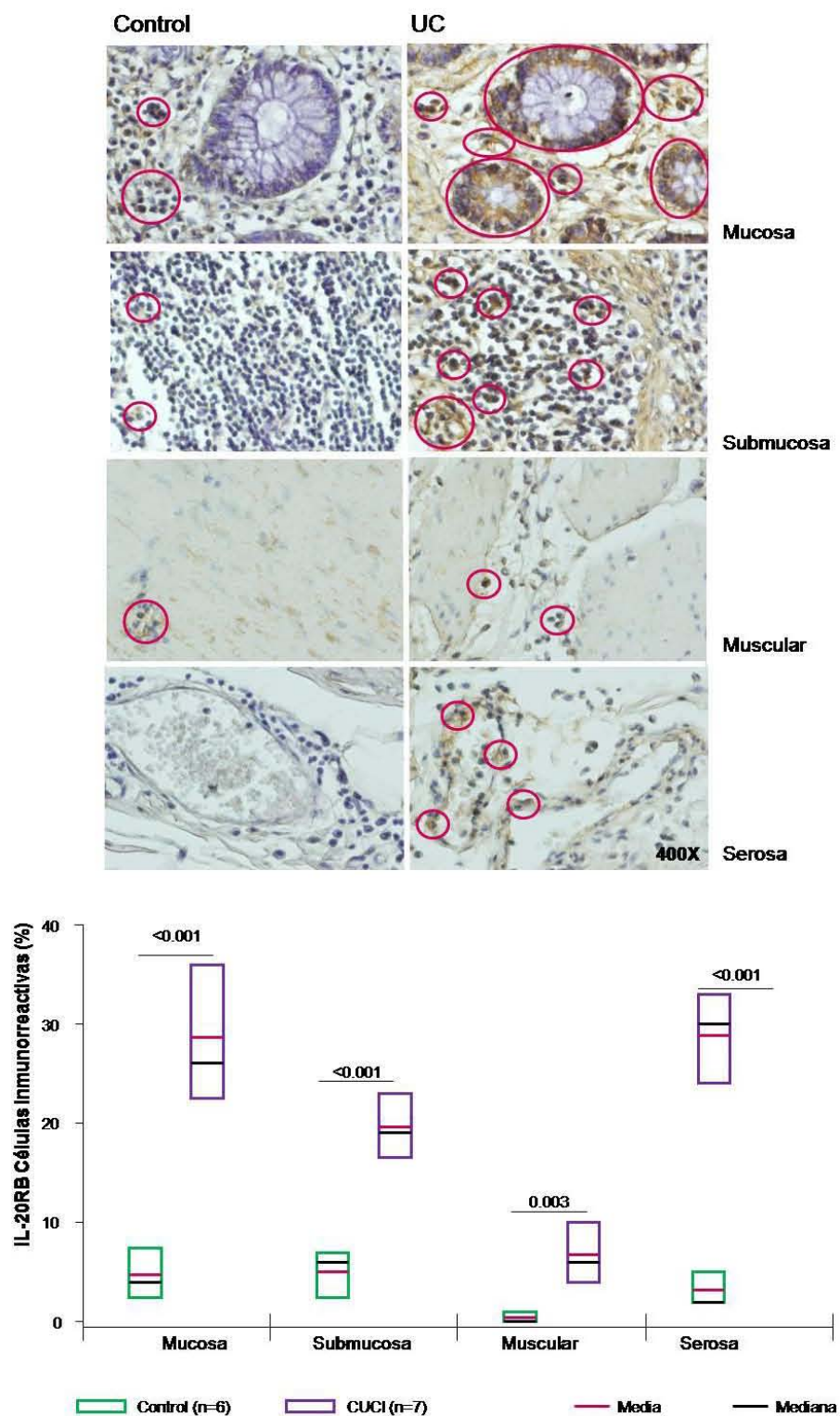


Figura 14. Detección y porcentaje de células positivas de IL-20RB en tejido colónico de pacientes con Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática en actividad y controles sin inflamación.



8.ASOCIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE IL-20 Y LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.

La correlación fue significativa entre la expresión del gen IL-20 con la actividad histológica ($p=0.043$), por lo que puede sugerir su participación en el proceso inflamación, ya que se confirmó el estado en remisión y de actividad clínica (leve, moderada y grave) por histopatología.

Las variables clínicas como la duración de la enfermedad mostró asociación significativa ($p=0.037$). Los pacientes que tenían mayores niveles de expresión del gen IL-20 tenían una duración de la enfermedad prolongada. Las variables clínicas como la respuesta al tratamiento médico y el curso clínico no mostraron asociación significativa. El análisis mostró que aquéllos pacientes con niveles altos de expresión de IL-20 no se asocian con variables clínicas como la extensión, género, edad al diagnóstico y las manifestaciones extra intestinales al no presentar diferencias significativas.

9. EXPRESIÓN DE IL-22 EN MUCOSA INTESTINAL.

Los niveles de IL-22 están incrementados en los pacientes activos en comparación a los que están en remisión ($P < 0.04$) y los controles ($P < 0.0001$). Además la expresión de IL-22 correlaciona con la actividad histológica ($r=0.63$ $P < 0.0007$). Estos hallazgos confirman el papel de IL-22 en la patogénesis de la enfermedad y sugiere que puede estar involucrada como un mecanismo de defensa por la producción aumentada de mucinas (Figura 15).

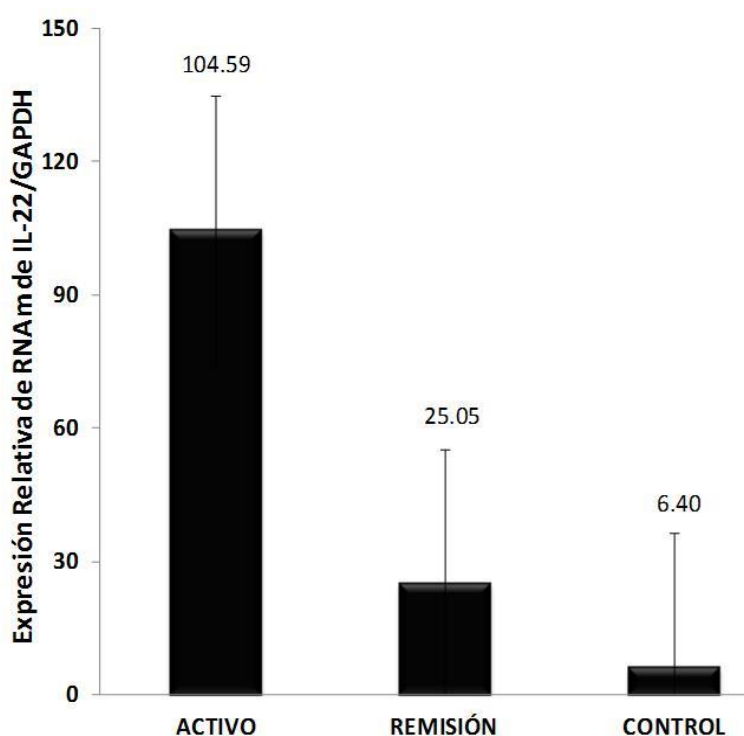


Figura 15. Niveles de RNA mensajero de IL-22 en mucosa intestinal de pacientes con Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática (activo, remisión y controles).

10 EXPRESIÓN GÉNICA Y PROTEICA DE IL-24 EN MUCOSA COLÓNICA.

La expresión de IL-24 fue mayor en la mucosa colónica de pacientes con CUCI activa en comparación con los controles ($p<0.0001$) y los CUCI remisión ($p=0.001$), respectivamente. La detección de IL-24 de la proteína en tejido colónico correlacionó con los niveles de RNA mensajero (Figura 16).

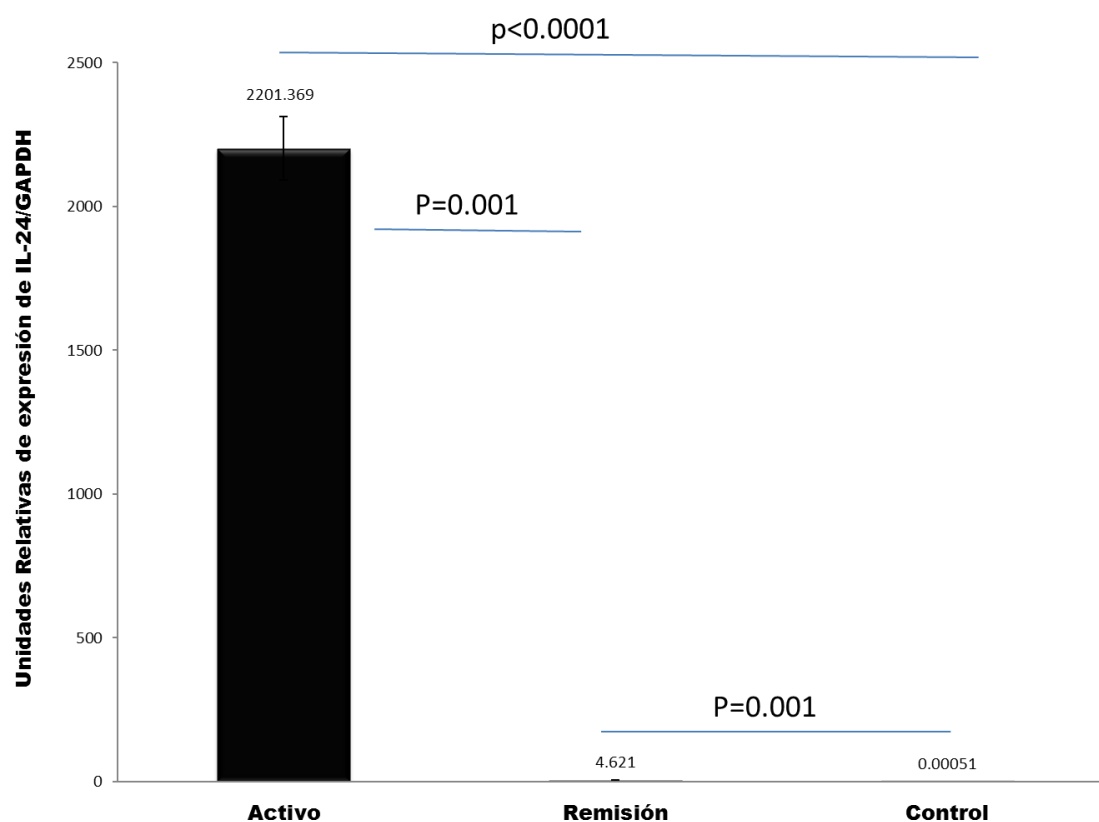
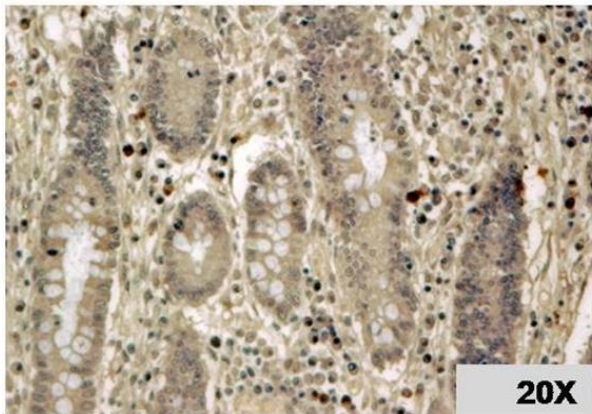
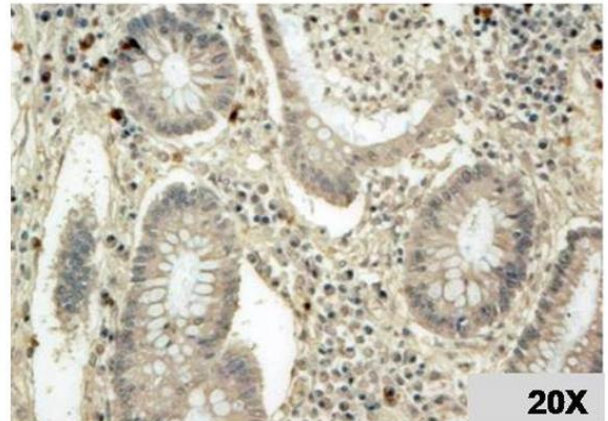


Figura 16. Niveles de RNA mensajero de IL-24 en mucosa colónica de pacientes con Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática (activo, remisión y controles).

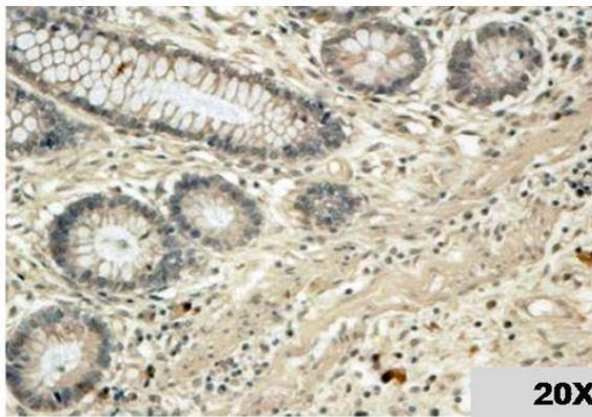
A. CUCI ACTIVO (Células epiteliales)



C. CUCI ACTIVO (Criptas)



B. CUCI ACTIVO (Células infiltrado inflamatorio)



D. No inflamado Control Negativo

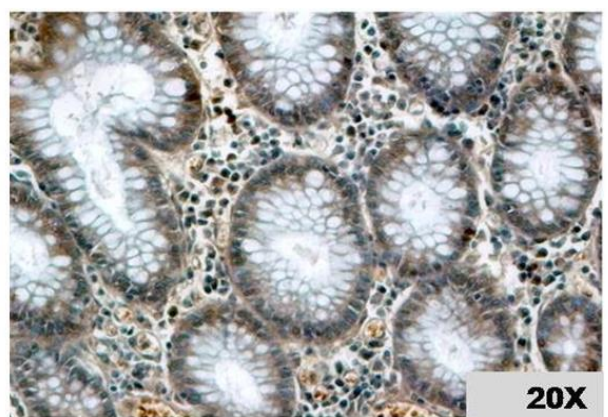


Figura 17. Detección de IL-24 en tejido intestinal de pacientes con Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática en actividad y controles sin inflamación.

X. DISCUSION

En el presente trabajo se demostró que la expresión génica y proteica de IL-19, IL-20, IL-22 e IL-24 está aumentada en mucosa de pacientes con CUCI activo al compararse con CUCI en remisión y los controles sin inflamación.

La interleucina 10 aumenta su expresión en el grupo en remisión debido a que es una citocina con efecto anti inflamatorio en el intestino ya que inhibe tanto la presentación de antígenos y la posterior liberación de citocinas pro-inflamatorias (13). El papel de la IL-10 en el sistema inmunitario de las mucosas ha sido ampliamente estudiado, por ejemplo en ratones knock-out IL-10^{-/-} desarrollaron enterocolitis crónica y la administración posterior de IL-10 previno su aparición (58). Si la IL-10 se administra cuando la enfermedad, está establecida, se produce mejoría del cuadro pero no la curación completa (43). Al suprimir la expresión del gen de la IL-10 en estos ratones genera un aumento en la producción de IL-12 e IFN- γ (57).

Nuestros hallazgos confirman los resultados obtenidos por Melgar y cols. (53) que reportaron un aumento muy significativo en la expresión génica de IL-10 en los linfocitos T y células positivas a IL-10 en colon de pacientes con CUCI.

La disminución en la expresión génica de IL-10 en el grupo de los pacientes con CUCI activo podría explicarse en el hecho de que existe una disminución en las poblaciones de células específicas, tales como células epiteliales o T reguladoras, una respuesta anormal a estímulos específicos, o una disminución de la afinidad de la IL-10 a sus receptores.

Otras células reguladoras que pueden participar en la inmunopatogénesis de la CUCI a través de la producción de IL-10 es un subtipo de células B (B-reguladores) . Mizoguchi y cols. (70,71) demostraron que las células B reguladoras pueden ser responsables de los mecanismos de supresión inmunológica mediados por IL-10 y TGF- β 1 en la EII.

El descubrimiento de receptores para la IL-10 (IL-10R1, IL-10R2) en las células entéricas ha planteado la posibilidad de utilizar esta interleucina por vía tópica, ya que de esta forma se lograría aumentar sus concentraciones en la mucosa colónica y mejorar su eficacia. En animales de experimentación, la administración de IL-10 en forma de enemas (mediante un vector adenoviral o contenida en microesferas de gelatina), han mostrado resultados alentadores (58).

Nuestros resultados demuestran que la expresión génica de las subunidades del receptor de (IL-10R1, IL-10R2) está incrementada en pacientes con CUCI activo, lo que sugiere que posiblemente no existe una interacción con su ligando eficiente lo que consecuentemente bloquea o inhibe el efecto regulador de la IL-10.

En el caso de los niveles de expresión génica de IL-19 estos disminuyeron en pacientes con CUCI en remisión comparado con el grupo control. Azuma y cols. (62) demostraron en un modelo murino de EII que la IL-19 tiene un papel importante en el control de la inflamación colónica, regulando el proceso inflamatorio tanto en la fase aguda como en la crónica así como también en la inducción de la cicatrización del epitelio intestinal probablemente por la producción de moco. Determinaron mediante la técnica de PCR en tiempo real disminución significativa en la expresión de los niveles de expresión génica de IL-19 en muestras de intestino de ratones con colitis en comparación con los ratones sin

inflamación. En pacientes con CUCI se observó lo contrario un aumento en la expresión génica y proteica de IL-19 en mucosa, esto puede explicarse como un mecanismo compensatorio de tipo anti inflamatorio para regular el proceso agudo inflamatorio a nivel intestinal.

Ghoreschi y cols. (72) demostraron que la IL-19 se asoció con el desarrollo de respuestas Th2 en la patogénesis de psoriasis. Gallagher G y cols (61) demostraron que la IL-19 y su receptor se asocian con la inducción de respuestas de células T cooperadoras tipo 2 (Th2), esto es importante ya que en la CUCI se observa un predominio de la respuesta inflamatoria Th2 y por la tanto la IL-19 parece estar involucrada en la inducción de este tipo de respuesta. En cuanto a la asociación de la expresión de IL-19 y las características clínicas, el curso clínico menos agresivo representado por pacientes con menos de una recaída al año mostró asociación significativa con la expresión del gen de IL-19 ($p=0.03$) lo cual sugiere un papel protector en pacientes con CUCI por su actividad anti inflamatoria. No se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión del gen de IL-19 con otras variables como el sexo ya que los valores de expresión fueron similares en mujeres y hombres.

En relación a las manifestaciones extraintestinales tampoco se encontró asociación con los niveles de expresión de IL-19 lo cual indicaría que los niveles de expresión de esta citocinas en mucosa están asociados con el desarrollo de la CUCI pero no parece tener papel con el desarrollo de manifestación extraintestinal de la CUCI. La edad, extensión, y respuesta al tratamiento tampoco mostraron diferencia significativa con la expresión de IL-19. Se han reportado polimorfismos de la IL-19 en población mexicana, se encontró que las

variantes (rs2243188 y rs2243193) podrían tener un papel protector en el desarrollo de la CUCI en individuos mexicanos (73).

En condiciones normales, el RNAm de IL-20 se expresa en bajos niveles en la piel, la tráquea, y pulmones (63). El análisis de la expresión por PCR en tiempo real de la IL-20 en células mononucleares indica que puede ser producida por los monocitos después de la estimulación con lipopolisacárido, lo cual sugiere que la IL-20 podría ser una citocina pro-inflamatoria. En la epidermis a nivel de queratinocitos se produce una gran cantidad de citocinas pro-inflamatorias como (IL-1, IL-6, IL-8, TNF-alfa, IL-7,) se ha observado que la IL-20 tiene un efecto directo sobre la proliferación y la inducción de la secreción de otras citocinas pro-inflamatorias, lo cual sugieren fuertemente su función autocrina o paracrina durante el proceso inflamatorio. En la psoriasis se encuentra aumentada la expresión, induce a la proliferación de queratinocitos lo que sugiere el papel de esta citocina en la función epidérmica y restauración epitelial (67). En general es poco lo que se conoce de la IL-20 en la respuesta inmunológica.

La expresión génica de IL-20 disminuye en pacientes con CUCI en remisión comparado con el grupo control. En el caso de los receptores se observó incremento en la expresión génica en los pacientes con CUCI en remisión, lo que puede explicarse en el hecho de que existe un aumento en la afinidad de la IL-20 a sus receptores lo que induce la atenuación de la inflamación.

El análisis inmuno-histoquímico mostró que en los pacientes con CUCI activo existe un incremento en la producción de IL-20 en comparación con los controles. En pacientes con CUCI activo y controles no se detectó la proteína de IL-20R α en el infiltrado inflamatorio.

Este hallazgo correlaciona con la expresión del RNA mensajero, lo que sugiere que estos tejidos son posibles objetivos fisiológicos de esta citocina para atenuar el proceso inflamatorio en los pacientes con CUCI en remisión. Por otro lado, la detección de IL-20R β en tejido colónico de pacientes con CUCI fue positiva en células del infiltrado linfoplasmocitario. En población mexicana se encontró que existen genotipos GG de IL-20 polimorfismos (rs2981573 y rs2232360) podrían tener un papel protector en el desarrollo de la CUCI. (74)

La IL-22 e IL-24 parecen tener un papel protector ya que se encuentran incrementadas en condiciones de actividad, esto puede ser explicado por el mecanismo propuesto por Sugimoto K y cols. Reportan que estas citocinas inducen la cicatrización de epitelio intestinal y la secreción de mucinas (65).

Este tipo de estudios básicos permite identificar marcadores bioquímicos de inflamación para su aplicación en clínica y su potencial uso para la administración de terapias biológicas dirigidas a estos blancos terapéuticos. En este trabajo se confirman observaciones previas de la función inmunorreguladora de IL-19, IL-20, IL-22 e IL-24 se apoya un aspecto en la fisiopatología de la enfermedad inflamatoria intestinal con potencial terapéutico. Por lo anterior, es importante considerar el papel que pueden desarrollar citocinas con propiedades inmunorreguladoras en las diferentes condiciones de enfermedad (actividad y remisión) con el fin de desarrollar nuevos métodos diagnósticos y terapéuticos.

XI. CONCLUSIONES

Es el primer estudio que demostró aumento de la expresión génica y proteica de IL-19, IL-20, IL-22 e IL-24, en pacientes con CUCI (activos y remisión) y podrían ser consideradas en el futuro como un blanco terapéutico. La expresión génica y proteica de IL-10 está aumentada en la mucosa colónica de pacientes con CUCI en remisión, lo cual confirma que es una citocina inmunorreguladora que favorece la remisión en pacientes con CUCI.

XII. REFERENCIAS

1. Podolsky, D. K. 2002. Inflammatory Bowel Disease. N England J Med. 347(6): 417-429.
2. Bousoño, G., Ramos P. E. 2006. Enfermedad Inflamatoria Intestinal. BOL PEDIATR 46(1): 91-99.
3. Yamamoto-Furusho Jesús Kazuo. Enfermedad inflamatoria intestinal. Revista de Gastroenterología de México 2011; Supl.1 (76):75-79.
4. Lakatos PL, Lakatos P: Is the incidence and prevalence of inflammatory bowel diseases increasing in Eastern Europe? Postgrad Med J, 2006; 82:332-337.
5. Edward VL: Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. Gastroenterology, 2004; 126:1504-1517.
6. Yamamoto-Furusho, J.K. 2006. Colitis Ulcerosa Crónica Inespecífica. En: Gastroenterología. 5ta Edición. Villalobos P. J., Olivera M. M. y Valdovinos D. M. Méndez Editores. México D.F. 401-404.4
7. Yamamoto-Furusho, J.K. 2007. Terapias nuevas en enfermedad inflamatoria intestinal. En: Nuevas Fronteras en Gastroenterología, Hepatología y Endoscopia Gastrointestinal. 1era Edición. Valdovinos D. M., Valdovinos A. F, Castro N. G, Uribe E. M. ELSEVIER. México D.F. 211.
8. Yamamoto-Furusho, J.K. 2007. Innovative therapeutics for inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol. 13(13): 1893-1896.
9. Sicilia Alarcón, MA Gassull, Gamellón, Epidemiología de las enfermedades inflamatorias intestinales. Factores ambientales internos y externos en su patogenia

- En: Enfermedad Inflamatoria Intestinal, Miquel Angel Gassul, 2007, ARAN. España. 30-51.
10. Yamamoto-Furusho JK. Clinical epidemiology of ulcerative colitis in Mexico: a single hospital-based study in a 20-year period (1987-2006). *J Clin Gastroenterol.* 2009; 43(3):221-4.
 11. Yamamoto-Furusho, J.K. 2007. Genetic factors associated with the development of inflammatory bowel disease, *World Journal of Gastroenterology*; 13(42): 5594-5597.
 12. Baumgart DC, Carding SR: Inflammatory bowel disease: cause and immunology. *Lancet* 2007; 369:1627-1640.
 13. Ince MN, Elliott DE. Immunologic and molecular mechanisms in inflammatory bowel disease. *Surg Clin North Am.* 2007; 87(3):681-96.
 14. Danese, S Fiocchi C. 2006 Etiopathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases. *World J Gastroenterology*, 12 (30): 4807-4812.
 15. Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature.* 2007; 448(7152):427-34.
 16. Danese S, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmunity Rev.* 2004, 3:394-400.
 17. Hanauer SB: Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflammatory Bowel Disease* 2006; 12 (1): S3-S9.
 18. Lakatos PL, Szamosi T, Lakatos L: Smoking in inflammatory bowel diseases: good, bad or ugly? *World J Gastroenterology*, 2007; 13 (46):6134-6139.
 19. Sykes AP, Brampton C, Klee S, Chander CL, Whelan C, Parsons ME. An investigation into the effect and mechanisms of action of nicotine in inflammatory bowel disease. *Inflamm Res.* 2000; 49(7):311-9.

20. Karba A , Eliakim R: Effect of smoking an inflammatory bowel disease: is it a disease or organ-specific? *World Journal Gastroenterology*. 2007; 13(15):2150-2152.
21. Wild G, Drozdowski L, Tartaglia C et al. Nutritional modulation of the inflammatory response in inflammatory bowel disease –from molecular to the integrative to the clinical *World J Gastroenterology* 2007; 13:1-7.
22. Gassull MA: The role of nutrition in treatment of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004; 20:79-83.
23. Godet PG, May GR, Sutherland LR. Meta-analysis of the role of oral contraceptive agents in inflammatory bowel disease. *Gut* 1995; 37(5):668-73.
24. Davies NM. Toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the large intestine. *Dis Colon Rectum*. 1995; 38(12): 1311-21
25. Fang WF, Broughton A, Jacobson ED. Indomethacin-induced intestinal inflammation. *Am J Dig Dis* 1977; 22(9):749-60.
26. Bjarnason I, Zanelli G, Smith T, Prouse P, Williams P, Smethurst P, et al. Nonsteroidalantiinflammatory drug- induced intestinal inflammation in humans. *Gastroenterology* 1987; 93(3):480-9.
27. Picazo-Ferrera K, Bustamante-Quan Y, Santiago-Hernández J, Yamamoto-Furusho JK. Papel de la apendicetomía en la colitis ulcerosa crónica idiopática (CUCI) en México. *Revista de Gastroenterología de México* 2011; 76(4):316-321.
28. Thayer WR Jr, Chitnavis V. Inflammatory bowel disease. The case for an infectious etiology. *Med Clin North Am* 1994; 78(6):1233-47.
29. Chen W, Li D, Paulus B, Wilson I, Chadwick VS. Detection of *Listeria monocytogenes* by polymerase chain reaction in intestinal mucosal biopsies from

- patients with inflammatory bowel disease and controls. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15(10):1145-50.
30. Wurzelmann JJ, Lyles CM, Sandler RS. Childhood infections and the risk of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1994; 39(3):555-60.
31. Khor B, Gardet A, Ramnik J, Xavier R. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. 2011; 474, *Nature*, 307-317.
32. Laukoetter MG, Nava P, Nusrat A. Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterology*. 2008; 14(3):401-7.
33. Braun, J. y Wei, B. Body Traffic: Ecology, Genetics and Immunity in Inflammatory Bowel Disease. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2007; 401-429.
34. Barrett KE. New ways of thinking about (and teaching about) intestinal epithelial function. *AdvPhysiol Educ.* 2008; 32(1):25-34.
35. Longman RJ, Poulosom R, Corfield AP, et al. Alterations in the composition of the supramucosal defense barrier in relation to disease severity of ulcerative colitis. *J Histochem Cytochem.* 2006; 54:1335–1348.
36. Sheng YH, Hasnain SZ, Florin TH, McGuckin MA. Mucins in inflammatory bowel diseases and colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol.* 2012; 27(1):28-38. doi: 10.1111/j.1440-1746.2011.06909.x.
37. Yamamoto-Furusho JK, Mendivil-Rangel EJ, Fonseca-Camarillo G. Reduced expression of mucin 9 (MUC9) in patients with ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2011 Oct 25. doi: 10.1002/ibd.21920. [Epub ahead of print].
38. Cho J H. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2008; 8: 458-466.

39. Yamamoto-Furusho JK, Uscanga LF, Vargas-Alarcón G, Ruiz-Morales JA, Higuera L, Cutiño T, Rodríguez-Pérez JM, Villarreal-Garza C, Granados J. Clinical and genetic heterogeneity in Mexican patients with ulcerative colitis. *Hum Immunol*. 2003 Jan; 64(1):119-23.
40. Yamamoto-Furusho JK, Uscanga LF, Vargas-Alarcón G, Rodríguez-Pérez JM, Zuñiga J, Granados J. Polymorphisms in the promoter region of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and the HLA-DRB1 locus in Mexican mestizo patients with ulcerative colitis. *Immunol Lett*. 2004 Aug 15; 95(1):31-5.
41. Van Limbergen J, Russell RK, Nimmo ER, Ho GT, Arnott ID, et al. Genetics of the innate immune response in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2007; 13(3):338-55.
42. Shih DQ, Targan SR. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterology*. 2008; 14(3):390-400.
43. Neuman MG. Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *Transl Res*. 2007; 149(4):173-86.
44. Abreu MT, Fukata M. TLR Signaling in the Gut in Health and Disease. *The Journal of Immunology* 2005; (174):4453-4460
45. Sánchez-Muñoz F, Domínguez- López A, Yamamoto-Furusho JK. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterology*. 2008; 14(27):4280-8.
46. Fonseca-Camarillo Gabriela, Jesús K. Yamamoto-Furusho. Interleukins Involved in Inflammatory Bowel Disease as New Therapeutic Targets. *Current Immunology Reviews*, 2013, 9, 86-92.

47. Huibregtse IL, van Lent AU, van Deventer SJ. Immunopathogenesis of IBD: insufficient suppressor function in the gut?. *Gut*. 2007; 56(4):584-92.
48. Zimmerman NP, Vongsa RA, Wendi MK, Dwinwll MB: Chemokines and chemokine receptors in mucosal homeostasis at the intestinal epithelial barrier in inflammatory bowel disease. *Inflam Bowel Dis* 2008; 14: 1000-1011.
49. Yamamoto-Furusho JK1, De-León-Rendón JL, Alvarez-León E, Valdivia-Eziquio M, Obil-Chavarría C, Vargas-Alarcón G. Association of the interleukin 15 (IL-15) gene polymorphisms with the risk of developing ulcerative colitis in Mexican individuals. *MI Biol Rep*. 2014; 41(4):2171-6.
50. Furuzawa-Carballeda J1, Vargas-Rojas MI, Cabral AR. Autoimmune inflammation from the Th17 perspective. *Autoimmun Rev*. 2007; 6(3):169-75.
51. Iwakura Y, Ishigame H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest* 2006; 116: 1218-22.
52. Li MC, He SH. IL-10 and its related cytokines for treatment of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterology*, 2004; 10:620-5.
53. Melgar S, Yeung MM, Bas A, et al. Overexpression of interleukin 10 in mucosal T cells of patients with active ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 2003; 134:127-137.
54. Wirtz S, Neurath MF. Mouse models of inflammatory bowel disease. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59:1073-1083.
55. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, et al. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993; 75:263-274.
56. Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, et al. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N Engl J Med* 2009; 361:2033-45.

57. Rennick DM, Fort MM. Lessons from genetically engineered animal models. XII. IL-10-deficient (IL-10^{-/-}) mice and intestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 278:G829-G833.
58. Commins S, Steinke JW, Borish L. The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121(5): 1108-11.
59. Hsing Chung-Hsi, Hsing-Hui Li, Hsu Yu-Hsiang. The distribution of interleukin-19 in healthy and neoplastic tissue. *Cytokine*. 2008; 44: 221–228.
60. Liao YC, Liang WG, Chen FW, et al. IL-19 induces production of IL-6 and TNF-alpha and results in cell apoptosis through TNF-alpha. *J Immunol*. 2002; 169:4288–4297.
61. Gallagher G, Eskdale J, Jordan W, et al. Human interleukin-19 and its receptor: a potential role in the induction of Th2 responses. *Int Immunopharmacol*. 2004; 4: 615–626.
62. Azuma Taka, Yukiko Matsuo, Kuwamura Mitsuru. Interleukin-19 Protects Mice from Innate-mediated Colonic Inflammation. *Inflamm Bowel Dis*. 2010; 16:1017–1028.
63. Xu W. Interleukin-20. *Int Immunopharmacol* 2004; (5):627-33.
64. Brand S, et al. IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290(4):G827-38.
65. Sugimoto K, Ogawa A, Mizoguchi E, Mizoguchi A. IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2008; 118(2):534-44

66. Andoh A, Shioya M, Nishida A, Bamba S, Tsujikawa T, Kim-Mitsuyama S, Fujiyama Y. Expression of IL-24, an activator of the JAK1/STAT3/SOCS3 cascade, is enhanced in inflammatory bowel disease. *J Immunol.* 2009; 183(1):687-95. 17.
67. Parrish-Novak J, Xu WF, Brender T, Yao L, Jones C, West J, et al. Interleukins 19, 20, and 24 signal through two distinct receptor complexes. *J BiolChem* 2002; 277:47517–23.
68. Riley SA, Mani V, Goodman MJ, et al. Comparison of delayed-release 5-aminosalicylic acid (mesalazine) and sulfasalazine as maintenance treatment for patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology*; 1988; 94:1383-1389.
69. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, et al. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993; 75:263-274.
70. Mizoguchi A, Bhan AK. A case for regulatory B cells. *J Immunol* 2006; 176:705-710.
71. Mizoguchi A, Mizoguchi E, Takedatsu H, et al. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity* 2002; 16:219-230.
72. Ghoreschi K, Thomas P, Breit S, et al. Interleukin-4 therapy of psoriasis induces Th2 responses and improves human autoimmune disease. *Nat Med.* 2003; 9:40–46.
73. Yamamoto-Furusho JK, Álvarez-León E, Fragoso JM, Gozalishvili A, Vallejo M, Vargas-Alarcón G. Protective role of interleukin-19 gene polymorphisms in patients with ulcerative colitis. *Hum Immunol.* 2011 Nov;72(11):1029-32.

74. Yamamoto-Furusho JK, De-León-Rendón JL, de la Torre MG, Alvarez-León E, Vargas-Alarcón G. Genetic polymorphisms of interleukin 20 (IL-20) in patients with ulcerative colitis. *ImmunolLett*. 2013 Jan; 149(1-2):50-3.

XIII. ANEXOS

Tabla 1. Citocinas involucradas en EII

Citocinas y Factores asociadas a la Enfermedad Inflamatoria Intestinal				
Citocina	Enfermedad de Crohn	Colitis Ulcerosa	Fuente Celular	Efectos
IL-1β	↑	↑	Macrófagos, células epiteliales y linfocitos Th1.	Pro inflamatoria, activación de linfocitos T, activación de macrófagos. Comparte efectos con el TNF.
TNF	↑ ↑	↑	Macrófagos, células NK y linfocitos T.	Los macrófagos de la lamina propia son la principal fuente en el intestino; se encuentran especialmente en la sub mucosa perivascular asociada con el reclutamiento de nuevas células inflamatorias,
IL-6	↑	↑	Macrófagos, células endoteliales, Linfocitos T y células dendríticas.	Estimula la cascada de expresión de genes de acción antiapoptótica por vía del reconocimiento del receptor IL6-R y la señalización de Stat-3 en linfocitos T.
IL-12	↑	NORMAL	Macrófagos y células dendríticas	En la enfermedad de Crohn la producción de IL-12 por parte de las células mononucleares de la lamina en las zonas afectadas del intestino regula de manera importante la activación de la respuesta Th1.
IL-18	↑	↑	Macrófagos.	Tiene un papel importante en el mantenimiento de la respuesta Th1; potencia junto con la IL-12 la activación de la respuesta Th1 en la EC y en las zonas histológicamente afectadas en la CUCI.
IL-23	↑	NORMAL	Macrófagos y células dendríticas	Es de la familia de IL-12; actúa de preferencia en los linfocitos T y es crucial en la respuesta Th17. La expresión se correlaciona con el grado de lesión.
IL-27	↑	NORMAL	Macrófagos y células dendríticas.	Actúa en los linfocitos Th0 y los hace más sensibles a la polarización Th1 producida por la IL-12.
INF-γ	↑	↑	Células T (TH1, Linfocitos T CD8+, y células NK).	Es el principal inductor de la actividad bactericida de los macrófagos y estimula la expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clases I y II. Se ha observado que los valores de INF- γ se encuentran elevados en la EII, respecto a los controles sanos.
IL-10	?	?	Macrófagos activados, Linfocitos T r1 y B reguladoras.	Inmunorreguladora. Actúa en las células T mediante la inhibición tanto de la síntesis de citocinas como de moléculas coestimuladoras.
IL-5	NORMAL	↑	Células NK, Th2 y mastocitos activados.	Activador de los eosinófilos. Estimula la proliferación de los linfocitos B y la producción de anticuerpos IgA.
IL-13	NORMAL	↑	Células NK y TH1	Inhibición de la activación de macrófagos.
IL-17	↑	↑	Linfocitos TH17	Modula la respuesta pro inflamatoria.
IL-21	↑	↑	Linfocitos TH17 y fibroblastos.	En el epitelio intestinal mantiene la polarización TH1, induce la producción de INF- γ . Aumenta la proliferación de células NK.
IL-22	↑	↑ ↑	Linfocitos T activadas, células NK activadas, Linfocitos TH17	Induce la restitución del epitelio intestinal por la producción aumentada de moco por las células caliciformes

Tabla 2. Quimiocinas involucradas en EII.

Quimiocina	Gen	Otro nombre	Receptor	Enfermedad Asociada		Célula Blanco
Quimiocina CC						
CCL2	Scya2	MCP1	CCR2	EC+CUCI		Th/mono/baso
CCL3	Scya3	MIP1a	CCR1	EC+CUCI		Tc
CCL4	Scya4	MIP1b	CCR1, CCR5	EC+CUCI		Th
CCL5	Scya5	RANTES	CCR5	EC+CUCI		Th/mono/baso
CCL7	Scya7	MARC, MCP3	CCR2	EC+CUCI		Mono/baso
CCL8	Scya8	MCP2	CCR1, CCR2B, CCR5	EC+CUCI		Neutro/baso/mono
CCL25	Scya2 5	TECK, Ckb15	CCR9	EC+CUCI		Th17
Quimiocinas CXC						
CXCL1	Scyb 1	Gro-a, GRO1, NAP3,KC		CXCR2	EC+CUCI	Neutro/baso
CXCL2	Scyb 2			CXCR2	EC; CUCI?	Neutro/baso
CXCL5	Scyb 5	ENA78		CXCR2	EC+CUCI	Neutro
CXCL6	Scyb 6	GCP2		CXCR1, CXCR2	EC+CUCI	Neutro/baso
CXCL8	Scyb 8	IL8,NAP1,MDNCF,GCP1			EC+CUCI	Neutro/baso
CXCL10	Scyb 10	IP10,CGR2		CXCR3	EC+CUCI	T/mono
CXCL12	Scyb 12	SDF1, PBSF		CXCR4	EC+CUCI	T/B
Quimiocinas CX3C						
CX3CL1	Scyd 1	Fractalina, neurotactina, ABCD3		CX3CR1	EC+CUCI	Mono/CD

Tabla 3: Características de los iniciadores empleados en la PCR en tiempo real.

GEN	GENEBANK	INICIADOR SENTIDO	INICIADOR ANTISENTIDO	SONDAS ROCHE	UPL
IL-10	NM_000572.2	5'cataaattagaggtctccaaaatcg3'	3'aaggggctgggtcagctat5'	Sonda #45	
IL-19	NM_153758.1, NM_013371.2	5'cagagtcacccatgacaactatgat3'	3'cgagctctcccaggatt5'	Sonda # 47	
IL-20	NM_018724.3	5'aagaaggacctccggctct3'	3'tgactcagaatctggctgtatttc5'	Sonda# 69	
IL-22	NM_020525.4	5'caacaggctaagcacatgtca3'	3'actgtgtccttcagcttttgc5'	Sonda# 6	
IL-24	NM_006850.3	5'ctcaggataacatcacgagtgc3'	3'cagggtgtggacaaggtaaca5'	Sonda# 89	
IL-10RA	NM_001558.3	5'gtcttggctcagacgctcat3'	3'tgcttcaaaccacacagacg5'	Sonda# 23	
IL-10RB	NM_000628.3	5'ggctgtgtgcttgagga3'	3'ggtagcattcccaatgctga5'	Sonda# 20	
IL-20RA	NM_014432.2	5'tccatcaacatgaagaatgtcc3'	3'agccatttctttgcccata5'	Sonda# 22	
IL-20RB	NM_144717.2	5'ccccagtttgagttccttgt3'	3'gaataccccactcctcacc5'	Sonda# 25	
GAPDH	NM_0020463	5agccacatcgctcagacac'3'	3'gcccaatacgaccaaattcc'5'	Sonda # 60	

Tabla 4: Características clínicas y demográficas de los pacientes con CUCI.

	Control 18	CUCI remisión 15	CUCI activa 25
Edad promedio	44.30	41.86	39.65
Femenino	8	9	17
Masculino	10	6	8
Curso Clínico			
-Cuadro inicial activo y después inactivo.		9	6
-Actividad intermitente leve <1recaída/año.		6	14
-Actividad intermitente intensa >1rec/año.		--	2
-Actividad continua (refractario a tratamiento).		--	3
Extensión			
Pancolitis		8	16
Distal		7	9
Manifestaciones extraintestinales			
No		11	14
Sí		4	11
Respuesta al tratamiento			
Sí		13	14
No		2	11

IL-10— and IL-20—Expressing Epithelial and Inflammatory Cells are Increased in Patients with Ulcerative Colitis

Gabriela Fonseca-Camarillo ·
Janette Furuzawa-Carballeda ·
Luis Llorente · Jesús K. Yamamoto-Furusho

Received: 4 October 2012 / Accepted: 21 November 2012 / Published online: 4 December 2012
© Springer Science+Business Media New York 2012

Abstract Interleukin (IL)-20, a pro-inflammatory cytokine, is a recently discovered member of the IL-10 family. This cytokine has been described in inflammatory diseases such as psoriasis and asthma. However, IL-20 expression in ulcerative colitis (UC) patients has not been yet described. The aim of this study was to evaluate IL-20 and IL-10 gene and protein expression and their receptors in the mucosa from UC patients. Forty UC patients and 18 non-inflamed controls were studied. IL-10, IL-20, IL-10R1, IL-10R2, IL-20R1 and IL-20R2 gene expression was determined by real time RT-PCR in colonic biopsies. Protein expression was evaluated by immunohistochemistry. Patients in remission had significantly higher IL-10 gene expression in mucosa compared with active patients and controls. Conversely, IL-10R1/B gene expression was decreased in remission compared with active UC patients and controls. IL-20 gene expression was lower in colonic mucosa from UC patients

in remission compared with controls and active patients. IL-20R1/B mRNA expression was higher in remission compared with active UC patients and controls. IHQ analysis showed an increased IL-10—, IL-20—, and IL-20R2—producing cells in active UC patients. IL-10—, IL-20— and IL-20R2—expressing epithelial and inflammatory cells were increased in active UC patients, meanwhile IL-20R1 was up-regulated only on inflammatory infiltrates vs. controls. This is the first depiction of the presence of IL-20 and its receptors in UC. Much remains to be learned however, about the pathogenic mechanisms that lead to IBD. This cytokine/receptor imbalance may be implicated in the pathogenesis of UC.

Keywords Interleukin (IL)-20 · IL-10 · IL-10R1 · IL10R2 · IL-20R1 · IL-20R2 · Ulcerative Colitis

Abbreviations

UC	Ulcerative Colitis
IL-10R	Interleukin 10 Receptor
IL-20R	Interleukin 20 Receptor
RT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
LPS	Lipopolysaccharide
IHQ	Immunohistochemistry

Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD), including Crohn's disease (CD) and Ulcerative Colitis (UC) are chronic inflammatory disorders of the gastrointestinal tract. Although the etiology is not completely understood, initiation and exacerbation of the inflammatory process seem to be due to a massive local mucosal immune response [1, 2].

In 2001, six immune mediators were grouped into the so-called IL-10 family of cytokines (IL-10, IL-19, IL-20, IL-

G. Fonseca-Camarillo
Universidad Nacional Autónoma de México,
Av. Ciudad Universitaria 3000,
C.P. 04360, Coyoacán, Distrito Federal, México

G. Fonseca-Camarillo · J. K. Yamamoto-Furusho
Inflammatory Bowel Disease Clinic, Department of
Gastroenterology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y
Nutrición, Salvador Zubirán,
México D.F, México

J. Furuzawa-Carballeda · L. Llorente
Department of Immunology and Rheumatology, Instituto Nacional
de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán,
México D.F, México

J. K. Yamamoto-Furusho (✉)
IBD Clinic, Department of Gastroenterology, Instituto Nacional
de Ciencias Médicas y Nutrición,
Vasco de Quiroga #15. Col. Sección XVI,
Tlalpan CP 14000, México
e-mail: kazuofurusho@hotmail.com

22, IL-24, and IL-26) based on their similarities with respect to the structure and location of their encoding genes, their primary and secondary protein structures, and the receptor complexes used. Surprisingly, despite all these similarities, IL-10 family members have different biological functions [3].

Evolutionarily, IL-10 family cytokines emerged before the adaptive immune response. These cytokines elicit diverse host defense mechanisms, especially from epithelial cells, during various infections. IL-10 family cytokines are essential for maintaining the integrity and homeostasis of epithelial tissue layers. The members of this family can promote innate immune responses from epithelium to limit the damage caused by viral and bacterial infections. These cytokines can also facilitate the tissue-healing process in injuries caused by infection or inflammation. Finally, IL-10 itself can suppress pro inflammatory responses and limit unnecessary tissue disruptions caused by inflammation. Thus, IL-10 family cytokines have indispensable functions in combating many infectious and inflammatory diseases [4].

IL-20 is a pleiotropic member of the extended IL-10 cytokine family. IL-20 was initially identified in a human keratinocyte library [5]. IL-20 is a pro-inflammatory cytokine and it has a key role in skin diseases, particularly psoriasis, [6] and has been implicated in lupus nephritis, rheumatoid arthritis and atherosclerosis [7–10].

IL-20 is produced in a wide variety of cell types, particularly in lung and skin cells as well as bronchial epithelial cells. The expression analysis of human IL-20 in mononuclear blood cells by quantitative real-time PCR indicated that IL-20 is produced by monocytes early after lipopolysaccharide (LPS) stimulation (2 h) and then rapidly decreases afterward. These interactions suggests that IL-20 might be an early pro-inflammatory cytokine [11]. In addition, expression of IL-20 has been found in cells of the immune system such as monocytes, T cells and maturing dendritic cells [12].

IL-20 was shown to target keratinocytes that express the specific heterodimeric receptor (IL-20R1/IL-20R2). Psoriatic skin was reported to up regulate its expression of both chains of the IL-20 receptor. When IL-20 was overexpressed in transgenic mice, neonatal lethality as well as severe skin abnormalities including hyperkeratosis, hyperproliferation, and aberrant epidermal differentiation were observed [11].

Little is known about the role of IL-10 family cytokines in the inflammatory process of IBD, we hypothesized that the IL-10 family member IL-20 would demonstrate similar biological properties. In this study, we aim to evaluate gene and protein expression of IL-20 and its receptors in the mucosa of UC patients. To the best of our knowledge, this is the first study that explores the gene and protein expression through a quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and immunohistochemistry of IL-10, IL-20 and its receptors in inflamed or non-inflamed colonic mucosa of UC patients.

Materials and Methods

Study Subjects

A total of 40 patients with definitive diagnosis of UC seen at the Inflammatory Bowel Disease Clinic at the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán were included during the period from December 2009 to July 2010. Diagnosis was performed by the presence of: history of diarrhea or blood in stool and macroscopic appearance by colonoscopy and biopsy compatible with UC. The following relevant clinical and demographic information was collected from UC patients. The following relevant medical records: gender, age at diagnosis, familial aggregation, smoking history, previous appendectomy, disease evolution, extension, extraintestinal manifestations, medical or surgical treatment and clinical course of disease. Colonoscopy was performed in order to calculate the Mayo Score Activity Index [6] and take colonic biopsies. The clinical course of disease was defined as: Active then inactive (first episode with activity and then long-term remission for more than 5 years); intermittent activity (2 relapses in a year), or chronic continual activity (>2 relapses or persistent activity despite conventional medical therapy) as previously described [7]. Patients with indeterminate colitis, CD, post-radiation colitis and infectious colitis were excluded.

The control group consisted of healthy individuals (no documented any disease) undergoing to colonoscopy. The principal causes that led to perform endoscopies to healthy controls were screening for colorectal cancer, constipation and bloating. Colonic biopsies samples were obtained through previous signed written informed consent.

Sample Processing and Gene Expression Analysis

All intestinal mucosal biopsies taken from colonoscopy were immediately placed in RNA later (Ambion, Austin, TX, USA) and stored at -70°C until processing. Then total RNA was isolated using High Pure RNA Tissue (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), following the manufacturer's guidelines. Two hundred nanograms of total RNA was reverse-transcribed into cDNA with random hexamer primers (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

The IL-20 gene expression was measured by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). Expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), a housekeeping gene, was analyzed for normalization purposes and quality controls; the primer designs are represented in Table 1.

PCR amplification with duplicate of the above mentioned genes was carried out with 20 ng of cDNA, 200 nM forward and reverse primer, and Taqman Master Mix (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany Roche Diagnostics, Mannheim,

Table I Primers designs

Gene	Genebank	Oligonucleotides	Probe UPL
IL-10	NM_000572.2	CATAAATTAGAGGTCCAAAATCG AAGGGGCTGGGTCAGCTAT	#45
IL-10R1	NM_001558.3	GTCTTGGCTCAGACGCTCAT TGCTTCAAACCACACAGACG	#23
IL-10R2	NM_000628.3	GGTCGTGTGCTTGGAGGA GGTACCATTCCCAATGCTGA	#20
IL-20	NM_018724.3	AAGAAGGACCTCCGGCTCT TGACTCAGAATCTGGC5GTATTTC	#69
IL-20R1	NM_014432.2	TCCATCAACATGAAGAATGTCC AGCCATTCTTTTGCCCATATA	#22
IL-20R2	NM_144717.2	CCCCAGTTTGAGTTCCTTGT GAATACCCCACTCCTCACC	#25
GADPH	NM_002046.3	AGCCACATCGCTCAGACAC GCCCAATACGACCAAATCC	#60

Germany) in a final volume of 10 μ L. PCR reactions were run in a Light Cycler 2.0 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) for 45 cycles, each cycle consisting in denaturation for 15 s at 95 °C, primer annealing for 15 s at 55 °C, and extension for 30 s at 72 °C and cooling 30 s at 40 °C.

The mRNA expression level of each gene was determined in Excel by using the comparative 2-(delta delta Cq) method and normalized to the geometric mean of the stably-expressed reference gene GAPDH.

Immunohistochemistry

Paraffin-embedded-tissue slides were incubated with mouse monoclonal anti-human IL-10 IgG_{2b} antibody, goat polyclonal anti-human IL-20 IgG antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), mouse monoclonal anti-human IL-20R1 IgG and goat polyclonal anti-human IL-20R2 IgG (R&D Systems, Abingdon, U.K.) at 10 μ g/ml. Binding was detected

with biotinylated donkey anti-goat IgG antibody or goat anti-mouse IgG antibody (ABC Staining System, Santa Cruz Biotechnology). To exclude nonspecific staining or endogenous enzymatic activity, a negative control was prepared with normal human serum (diluted 1:100) instead of the primary antibody, and a reaction blank control was prepared with phosphate-buffered saline and egg albumin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). At least two different sections were examined for each biopsy in two fields (X200).

Ethical Considerations

This work was performed according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki. The study was

Table II Clinical and demographic characteristics of Ulcerative Colitis Patients

Characteristics	No. patients
Patients Number Gender (M/F)	14/26
Mean age (years; range)	40 (18–65)
Disease Duration (1–3/>3 years)	10/30
Disease Activity (active/remission)	25/15
Disease Extension: distal colitis/Pancolitis	16/24
Endoscopic Activity (inactive/mild/moderate/severe)	15/5/16/4
Histological Activity (inactive/mild/moderate/severe)	15/5/16/4
Current therapy: 5-aminosalicylate/Corticosteroids	40/5
Extra-intestinal Manifestations (without/arthritis/other)	25/11/6
Healthy control group	
Number of Patients Sex (M/F)	3/15
Mean Age (years; range)	46(19–73)

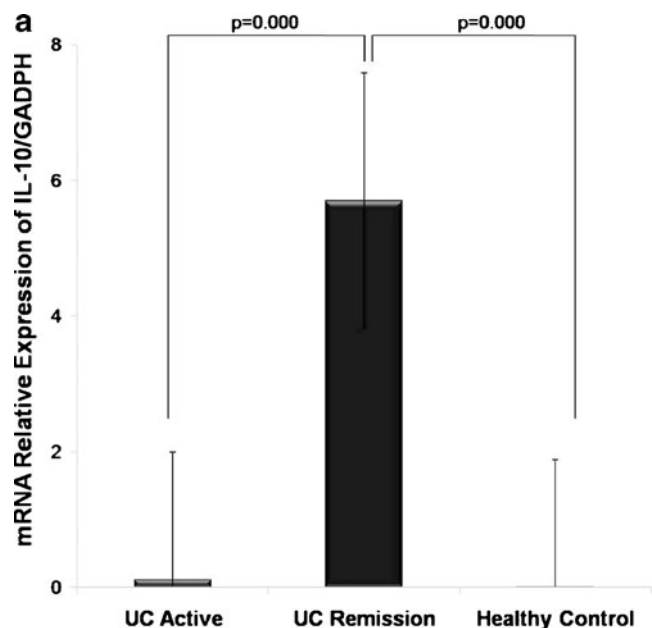
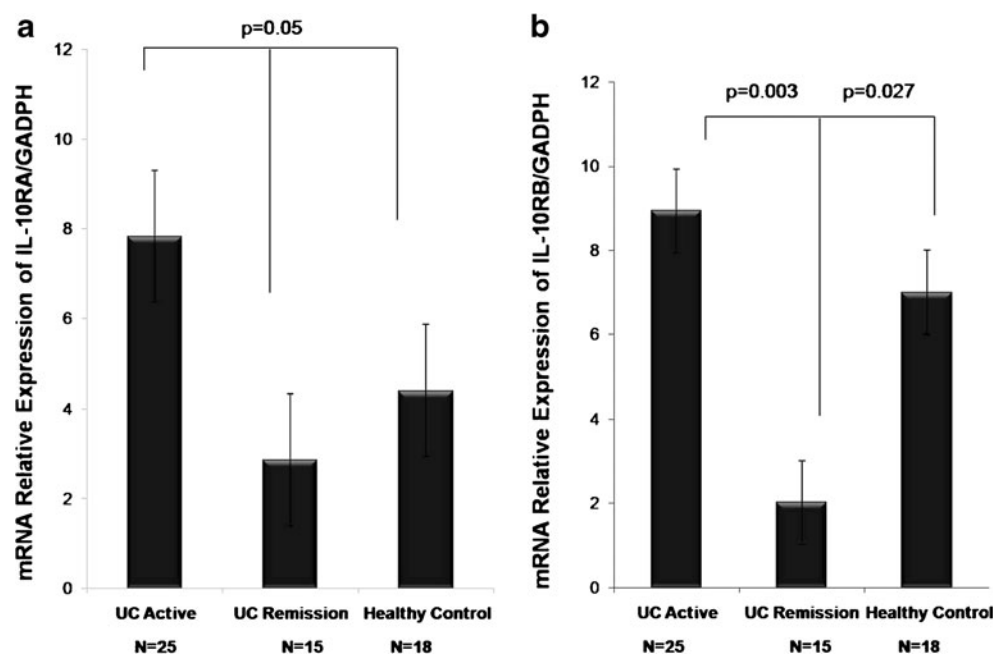
**Fig. 1** IL-10 gene expression in colonic mucosa from UC patients. **a** IL-10 relative gene expression quantified by RT-PCR

Fig. 2 IL-10RA and IL-10RB expression in colonic mucosa from UC patients. **a** IL-10RA relative gene expression. **b** IL-10RB relative gene expression. Results were normalized using GAPDH as housekeeping gene



approved by the ethical committee in our institution and a written informed consent was obtained from all patients.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS version 17 program and SigmaStat3.2 program (Aspire Software International, Leesburg, VA, USA) by the Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks and by Holm-Sidak for all pairwise multiple comparison procedures. Data

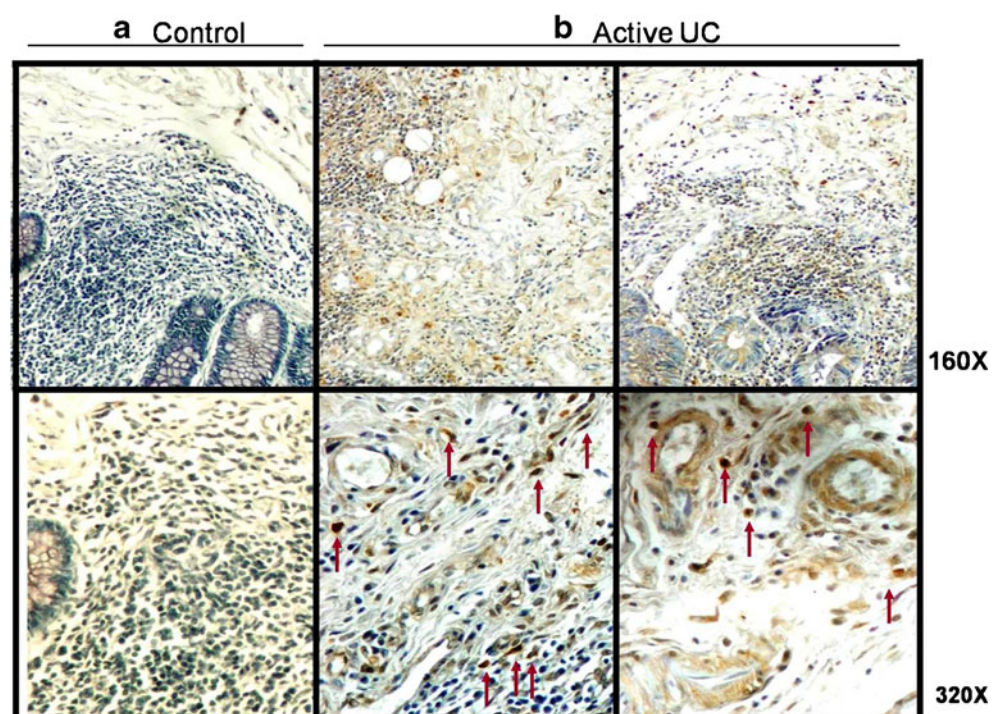
were expressed as the median, range, and mean $\pm$ SE. A P value ≤ 0.05 was considered significant.

Results

Demographic and Clinical Characteristics

Demographic and clinical characteristics of UC patients are described in Table II. A total of 26 female and 14 male UC

Fig. 3 IL-10 protein expression in colonic mucosa from UC patients. Representative immunoperoxidase of IL-10 expression in inflamed colonic tissue from an UC patient (middle and right in upper and lower level panel) and non-inflamed colonic tissue (left upper and lower level panel). Red arrows depict immunoreactive positive cells. Original magnification was 20 $\times$



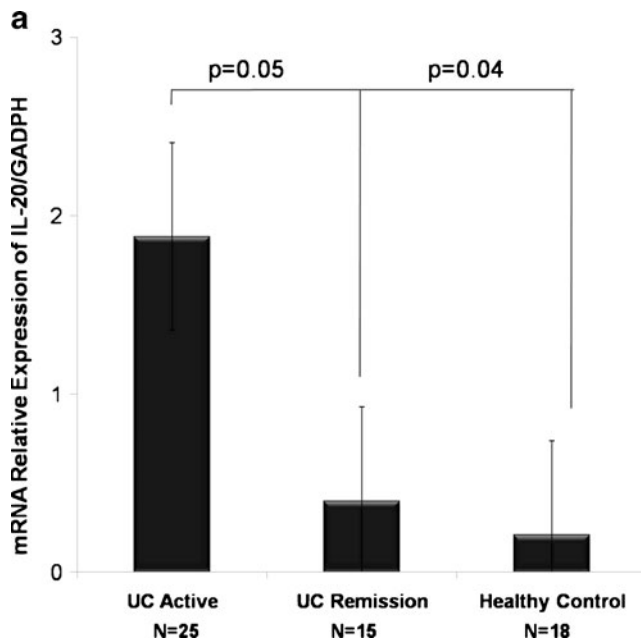


Fig. 4 IL-20 gene expression in colonic mucosa from UC patients. **a** IL-20 relative gene expression quantified by RT-PCR

patients were analyzed. The mean age at diagnosis was 40 ± 2 years. The extent of disease was evaluated using total colonoscopy, and biopsies were taken from different colon segments. The Montreal classification was used to define the extent of UC: 60 % had pancolitis (E3); 37 % had left-sided colitis (E2); and 3 % had proctitis (E1). Regarding the grade of disease activity, 25 had an active disease and 15

were in remission according to Mayo Score. Fifteen patients (37.5 %) showed activity then inactivity, 22 (55 %) intermittent activity and 3 (7.5 %) chronic persistent activity.

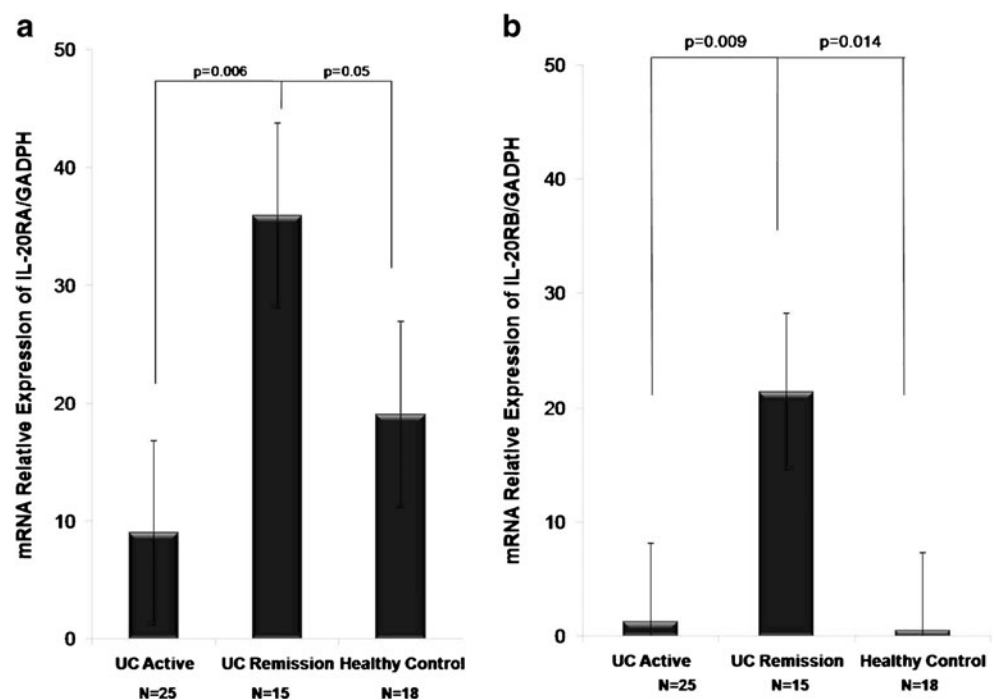
Fifteen UC patients (37.5 %) had extraintestinal manifestations, including: arthropathy (73 %), primary sclerosing cholangitis (13 %), erythema nodosum (6.7 %), sacroiliitis (20 %) and pyoderma gangrenosum (6.7 %). All patients were under sulfasalazine or 5-aminosalicylic acid (5-ASA) treatment; 72 % used oral or systemic glucocorticosteroids; 12 % were taking azathioprine.

IL-10, IL-10R1 and IL-10R2 Expression in Colonic Mucosa from UC patients

In order to determine gene and protein expression in UC patients, mRNA relative expression of IL-10, IL-10R1 and IL-10R2 were quantified and normalized by the GADPH housekeeping gene expression, and IL-10—, IL-10R1— and IL-10R2—producing cells were determined by immunohistochemistry. UC patients in remission had significantly higher IL-10 gene expression compared with active UC patients ($p=0.0001$) and healthy control group ($p=0.0001$; Fig. 1a). IL-10RA and IL-10RB gene expression was lower in remission UC patients ($p=0.05$, $p=0.003$) compared with active UC patients and the healthy control group ($p=0.05$, $p=0.027$; Fig. 2a-b).

On the other hand, the IL-10—producing cells was higher in UC patients than in healthy controls. IL-10 positive cells were localized mainly in inflammatory infiltrates, predominantly mononuclear cells (macrophages and

Fig. 5 IL-20RA and IL-20RB expression in colonic mucosa from UC patients. **a** IL-20RA relative gene expression. **b** IL-20RB relative gene expression. Results were normalized using GADPH as housekeeping gene



lymphocytes), which extended from the serosa to mucosa, being more abundant in epithelium and serosa. IL-10 positive cells were also determined in lamina propria, parenchyma and ulceration sites (Fig. 3). In all biopsies important mucosa destruction was observed. The IL-10 immunoreactive cells was increased from colonic serosa in patients with active UC as compared to the control group; (30 % vs 11 %) ($P=0.001$)

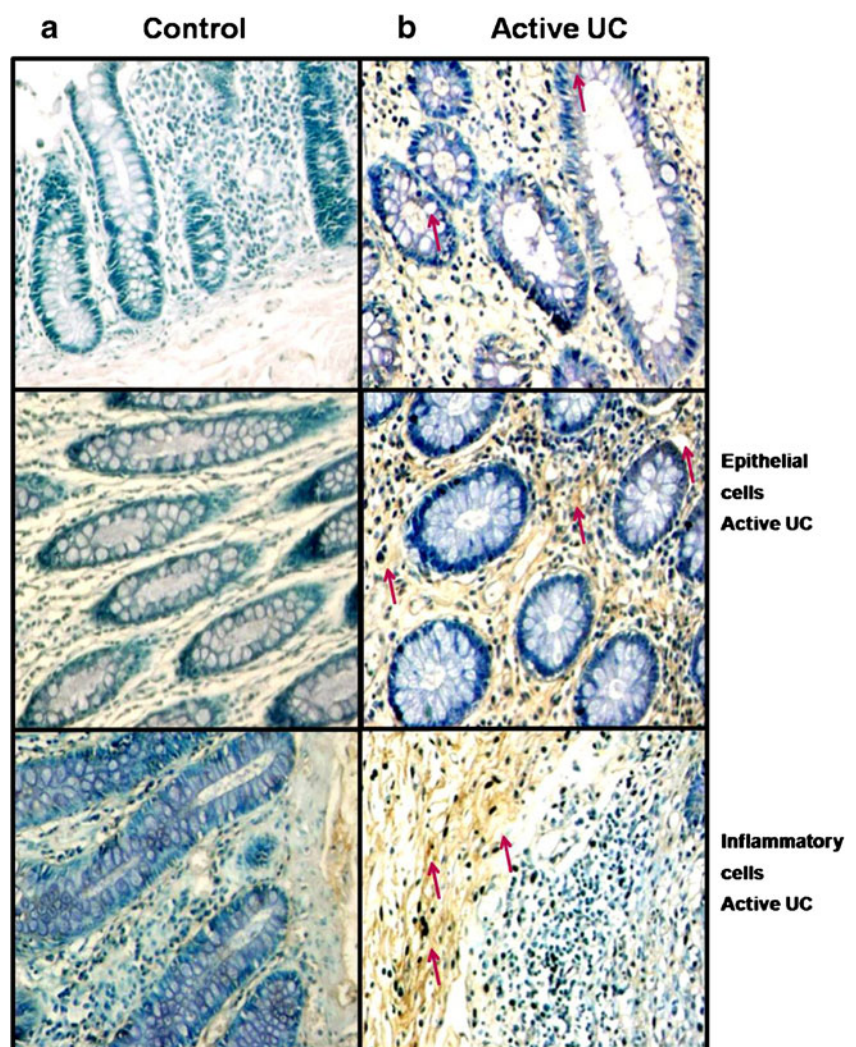
IL-20, IL-20R1 and IL-20R2 Expression in Colonic Mucosa from UC patients

IL-20 mRNA expression was detectable and quantifiable by real time RT-PCR in colonic biopsies from UC patients and healthy controls. IL-20 mRNA expression was conspicuously higher in colonic mucosa from active UC patients when compared with UC patients in remission ($p=0.046$) and healthy control group ($p=0.006$; Fig. 4a). No differences were found between UC in remission and healthy controls.

These results showed that IL-20RA mRNA expression was increased from colonic mucosa in patients with remission UC as compared to the active group; ($P=0.006$) and healthy control group ($p=0.053$). We found a significant differences ($P=0.011$) between active and healthy control group. The IL-20RB mRNA expression was increased from colonic mucosa in patients with remission UC as compared to the active group; ($P=0.009$) and healthy control group ($P=0.014$), as shown in Fig. 5. In addition, the IL-20 cytokine expression no showed differences among treatment groups.

In order to determine *in situ* IL-20 protein expression from UC intestinal biopsies, tissues were immunostained and compared with non-inflamed tissues. The percentage of IL-20 immunoreactive cells was higher in active UC patients than in controls. IL-20 positive cells were localized mainly in mucosa epithelial cells, lamina propria and perivascular inflammatory infiltrates (predominantly in macrophages), but not in goblet cells, crypt lumen or crypt branching, or submucosa (Fig. 6, right panel). The IL-20

Fig. 6 IL-20 protein expression in colonic mucosa from UC patients. Representative immunoperoxidase of IL-20 expression in non-inflamed colonic tissue (a) and epithelial and inflammatory infiltrates from UC colonic tissue (b). Original magnification was 20×



immunoreactive cells was increased in patients with active UC as compared to the control group: mucosa (28 % vs 9 %) ($P=0.002$); submucosa (7 % vs 17 %), ($P=0.003$), muscular (2 % vs 7.5 %) ($P=0.004$) and serosa (7.5 % vs 22 %) ($P<0.001$).

As well, IL-20R1—expressing cells were higher in inflammatory infiltrates from active UC patients compared with healthy controls (Fig. 7, left panel). Moreover, IL-20R2-producing cells were higher in epithelia and inflammatory infiltrates from active UC patients compared with IL-20R1 positive cells in active UC patients and healthy control group (Fig. 7, right panel). In all instances the percentage of IL-20R2 expressing cells was higher than IL-20R1 expressing cells in active UC patients. The IL-20R1 immunoreactive cells was increased in patients with active UC as compared to the control group: mucosa (12%vs 5 %) ($P=0.013$); submucosa (11 % vs 6 %), ($P=0.007$), muscular (4 % vs 1 %) ($P<0.001$) and serosa (13.6 % vs 6 %) ($P=0.028$). The IL-20R2 immunoreactive cells was increased in patients with active UC as compared

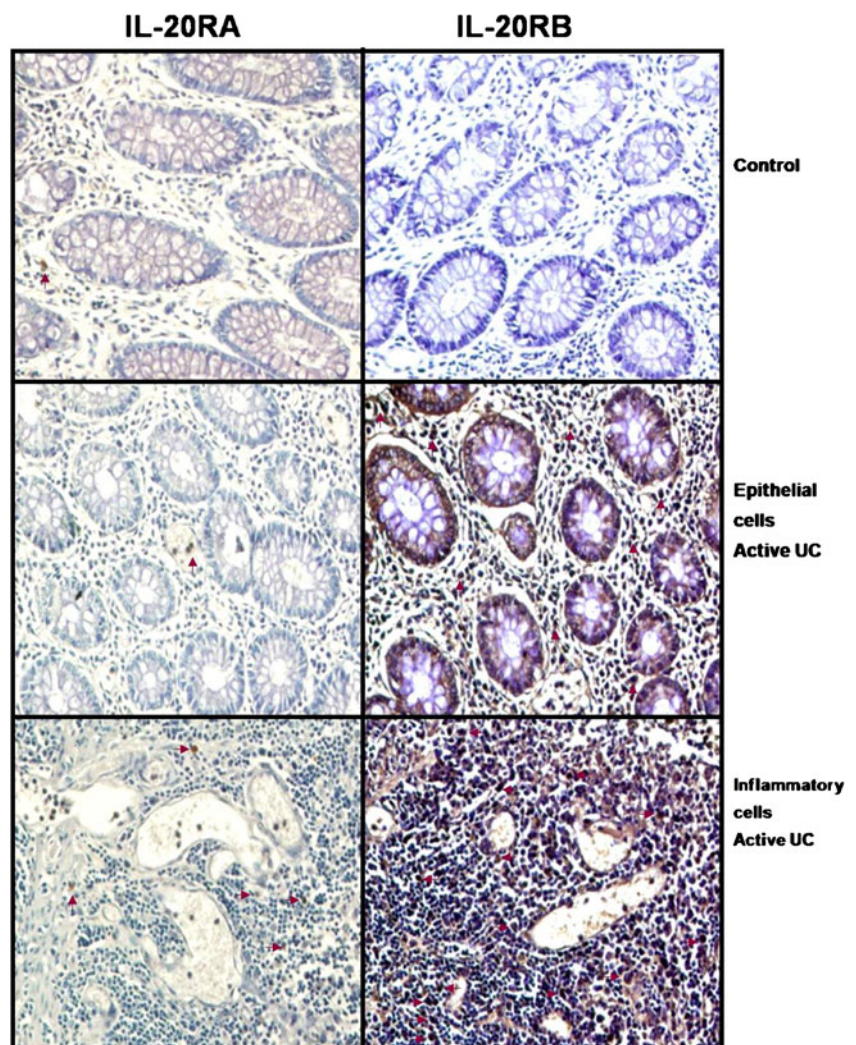
to the control group: mucosa (38 % vs 8 %) ($P<0.001$); submucosa (25 % vs 8 %), ($P<0.001$), muscular (4 % vs 1 %) ($P=0.003$) and serosa (35 % vs 6 %) ($P<0.001$).

Discussion

In this study, we have characterized for the first time the expression of IL-20 and its receptors in patients with Ulcerative Colitis. The overexpression and enhanced production of IL-20 in colonic epithelial cells may play a role in the inflammatory process of Ulcerative Colitis. Because IL-20 is a pro-inflammatory cytokine in inflammatory diseases such as psoriasis and asthma.

Dysregulation of inflammatory cytokine secretion plays a key role in the pathogenesis of autoimmune diseases. IL-10, a principal member of the IL-10 family of molecules, was originally described as a potent anti-inflammatory cytokine with many immune regulatory functions; it is secreted by, and acts on, cells of the immune system. IL-10 binds to two

Fig. 7 IL-20RA and IL-20RB expression in colonic mucosa from UC patients. Representative immunoperoxidase of IL-20RA and IL-20RB expression in inflamed colonic tissue from an UC patient (*middle and lower level panel*) and non-inflamed colonic tissue (*upper level panel*). Red arrows depict immunoreactive positive cells. Original magnification was 20×



receptor chains, IL-10R1 and IL-10R2 [13]. The IL-10 family also includes IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 and IL-26 which, in contrast with IL-10, have more tissue-specific functions. Human IL-19, IL-20 and IL-24 cytokines (IL-20 subfamily) primarily act on various epithelial cells and protect these cells from invasion by extracellular pathogens such as bacteria and yeast. In addition, the IL-20 cytokine subfamily enhances tissue remodeling and wound-healing activities, which help to maintain tissue integrity and restore homeostasis of epithelia during infection and inflammatory responses [3].

IL-20 share a common receptor, IL-20R1/IL-20R2 heterodimer (type I receptor), and exhibit pro-inflammatory effects on autoimmune diseases, particularly in psoriasis and rheumatoid arthritis [14]. However IL-20 also binds to the receptor complex composed of IL-22R1/IL-20R2 (type II receptor). IL-20R1/IL-20R2 and IL-22R1/IL-20R2 are expressed in monocytes, keratinocytes, maturing dendritic cells, synovial fibroblasts, mesangial cells and intestine macrophages.

IL-10 cytokine expression was increased in UC patients in remission; however, IL-10R1 and IL-10R2 gene expression was clearly evident in active UC patients and lower in patients in remission. On the other hand, IL-20 cytokine gene and protein expression was increased in UC active patients, while IL-20R1 and IL-20R2 protein expression was increased in UC active patients in inverse correlation with its gene expression.

The mRNA levels of IL-20 not show differences between treatment groups. We should consider the fact that gene expression could be affected by the use of anti-inflammatory drugs. Although 72 % of the included patients were on medication with glucocorticosteroids, statistical analysis did not show an effect.

It is possible to assert that the imbalance in IL-10 and IL-20 and the differential IL-10R1/2 and IL-20R1/2 expression in active and remission UC patients could be seen just as the result of a quite different scenario, i.e., an inflammatory state or a quiescent one. The high levels of IL-20R2 may signify that the IL-20R1/B complex is the main receptor complex used in colonic epithelial cells.

That only IL-20R2 was observed in epithelial inflammatory cells in active UC patients while IL-20R1 was seldom observed, suggests that other cytokines from the IL-20 subfamily are at play in UC, because IL-19 employed the type I receptor while IL-24 employed both type I and II receptors. Indeed, IL-24 and IL-19, has recently been described in UC, the former displaying a pro-inflammatory activity whereas the latter, seems to confer protection [3, 15, 16].

Even though this is a descriptive study, the findings are of interest for, as far as we know, it is the first depiction of the presence of IL-20 and its receptors in UC. Much remains to be learned however, about the pathogenic mechanisms that

lead to IBD. Certainly, a more comprehensive study including all members of the IL-10 cytokine family and its receptors is needed in order to establish the precise immunoregulatory network of these cytokines, e.g. biological activity, downstream signaling pathway, related inflammatory molecules expression and function, in the complex pathogenesis of inflammatory bowel disease.

The difference in expression profiles between IL-10, IL-20, IL-10R1/2 and IL-20R1/2 also provide the potential of identifying diagnostic biomarkers.

Acknowledgments This work was supported by a research grant of CONACYT (Mexico) No.229049. We thank Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México; Av. Ciudad Universitaria 3000, C.P. 04360, Coyoacán, Distrito Federal, México.

Specific Author Contributions GFC participate during the sample processing, performed RT-qPCR analysis for cytokine transcript level quantification, Immunohistochemistry, data analysis and prepared the manuscript. JFC participated in critical reviewing and data discussion and analysis. LL critical reviewing and bibliographic analysis, JK YF designed and provided the research idea, directed, reassessed both clinical and histological diagnostic, and coordinate the manuscript editing.

Competing Interests The authors declared that they have no competing interests.

References

- Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 2002;347:417–29.
- Li MC, He SH. IL-10 and its related cytokines for treatment of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2004;10:620–5.
- Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, et al. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol*. 2011;23:71–109.
- Sabat R. IL-10 family of cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010;21:315–24.
- Blumberg H, Conklin D, Xu WF, et al. Interleukin-20: discovery, receptor identification, and role in epidermal function. *Cell*. 2001;104:9–19.
- Sa SM, Valdez PA, Wu J, et al. The effects of IL-20 subfamily cytokines on reconstituted human epidermis suggest potential roles in cutaneous innate defense and pathogenic adaptive immunity in psoriasis. *J Immunol*. 2007;15:2229–40.
- Kragstrup TW, Otkjaer K, Holm C, et al. The expression of IL-20 and IL-24 and their shared receptors are increased in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis. *Cytokine*. 2008;4:16–23.
- Chen WY, Cheng BC, Jiang MJ, et al. IL-20 is expressed in atherosclerosis plaques and promotes atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:2090–105.
- Li HH, Cheng HH, Sun KH, et al. Interleukin-20 targets renal mesangial cells and is associated with lupus nephritis. *Clin Immunol*. 2008;129:277–85.
- Hsu YH, Chang MS. Interleukin-20 antibody is a potential therapeutic agent for experimental arthritis. *Arthritis Rheum*. 2010;62:3311–21.

11. Rich BE, Kupper TS. Cytokines: IL-20 – a new effector in skin inflammation. *Curr Biol*. 2001;11:531–4.
12. Wolk K, Witte K, Witte E, et al. Maturing dendritic cells are an important source of IL-29 and IL-20 that may cooperatively increase the innate immunity of keratinocytes. *J Leukoc Biol*. 2008;83:1181–93.
13. 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.
14. Wegenka UM. IL-20: biological functions mediated through two types of receptor complexes. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010;21:353–63.
15. Camarillo GF, Furuzawa-Carballeda J, Martínez-Benítez B, et al. Role of the interleukin 24 in patients with ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17:2209–10.
16. Yamamoto-Furusho JK, Miranda-Pérez E, Fonseca-Camarillo G, et al. Colonic epithelial upregulation of Interleukin 22 in patients with ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16:1819–998.

Expression of IL-19 and IL-24 in IBD patients: a cross-sectional study.

Fonseca-Camarillo Gabriela ^{1,2}, Furuzawa-Carballeda Janette ³, Granados Julio ⁴,

Yamamoto-Furuscho Jesús K.¹

1. Inflammatory Bowel Disease Clinic. Department of Gastroenterology. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán. México City, México.
2. Universidad Nacional Autónoma de México; Posgrado Ciencias Biológicas. Av. Ciudad Universitaria 3000, C.P. 04360, Coyoacán. México City, México.
3. Department of Immunology and Rheumatology. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán. México City, México.
4. Department of Transplantation, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. México City, México.

Corresponding author:

Prof. Jesus K Yamamoto-Furuscho M.D, MSc, PhD. Head of Inflammatory Bowel Disease Clinic. Department of Gastroenterology. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1111/cei.12285

Nutrición. Vasco de Quiroga #15. Col. Sección XVI, CP 14000, Mexico City, D.F., Mexico. Phone number: +52 55 55 73 34 18. Fax +52 55 56 55 09 42.

E-mail: kazuofuruscho@hotmail.com

Summary

Interleukin-19 and IL-24 belong to IL-20 subfamily and they are involved in host-defence against bacteria and fungi, tissue remodelling and wound healing. Nevertheless, no previous studies have explored their expression in Mexican Mestizo patients with inflammatory bowel disease (IBD). The aim of the study was to characterize and to enumerate peripheral and tissue IL-19— and IL-24—producing cells as well as gene expression in patients with IBD in regarding to its clinical activity. We studied a total of 77 patients with ulcerative colitis (UC), 36 Crohn's Disease (CD) and 33 patients as control group (without endoscopic evidence of intestinal inflammation). Gene expression was measured by real time polymerase chain reaction (RT-PCR). Protein expression was detected in biopsies by immunohistochemistry and in freshly isolated peripheral blood mononuclear cells by flow cytometry. IL-19 and IL-24 gene expression was significantly elevated in patients with active IBD *versus* inactive disease and non-inflammatory control group ($P<0.05$). However, IL-19— and IL-24—producing cells were only increased in active CD *versus* active UC and non-inflammatory tissues ($P<0.05$). IL-19 was conspicuously produced by circulating B cells and monocytes in patients with inactive disease ($P<0.05$). Conversely, IL-24 was noticeably synthesized by peripheral B cells, CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells and monocytes in patients with active disease. Concluding, IL-19— and IL-24—producing cells in active CD patients were increased compared with active UC and non-inflammatory tissues. These cytokines could significantly shape and

differentiate inflammatory process, severity, and tolerance loss between UC and CD pathophysiology.

Key Words: Interleukin (IL)-19, IL-24, Crohn's Disease, Ulcerative Colitis.

Word Count: 245

Abbreviations: IBD, inflammatory bowel disease; UC, Ulcerative Colitis; CD, Crohn's Disease; IL-19, Interleukin 19; IL-24, Interleukin 24; RT-PCR, Real Time Polymerase Chain Reaction.

Introduction

The two major forms of inflammatory bowel disease (IBD), including ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) [1]. Currently, the pathogenesis of UC and CD is not completely understood. The chronic relapsing inflammation is thought to be the result from a pro-inflammatory microenvironment and an aberrant immune response to intestinal flora in a context of genetic predisposition. The loss of immune tolerance toward the enteric flora is mediated by different molecules. Several proinflammatory and immune-regulatory cytokines are up-regulated in the mucosa of patients with IBD [2]. Nonetheless, differences and similarities in the cytokine profile among UC and CD have not been fully elucidated, *i.e.*, the IL-10 family of cytokines and its involvement in IBD has not been completely understood. IL-10 family consists of nine related molecules with ranging degrees of sequence homology. It includes IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28A, IL-28B and IL-29 which play multiple roles in regulation of inflammation, host-defence mechanisms against bacteria and fungi, antiviral response, tissue remodeling, prevention of tissue damage and wound healing. The currently known facts regarding the effects of IL-10, IL-19, IL-20 and IL-24 play an important role in the pathogenesis of some chronic inflammatory diseases. [3, 4].

IL-19 was discovered in 2000. It has been implicated in some diseases and disorders, such as psoriasis, type-I diabetes, endotoxic shock, periodontal disease, vascular disease and rheumatoid arthritis [5, 6]. The IL-19 is primarily produced by keratinocytes, epithelial cells, myeloid cells, and B-cells [7], and its expression can be induced by lipopolysaccharide (LPS), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), IL-4, IL-6, IL-13, IL-17 and tumour necrosis factor (TNF)- α , while interferon (IFN)- γ

down-regulates its expression. Moreover, epithelial cells produce IL-19 after stimulation with IL-17, IL-22 and IL-1 β [8].

Binding of IL-19 to its heterodimeric receptor complex (IL-20R α /IL-20R β) activates the signal transducers and activators of transcription (STAT) pathways, mainly STAT1 and STAT3 [9]. IL-19 role have been investigated in patients with psoriasis, these patients showed an increase of IL-19 levels in keratinocytes from affected skin, suggesting that IL-19 contributes to the inflammatory response during innate host defence mechanism and plays a role in tissue remodelling and wound healing [10].

IL-19 is capable of promoting Th2 immune polarization through a positive feedback loop [11, 12]. Serum IL-19 levels in asthmatic patients have been found to be twice from healthy control subjects and correlated with higher levels of IL-15 and IL-13 [13].

Nevertheless, recently it has been demonstrated that IL-19 regulates the inflammatory process in acute and chronic conditions as well as induced the mucosa healing of the intestinal epithelium in a mice model of IBD [14]. Besides, IL-19 has been implicated in the induction of endotoxin tolerance that “reprograms” activated macrophages. This prevents from massive release of pro-inflammatory mediators, such as TNF- α and IL-12, which characterises an excessive inflammatory response to infectious agents, leading to septic shock and death [15].

Interleukin 24 (IL-24) was first identified in 1995. Since it was discovered as a tumour suppressor in healthy melanocytes, it was named melanoma differentiation associated gene 7 (MDA-7). This cytokine is synthesised mainly by immune cells, keratinocytes and colonic subepithelial myofibroblasts and acts on non-hematopoietic tissues such as skin,

lung and reproductive tissues [16]. Its expression by human peripheral blood mononuclear cells can be induced by pathogen-associated molecules including phytohaemagglutinin (PHA), LPS, IL-4, and the influenza A virus. In contrast to IL-19, IL-24 is also expressed by T lymphocytes (predominantly Th2) [17]. However, regardless of the co-expression with IL-10 in Th2 cells, T lymphocyte derived IL-24 seems to lack anti-inflammatory or immune-regulatory functions. The major target tissues, based on expression patterns of its receptor, are the skin, gut, lungs and reproductive tissues. IL-24 interacts with two heterodimeric receptor complexes, IL-20R1/IL-20R2 and, preferentially, IL-10R2/IL-22R1. IL-24 binding to these receptors results in the activation of STAT1 and STAT3 signalling pathways. IL-24 acts through its cell-surface receptors as a classical cytokine, and intracellular as a cytotoxic agent, in a non-receptor-mediated-manner. Both these receptors are abundant in several tissues such as those from the reproductive, skin, gut, respiratory system and various glands. Furthermore, human IL-24 induces chemotaxis of CD11b positive myeloid cells [18, 19].

Little is known about the presence of IL-19 and IL-24 cytokines in Mexican mestizo patients with IBD. Thus, the aim of this study was to investigate and to enumerate at peripheral and tissue level the gene expression and the presence of IL-19 and IL-24 proteins in regarding to its clinical activity and compared with patients without endoscopic evidence of intestinal inflammation and/or healthy donors.

Patients and Methods

Study Subjects

The study population consisted of 113 IBD patients (36 CD and 77 UC) were included during the period from December 2009 to July 2010 belonging to the Inflammatory Bowel Disease Clinic at the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, diagnosed based on well-established clinical, endoscopic and histopathological criteria for CD (70.8% male; 30.2 % female, mean age 44 yrs, range: 18-72) and UC (5% male; 95% female, mean age 43 yrs, range: 20-75). The cohort studied also included non-inflammatory control subjects (77% male; 33% female mean age 49 yrs, range: 21-74), who underwent colonoscopy for colon cancer screening, evaluation of suspected irritable bowel syndrome (IBS), polyp screening, or abdominal pain. The study was approved by the ethical committee in our institution, and biopsies were obtained from IBD patients and non-inflammatory control subjects after informed consent. Relevant clinical and demographic information in all IBD patients were collected from medical records: gender, age at diagnosis, previous appendectomy, disease evolution, extension, etc.

An independent GI pathologist reviewed slides and classified IBD histologically as being either active or inactive. Active disease was defined histologically by the presence of neutrophilic inflammation, including cryptitis and crypt abscesses. Uninvolved mucosa was defined as mucosa free of endoscopically and histologically active or chronic inflammation. In inactive disease, chronic inflammation, crypt distortion and/or lymphoid aggregates were common, although there was no neutrophilic inflammation.

Colonoscopy was performed in order to calculate the Mayo Score Activity Index and take colonic biopsies. Disease extension was defined by colonoscopy. The disease activity was

determined by Mayo score and Riley criteria [20] for endoscopic and histological activity respectively. Crohn's disease was diagnosed by clinical, laboratory, endoscopy, radiological and/or histopathological findings [21,22]. The disease activity was determined by Harvey-Bradshaw and Crohn's Disease Activity Index (CDAI).

Acquisition of human ileal and colonic mucosal biopsies ileal and rect-sigmoid pinch biopsies were obtained from IBD patients in areas with active disease or from uninvolved colon. In non-inflammatory control subjects, biopsies were obtained from the ileum and colon.

Exclusion criteria included patients with indeterminate colitis, post-radiation colitis, infectious colitis and others.

Sample Processing and Gene Expression Analysis

The 113 intestinal mucosal biopsies taken from colonoscopy were immediately placed in RNA later (Ambion, Austin, TX, USA) and stored at -70 °C (short-term; <6 months) until used. Then total RNA was isolated using High Pure RNA Tissue (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), following the manufacturer's guidelines. Two hundred nanograms of total RNA was reverse-transcribed into cDNA with random hexamer primers (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

The IL-19 and IL-24 gene expression were measured by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) (*IL19*: Genebank NM_153758.1, Oligonucleotides 3'-CGAGCTCTCCCAGGGATT, 5'-CAGAGTCATCCATGACAACTATGAT, Probe # 74; *IL24*: Genebank NM_006850.3 Oligonucleotides 3'-CAGGGTGTGGACAAGGTAACA, 5'- CTCAGGATAACATCACGAGTGC, Probe # 89). Expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*: Genebank NM_0020463, Oligonucleotides 3'-

AGCCACATCGCTCAGACAC, 5'-GCCCAATACGACCAAATCC, Probe # 60), a housekeeping gene was analysed for normalization purposes and quality controls.

PCR amplification of the above mentioned genes was carried out with 20 ng of cDNA, 200 nM forward, reverse primer, and Taqman Master Mix (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) in a final volume of 10 µl. PCR reactions were run in a Light Cycler 2.0 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) for 45 cycles, each cycle consist in denaturation for 15 seconds at 95°, primer annealing for 15 seconds at 55°, and extension for 30 seconds at 72°C and cooling 30 seconds at 40°C.

Immunohistochemistry

In order to determine IL-19— and IL-24—expressing cells, 4-µm-thick sections of available formalin-fixed paraffin embedded tissue were placed on positively charged slides. Sections were deparaffinised and rehydrated through a series of xylene and graded alcohols. Endogenous peroxidase was blocked with 3% H₂O₂ for 20 min. A 3% normal serum was employed for 30 min as protein blocker. Tissues were incubated for 18 h at 4°C with goat polyclonal anti-human IL-19 antibody (SIGMA-Aldrich, St. Louis, MO, USA) or mouse monoclonal anti-human IL-24 antibody (R&D Systems Inc., MN, USA) at 10 µg/ml. Binding was detected by incubating sections for 60 min at room temperature with biotinylated donkey anti-goat IgG antibody or goat anti-mouse IgG antibody (ABC Staining System; Santa Cruz Biotechnology). Slides were incubated with horseradish peroxidase (HRP)–streptavidin for 45 min, followed by incubation with the peroxidase substrate 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Sigma-Aldrich) for 10 min. The sections were counterstained with haematoxylin, dehydrated with alcohol and xylene and mounted in

resin. Negative control staining was performed with normal human serum diluted 1:100, instead of primary antibody. The reactive blank was incubated with phosphate buffer saline–egg albumin (SIGMA-Aldrich) instead of the primary antibody. Both controls excluded non-specific staining or endogenous enzymatic activities. At least two different sections and two fields of mucosa, submucosa, muscular and adventitia were examined for each biopsy.

Peripheral blood cell isolation

Fifteen ml sample of venous blood was obtained from each subject. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by gradient centrifugation on Lymphoprep (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway).

Flow cytometry

To determine IL-19– and IL-24–expressing cells, PBMCs were labelled with an anti-human CD14-PE and CD4-PECy5; CD14-PE and CD8-PECy5 or CD80-PE and CD19-Cy monoclonal antibodies (BD Biosciences, San José, CA) in separated tubes at room temperature in the dark for 20 min at 37°C. Cells were washed and permeabilised with 200 µl of cytofix/cytoperm solution (BD Biosciences) at 4°C for 20 min. After two washes with permwash solution (BD Biosciences), PBMCs were stained with a goat anti-human IL-19 (SIGMA-Aldrich) or mouse monoclonal anti-human IL-24 antibody (R&D Systems Inc.) for 30 min at 4°C in the dark. Then, cells were stained with FITC-labelled-rabbit anti-goat antibody or FITC-conjugated-goat anti-mouse antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., PA, USA) during 15 min at 4°C in the dark. After three washes with permwash solution, PBMCs subsets were analysed by flow cytometry with a FACScan. As

control of FITC-labelled-rabbit anti-goat and FITC-conjugated-goat anti-mouse antibody specificity staining, PBMCs were incubated with surface antibodies and FITC-labelled-rabbit anti-goat and FITC-conjugated-goat anti-mouse antibody in the absence of goat anti-human IL-19 or mouse anti-human IL-24 antibodies. An electronic gate was made for each and every one of the surface markers employed (Fig. 4e-h). A total of 100,000 to 500,000 events were recorded for each sample and analysed with the CellQuestPro software (BD Biosciences). Results are expressed as the relative percentage of $CD4^+/CD14^-/IL-19^{+/-}$, $CD8^+/CD14^-/IL-19^{+/-}$, $CD4^+/CD8^+/CD14^+/IL-19^{+/-}$, $CD19^+/CD80^+/IL-19^{+/-}$ -expressing cells in each gate and $CD4^+/CD14^-/IL-24^{+/-}$, $CD8^+/CD14^-/IL-24^{+/-}$, $CD4^+/CD8^+/CD14^+/IL-24^{+/-}$, $CD19^+/CD80^+/IL-24^{+/-}$ -expressing cells in each gate (see below).

As isotype controls, IgG1-FITC/IgG1-PE/CD45-PeCy mouse IgG1,k (BD Tritest™, BD Biosciences) (Fig. 4b-d) were used to set the threshold and gates in the cytometer.

In order to avoid a false positive and also for setting compensation for multi-colour flow cytometric analysis, we performed instrument calibration/standardization procedures each day according to established protocols of our laboratory. Briefly, we run an unstained (autofluorescence control) and permeabilised PBMCs sample (Fig. 4a). Autofluorescence control (unstained cells) was compared with single stained cell positive controls to confirm that the stained cells were on scale for each parameter. Besides, BD CaliBRITE™ 3 beads were used to adjust instrument settings, set fluorescence compensation, and check instrument sensitivity (BD CaliBRITE™, BD Bioscience). Fluorescence minus one (FMO) controls were stained in parallel using the panel of antibodies with sequential omission of one antibody, with the exception of the anti-Foxp3 antibody, which was replaced by an isotype control rather than simply omitted.

Ethical considerations

This work was performed according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki. The study was approved by the ethical committee in our institution and a written informed consent was obtained from all patients.

Statistical Analysis

Sample size has not been determined for this study because it was merely observational.

Statistical analysis was done using the SigmaStat11.2 program (Aspire Software International, Leesburg, VA; USA) by the Kruskal-Wallis. One Way Analysis of Variance on Ranks by Holm-Sidak Method was performed for all pair wise multiple comparison procedures. Data were expressed as the median, range and mean $\pm$ standard deviation (SD)/Standard Error of the mean (SEM). The *P*-values smaller than or equal to 0.05 were considered as significant. This study conforms to STROBE statement along with references to STROBE and the broader EQUATOR guidelines [23].

Results

Demographic and clinical characteristics

A total of 53 females and 60 males' patients with IBD were analysed. The mean age at diagnosis was 40 ± 2 years. The extent of disease was evaluated by using total colonoscopy and biopsies were taken from different segments of intestine in all cases. The demographic and clinical characteristics of the IBD patients and controls are shown in Tables 1 and 2.

IL-19 and IL-24 mRNA expression is increased in Colonic Mucosa from active IBD patients.

Interleukin-19 and IL-24 mRNAs were detected and quantitated by RT-qPCR in colonic biopsies from UC patients, CD patients and non-inflammatory control tissues. Results showed that IL-19 mRNA expression was increased in colonic mucosa from patients with active UC when compared with non-inflammatory control group (Fig. 1a, $P < 0.05$). We also determined a significant difference among active CD *versus* non-inflammatory control tissues (Fig. 1a, $P < 0.001$). Lastly, higher levels of IL-19 mRNA were detected in active CD compared with inactive CD (Fig. 1a, $P < 0.001$). The IL-19 expression was significantly associated with a mild clinical course of UC characterised by one relapse within a year ($P = 0.03$, $r^2 = 0.585$). No significant differences were found in relation to IL-19 gene expression and other demographic and clinical characteristics such as age at diagnosis, gender, and extent of disease, extra intestinal manifestations, medical treatment and the need of surgery.

IL-24 mRNA expression were clearly detected in the samples from active and inactive IBD patients compared with non-inflammatory control tissues ($P < 0.05$, Fig. 1b). Analysis of

the whole samples showed that IL-24 mRNA levels were higher in rectal mucosa from patients with active UC when compared with inactive UC ($P < 0.05$, Fig. 1b). An increased of IL-24 mRNA expression was determined in active CD patients *versus* inactive CD patients ($P < 0.001$, Fig. 1b).

IL-19 and IL-24 protein expression in biopsies from active IBD patients.

In order to determine *in situ* IL-19 and IL-24 protein expression in intestinal biopsies from active UC and active CD patients, tissues were immunostained and compared with non-inflammatory control tissue. The percentage of IL-19 and IL-24 immunoreactive cells was higher in active CD compared with UC patients and non-inflammatory control tissues. IL-19-producing cells were found mainly in mucosa, submucosa, adventitia and perivascular inflammatory infiltrates. IL-19 was expressed largely by myeloid cells, epithelial cells, fibroblasts, endothelial cells and lymphocytes, according to morphological identification (Fig. 2a,b).

In the same vein, IL-24 protein expression from intestinal biopsies from active CD patients was plentiful compared with active UC patients and non-inflammatory colonic tissue. IL-24-producing cells were localised mainly in mucosa, submucosa, adventitia and perivascular inflammatory infiltrates. Morphologically it was determined that IL-24 was produced by lymphocytes, monocytes/macrophages, fibroblasts and endothelial cells (Fig. 3a,b).

IL-19-expressing peripheral cells in patients with ulcerative colitis or Crohn's disease

Dysregulation of IL-20 subfamily cytokines results in inflammation and autoimmune disease. In order to determine the different subpopulations and frequency of circulating IL-

IL-19⁺-producing cells, CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, CD14⁺ monocytes and CD19⁺ B cells were phenotyped (Fig. 4e-l).

Therefore, in active UC and CD patients relative percentage of IL-19⁺-producing CD4 T cells, IL-19⁺-producing CD8 T cells, active B cells and monocytes was decreased compared with relative percentage cells of healthy donors ($P<0.05$, Fig. 5). Interestingly, in remission CD patient cell percentage of CD4 T cells, B cells and monocytes reached similar proportions to those found in healthy donors with exception of CD8 T cells, (Fig. 5). Meanwhile IL-19-expressing cells from inactive UC patients had a statistically significant increase compared with active disease ($P<0.05$, Fig. 5). Nonetheless, cell frequency was lower compared with healthy donors ($P<0.05$, Fig. 5). It is important to highlight, that inactive

CD patients had higher levels of IL-19-producing B cells and monocytes compared with inactive UC patients ($P<0.001$).

Frequency of IL-24 cells circulating in patients with ulcerative colitis or Crohn's Disease

Interleukin-24 or MDA-7 regulates cell survival and proliferation by inducing rapid activation of STAT-1 and STAT-3. It has important roles in wound healing, psoriasis and cancer. For these reasons, IL-24-producing cell subpopulations were immunophenotyped and peripheral cell frequency was determined.

IL-24-producing CD8 T cells, CD19 B cells and CD14 monocytes frequency was conspicuously increased in UC and CD patients with clinical activity compared with inactive UC and CD patients and healthy donors ($P<0.05$, Fig. 5). On the other hand,

peripheral cell frequency of CD4 and CD8 T cells, monocytes and B cells from inactive UC and inactive CD patients was lower compared with healthy donors and patients with clinically active disease ($P<0.05$, Fig. 5). It is noteworthy, that CD patient clinically active or inactive had higher levels IL-24—expressing cells compared with UC patients clinically active or inactive, respectively.

4. DISCUSSION

The IL-10 cytokine family has nine members, four of which are located in the *IL10* cluster on chromosome 1q32. These cytokines are the immune regulatory cytokine IL-10 itself, and the IL-20 subfamily members IL-19, IL-20, and IL-24 [24]. IL-10 initiates innate and adaptive immune response and limits pro-inflammatory responses in order to prevent tissue damage. The IL-20 subfamily members are involved in host defence mechanisms, particularly from epithelial cells and seem essential for tissue integrity. Dysregulation of IL-10 family cytokines results in inflammation and autoimmune disease. Azuma et al., have demonstrated that IL-19 is a negative regulator of TLR signalling, particularly controlling cytokine in macrophages, that it may play a function in endotoxin tolerance, and that IL-19^{-/-} mice increases susceptibility to DSS-induced colitis, resulting in severe weight loss as well as death [14,16]. These observations show that IL-19 has a crucial negative regulatory in the inflammatory process, during innate response to pathogenic microbial stimuli, as well as induces mucosa healing in IBD intestinal animal models [15]. On the other hand, it has been demonstrated that IL-19 is related to development of Th2 responses in the pathogenesis of psoriasis [12,13].

IL-24 has also been demonstrated to play a role in the pathogenesis of IBD. IL-24 mRNA expression is significantly elevated in active lesions from patients with UC and CD. Furthermore, IL-24 derived from human colonic subepithelial myofibroblasts acts on colonic epithelial cells to elicit JAK1/STAT-3 activation and the expression of SOCS3 and membrane-bound mucins (MUC1, MUC3 and MUC4). Thus, properties of IL-24 suggest that it mainly play a protective and suppressive role on mucosal inflammation in IBD mediating the innate immune response [17].

This is the first study to our knowledge in Mexican Mestizo patients with inflammatory bowel disease (IBD) where IL-19 and IL-24 were evaluated at gene and protein expression level in tissue and peripheral cells in regarding to its clinical activity. Thus, we found an increase of IL-19 and IL-24 mRNA levels in active UC and CD patients compared with healthy donors as previously described [13,16]. The mRNA levels of IL-19 and IL-24 not show differences between treatment groups. Nonetheless, percentage of IL-19 and IL-24 immunoreactive cells in UC patients was akin compared with non-inflammatory tissues. Meanwhile, IL-19— and IL-24—producing cells in CD patients were conspicuously increased in colonic mucosa. We suggest that the increase of IL-19 and IL-24 in active CD patients could be a compensatory mechanism in the anti-inflammatory response in order to regulate the acute inflammatory process. The overexpression of IL-19/IL-24 is regarding to less severity disease in Mexican mestizo CD patients compared with UC patients.

IL-19 expression was significantly associated with a mild clinical course of UC characterised by one relapse within a year ($P = 0.03$) suggesting a protective role of IL-19 in patients with UC due to its anti-inflammatory activity. No significant differences we found in relation to IL-19 gene expression and other demographic and clinical characteristics.

We also identified the different subpopulations and frequency of circulating IL-19⁺—producing cells, CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, CD14⁺ monocytes and CD19⁺ B cells and the results show that the relative percentage of CD8⁺/CD14⁻/IL-19⁺ T cells, CD19⁺/CD80⁺/IL-19⁺ active B cells and CD14⁺/CD4⁻/CD8⁻/IL-19⁺ monocytes was

remarkably decrease in active UC and active CD patients compared with inactive disease and healthy controls. It is not preposterous to suggest that IL-19 may act at local level and its regulation and synthesis depends on tissue cell activation and cell migration (IL-19—producing B cells, CD8⁺ T cells and CD14⁺ monocytes) from periphery into the tissue, the latter correlates with the decrease of circulating IL-19⁺ cells. Meanwhile, IL-24 could act at local and systemic level in regarding to disease activity, as suggest the conspicuous increase of circulating and tissue IL-24—producing cells.

It is important to highlight, that IL-19 and IL-24 suggest a role as a cytokine in tissue repair processes rather than inflammation.

A better understanding of the mediators involved in intestinal inflammation will open new lines of research based on manipulation of the immune response for therapeutic purposes, such as administration of IL-10 (anti-inflammatory cytokine).

Up to date, there are no studies related to the clinical efficacy of recombinant IL-19 or IL-24 in IBD. Nonetheless, basic research and data obtained from animal models suggest that these cytokines could be therapeutically useful for down-regulation of IBD inflammation as previously report in IBD, atherosclerosis and cancer [14,16,17,30,31]. Azuma et al., have been shown that IL-19-deficient mice are more susceptible to experimental acute colitis induced by DSS, and this increased susceptibility is correlated with the accumulation of macrophages and the increased production of IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-12, and TNF- α . The finding that IL-19 drives pathogenic innate immune responses in the colon suggests that the selective targeting of IL-19 may be an effective therapeutic approach in the treatment of human IBD [14,16]. In addition, there are other works concerning to IL-24 capability to

Accepted Article

suppress multiple signaling pathways, such as Src kinase in angiogenesis and up-regulate lysosomal proteases in autophagy and caspases 3 and 9 in apoptosis [31]. It is important to highlight, that IL-24 receptors (IL-22R1, IL-20R1, and IL-20R2) are major expressed in human epithelial colonic mucosa. These suggest that IL-24 is involved in innate immune response, due to IL-24-induce selective activation of STAT-3 in colonic epithelial cells, but not in acquired immune cells. Moreover, it has been demonstrated that, IL-24 stimulates MUC gene expression via JAK/STAT-3 activation, contributing to protective role in the mucosa from IBD patients [17].

Even though this is a descriptive study, the findings are of interest for, as far as we know, it is the first depiction of the presence of IL-19 and IL-24 in IBD. Additional studies about IL-19 and IL-24 in the gut mucosal immune response and epithelial restitution can begin to support the immunoregulatory role of interleukin 10 family in patients with inflammatory bowel disease.

Competing interests

The authors declared that they have no competing interests.

Acknowledgments

This work was supported by a research grant of CONACYT (Mexico) No.229049. We thank Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México; Av. Ciudad Universitaria 3000, C.P. 04360, Coyoacán, Distrito Federal, México.

REFERENCES

1. Podolsky, D. K. Inflammatory Bowel Disease. *N England J Med.* 2002; **347**: 417-429.
2. Fonseca-Camarillo Gabriela, Yamamoto-Furusho Jesús Kazuo. Interleukins Involved in Inflammatory Bowel Disease as New Therapeutic Targets. *Current Immunology Reviews*, 2013, 9, 86-92
3. Commins S, Steinke JW, Borish L. The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29. *J Allergy Clin Immunol* 2008; **121**:1108-1111.
4. Sabat R. IL-10 family of cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010; **21**:315-324.
5. Gallagher G. Interleukin-19: multiple roles in immune regulation and disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010; **21**:345-352.
6. Leng RX, Pan HF, Tao JH, Ye DQ. IL-19, IL-20 and IL-24: potential therapeutic targets for autoimmune diseases. *Expert Opin Ther Targets* 2011; **15**:119-126.
7. Gallagher G, Dickensheets H, Eskdale J *et al.* Cloning, expression and initial characterization of interleukin-19 (IL-19), a novel homologue of human interleukin-10 (IL-10). *Genes Immun* 2000; **1**:442–450.
8. Liao YC, Liang WG, Chen FW, *et al.* IL-19 induces production of IL-6 and TNF-alpha and results in cell apoptosis through TNF-alpha. *J Immunol* 2002; **169**:4288-4297.
9. Parrish N J, Xu W, Brender *et al.* Interleukins 19, 20, and 24 signal through two distinct receptor complexes. Differences in receptor-ligand interactions mediate unique biological functions. *J Biol Chem* 2002; **277**:47517-47523.

- Accepted Article
10. Wolk K, Witte E, Warszawska K, *et al.* The Th17 cytokine IL-22 induces IL-20 production in keratinocytes: a novel immunological cascade with potential relevance in psoriasis. *Eur J Immunol* 2009; **39**:3570-3581.
 11. Liao SC, Cheng YC, Wang YC, *et al.* IL-19 induced Th2 cytokines and was up-regulated in asthma patients. *J Immunol* 2004; **173**:6712-6718.
 12. Gallagher G, Eksdale J, Jordan W, *et al.* Human interleukin-19 and its receptor: a potential role in the induction of Th2 responses. *Int Immunopharmacol* 2004; **4**:615-626.
 13. Ghoreschi K, Thomas P, Breit S, *et al.* Interleukin-4 therapy of psoriasis induces Th2 responses and improves human autoimmune disease. *Nat Med* 2003; **9**:40–46.
 14. Azuma, Yukiko, Kuwamura, *et al.* Interleukin-19 Protects Mice from Innate-mediated Colonic Inflammation. *Inflamm Bowel Dis.* 2010; **16**:1017–1028.
 15. Hsing CH, Li HH, Hsu YH, *et al.* The distribution of interleukin-19 in healthy and neoplastic tissue. *Cytokine* 2008; **44**:221-8.
 16. Azuma YT, Matsuo Y, Nakajima H. Interleukin-19 is a negative regulator of innate immunity and critical for colonic protection. *J Pharmacol Sci* 2011; **115**:105-111.
 17. Andoh A, Shioya M, Nishida A, Bamba S, Tsujikawa T, Kim-Mitsuyama S, Fujiyama Y. Expression of IL-24, an activator of the JAK1/STAT3/SOCS3 cascade, is enhanced in inflammatory bowel disease. *J Immunol*, 2009; **183**:687-695.
 18. Emdad L, Lebedeva IV, Su VV, Gupta M, Sauane M, Dash R, *et al.* Historical perspective and recent insights into our understanding of the molecular and biochemical basis of the antitumor properties of MDA-7/IL-24. *Cancer Biol Ther* 2009; **8**:391-400.

19. Sahoo A, Im SH. Molecular mechanisms governing IL-24 gene expression. *Immune Net* 2012; **12**:1-7.
20. Riley SA, Mani V, Goodman MJ, Herd ME, Dutt S, Turnberg LA. Comparison of delayed release 5 aminosalicylic acid (mesalazine) and sulphasalazine in the treatment of mild to moderate ulcerative colitis relapse. *Gut* 1988, **29**(5):669-674.
21. Schroeder KW, Tremaine WJ, Ilstrup DM. Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study. *N Engl J Med* 1987; **317**:1625-1629.
22. Henriksen M, Jahnsen J, Lygren I, *et al.* Ulcerative colitis and clinical course: results of a 5-year population-based follow-up study (the IBSEN study). *Inflamm Bowel Dis* 2006; **12**: 543-550.
23. Simera I, Moher D, Hoey J, Schulz KF, Altman DG. A catalogue of reporting guidelines for health research. *Eur J Clin Invest* 2010; **40**:35-53.
24. Fickenscher H, Hor S, Kupers H, *et al.* The interleukin-10 family of cytokines. *Trends Immunol* 2002; **23**:89–96.
25. Lee E, Cardinale I, Wang F, *et al.* Interleukin- 20 is up-regulated in psoriasis and responds to conventional and novel biologic therapy. *J Invest Dermatol* 2003; **121**:0664
26. Pestka S, Krause CD, Sarkar D, *et al.* Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol* 2004; **22**:929–979.
27. Kotenko SV. The family of IL-10-related cytokines and their receptors: related, but to what extent? *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; **13**:223–240.
28. Conti P, Kempuraj D, Frydas S, *et al.* IL-10 subfamily members: IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 and IL-26. *Immunol Lett* 2003; **88**:171–174.

- Accepted Article
29. Hsing Ch-H, Li H-H, Hsu Yu-Hsiang. The distribution of interleukin-19 in healthy and neoplastic tissue. *Cytokine* 2008; **44**: 221–228.
 30. Ellison S, Gabunia K, Kelemen SE, *et al.* Attenuation of experimental atherosclerosis by interleukin-19. *Ather Thromb Vasc Biol* 2013; **33**: 2316-2324.
 31. Panneerselvam J, Munshi A, Ramers R. Molecular targets and signaling pathways regulated by interleukin (IL)- 24 in mediating its antitumor activities. *J Mol Signal* 2013; **8**: 15.

TABLES

Table 1 Demographic and Clinical Characteristics of Ulcerative Colitis and Crohn's disease

Patients included in Gene and Protein Expression Analysis

	Non- inflammatory control subjects (n=23)	Active UC patients (n=35)	Inactive UC patients (n=18)	Active CD patients (n=11)	Inactive CD patients (n=15)
Variable					
<u>Age, years</u>					
Mean ± SD	49±16	39±11.5	47±15	40±2	37±13.9
Median	50·0	38·0	42·0	38·0	30·0
Range	21—74	20—60	28—75	18—42	28—53
<u>Sex,</u>					
female / male	12 / 11	18 / 17	12 / 6	3 / 8	4 / 11
<u>Disease</u>					
<u>Duration, years</u>					
<3		13%	20%	0	0%
>3		87%	80%	100%	100%
<u>Treatment</u>					
Mesalazine		31	16	0	0
Azathioprine		7	7	10	13
Prednisone		4	4	5	9
Azulfidine		0	0	4	3
Mercaptopurine		0	0	8	8

**Extra-intestinal
manifestations**

Absent	28	14	11	15
Present	7	4	0	0

CD: Crohn's Disease patient group; UC: Ulcerative colitis patient group. NA: Not applicable

Table 2 Demographic and Clinical Characteristics of Ulcerative Colitis and Crohn's disease

Patients included in Flow Cytometry Analysis

	Healthy donors (n=14)	Active UC patients (n=12)	Inactive UC patients (n=12)	Active CD patients (n=5)	Inactive CD patients (n=5)
<u>Variable</u>					
<u>Age, years</u>					
Mean ± SD	47·0±17·1	37·3±9·5	40·3±12·1	52·4±21·2	47·5 ±17·1
Median	36·0	39·0	40·0	58·0	36·0
Range	33—69	21—49	23—63	22—72	33—69
<u>Sex,</u>					
female / male	7 / 7	7 / 5	5 / 7	2 / 3	2 / 3
<u>Disease</u>					
<u>Duration, years</u>					
<3		0%	25%	0%	20%
>3		100%	75%	100%	80%
<u>Treatment</u>					
Mesalazine		11	9	3	0
Azathioprine		3	1	4	1
Prednisone		4	0	3	0
Azulfidine		1	2	0	0
Mercaptopurine		0	0	0	1

Extra-intestinal**manifestations**

Absent	10	8	5	5
Present	2	4	0	0

ESR, mm Hg

Mean $\pm$ SD	38.2 $\pm$ 24.7	7.7 $\pm$ 5.8 ^a	29.6 $\pm$ 18.1	8.4 $\pm$ 2.9 ^b
Median	28.0	6.5	30.0	7.0
Range	18—90	2—17	10—50	6—12

CRP, mg/dL

Mean $\pm$ SD	1.3 $\pm$ 0.7	0.4 $\pm$ 0.3 ^c	2.1 $\pm$ 0.5	0.4 $\pm$ 0.1 ^d
Median	0.9	0.4	1.7	0.4
Range	0.7—2.3	0.1—0.9	1.3—4.2	0.2—0.7

CD: Crohn's Disease patient group; UC: Ulcerative colitis patient group. NA: Not applicable

^aaUC vs. iUC $P=0.005$

^baCD vs. iCD $P=0.032$

^caUC vs. iUC $P=0.010$

^daCD vs. iCD $P=0.031$

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. IL-19 and IL-24 mRNA levels in colonic mucosa from patients with inflammatory bowel disease and controls. a) IL-19 gene expression. b) IL-24 gene expression. RT-qPCR was performed to assess mRNA levels in colonic mucosa biopsies from IBD patients. Results are expressed as mean $\pm$ SEM of IL-19 and IL-24 transcript levels with GAPDH as housekeeping gene determined by $2^{-\Delta\Delta C_t}$, differences among groups were assessed by Kruskal Wallis test. aUC: Ulcerative Colitis patients with active disease, iUC: Ulcerative Colitis patients with inactive disease, aCD: patients with active Crohn's Disease, iCD: patients with inactive Crohn's Disease.

Fig. 2. IL-19—expressing cells in biopsies from patients with ulcerative colitis or Crohn's disease. a) Representative immunoperoxidase analysis in non-inflammatory control tissue (n=5) (left panel), active Crohn's disease (CD, n=5) tissue (middle panel) and active ulcerative colitis (UC, n=6) tissue (right panel). Arrows depict immunoreactive cells in mucosa, submucosa, muscular and adventitia. Original magnification was X320. b) Percentage of IL-19—expressing cells in active IBD (CD and UC) patients. Results are expressed as mean $\pm$ SD.

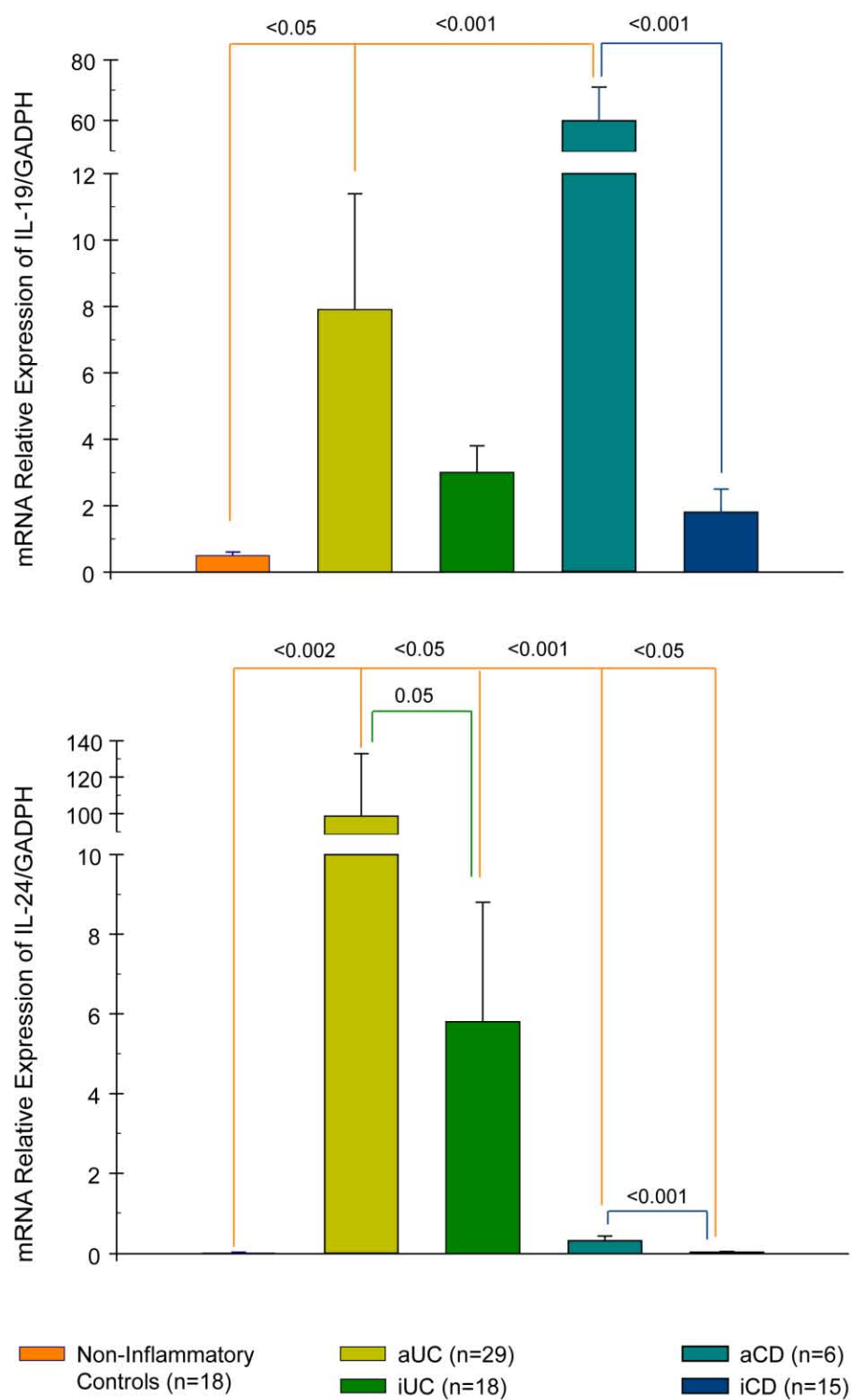
Fig. 3. IL-24—expressing cells in biopsies from patients with ulcerative colitis or Crohn's disease. a) Representative immunoperoxidase analysis in non-inflammatory control tissue (n=5) (left panel), active Crohn's disease (CD, n=5) tissue (middle panel) and active ulcerative colitis (UC, n=6) tissue (right panel). Arrows depict immunoreactive cells in mucosa, submucosa, muscular and adventitia. Original magnification was X320. b)

Percentage of IL-24—expressing cells in active IBD (CD and UC) patients. Results are expressed as mean±SD.

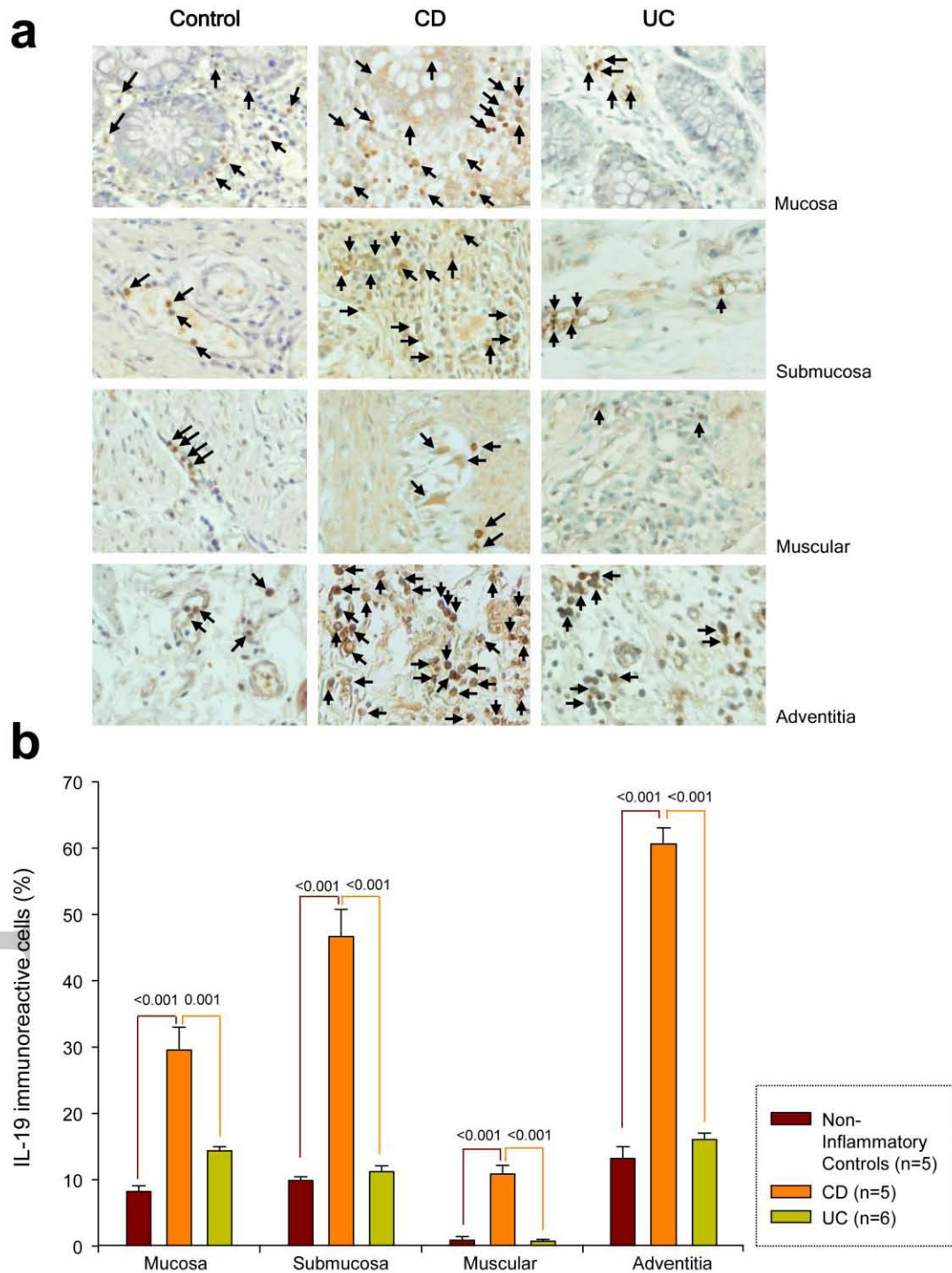
Fig. 4. IL-19—expressing peripheral blood cells. (a) Representative unstained and permeabilised PBMCs sample (autofluorescence control) from an IBD patient analysed by flow cytometry. (b-d) IgG₁-FITC/IgG₁-PE/CD45-PeCy5 mouse IgG_{1,k} isotype controls (BD Tritest™, BD Biosciences). (e) An electronic gate was made for CD14⁻ cells. From this gate CD4⁺/CD14⁻ single positive T cells were determined. (f) CD4⁺/CD14⁻/IL-19⁺—expressing T cells were obtained. (g) An electronic gate was made for CD8⁺/CD14⁻ cells. (h) CD8⁺/CD14⁻/IL-19⁺ double positive T cells were determined. (i) An electronic gate was made for CD19⁺/CD80⁺ double positive B cells. (j) From the gate (i) CD19⁺/CD80⁺/IL-19⁺ active B cells were determined. (k) An electronic gate was made for CD14⁺/CD4⁻/CD8⁻ monocytes. (l) From the gate (k) CD14⁺/CD4⁻/CD8⁻/IL-19⁺ double positive monocytes were determined. The software employed was CellQuestPro (BD Biosciences). A total of 100,000 to 500,000 events are recorded for each sample before any gate setting.

Fig. 5. IL-19— and IL-24—expressing peripheral blood cells in patients with ulcerative colitis or Crohn's disease. Bar graphs show percentage of (a) CD4⁺/CD14⁻/IL-19⁺— and CD4⁺/CD14⁻/IL-24⁺—expressing T cells, (b) CD8⁺/CD14⁻/IL-19⁺— and CD8⁺/CD14⁻/IL-24⁺—producing T cells, (c) CD4⁻/CD8⁻/CD14⁺/IL-19⁺— and CD4⁻/CD8⁻/CD14⁺/IL-24⁺—expressing monocytes and (d) CD19⁺/CD80⁺/IL-19⁺—and CD19⁺/CD80⁺/IL-24⁺—producing active B cells. Results are expressed as mean (yellow bar), median (black bar), 10th, 25th, 75th, and 90th percentiles. **P*<0.05. HD: healthy donors, aUC: Ulcerative

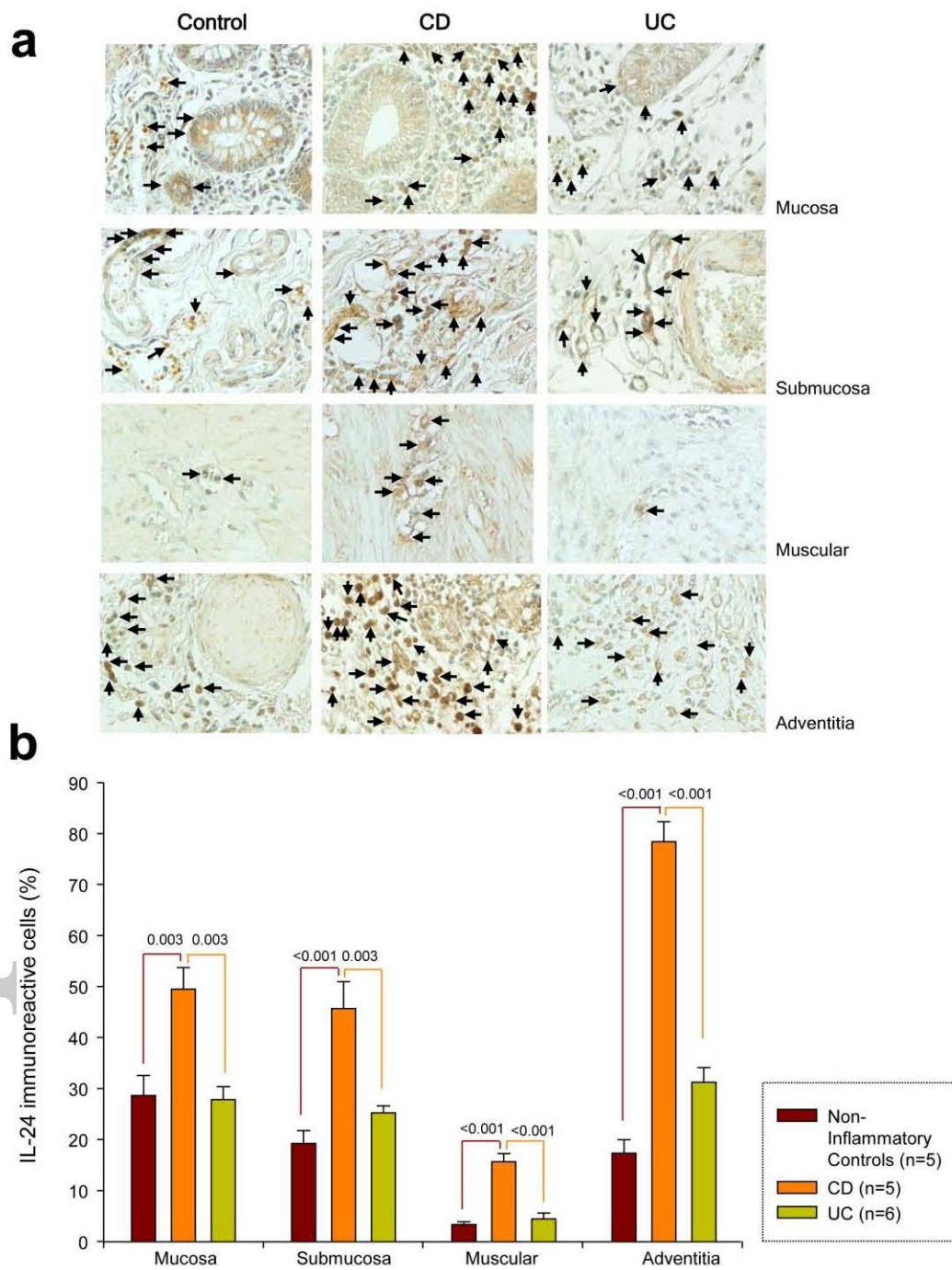
Colitis patients with active disease, iUC: Ulcerative Colitis patients with inactive disease,
aCD: patients with active Crohn's Disease, iCD: patients with inactive Crohn's Disease.



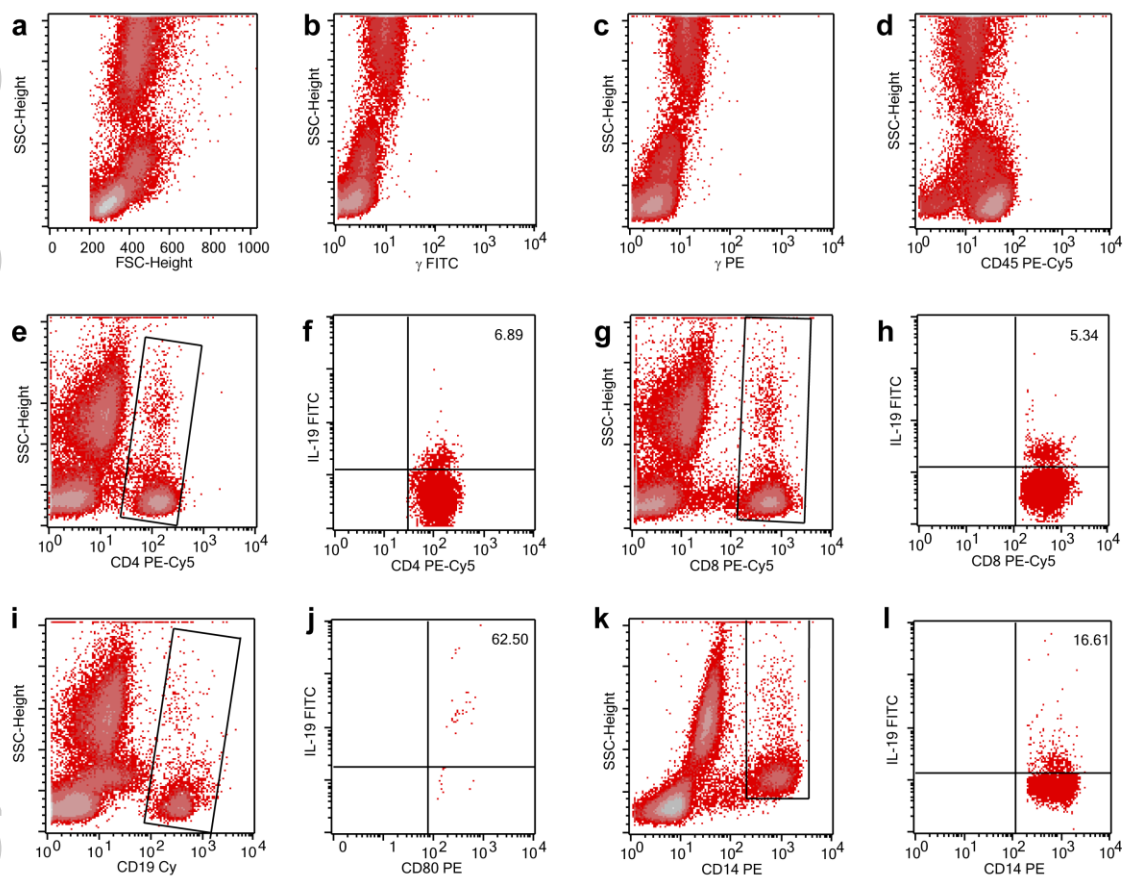
cei_12285_f1



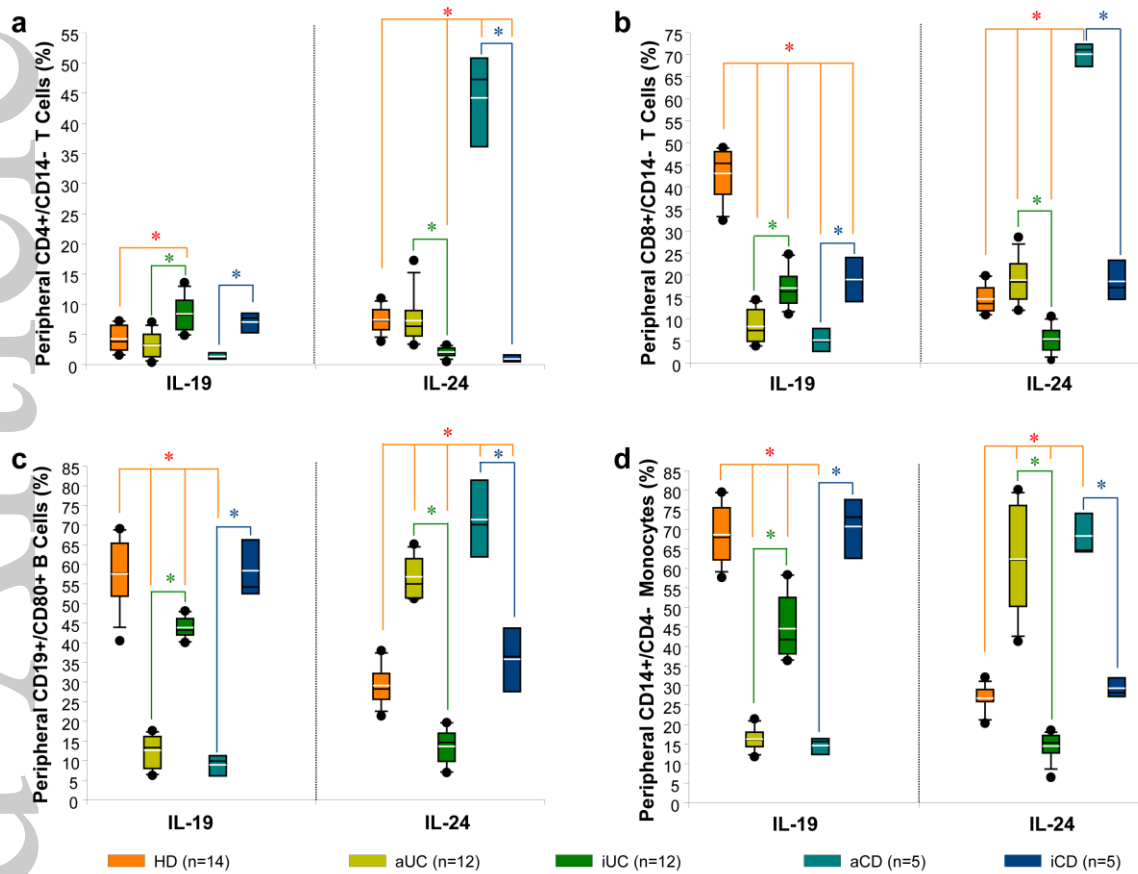
cei_12285_f2



cei_12285_f3



cei_12285_f4



cei_12285_f5