

UCH-FC
Biotecnología
F 219
Co 1



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO**

**Caracterización de las variantes del receptor tipo Toll 2 (TLR2)
humano en las enfermedades inflamatorias intestinales (EII)**

Seminario de Título
Entregado a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al Título de
Ingeniería en Biotecnología Molecular

NANCY MARÍA FARFÁN TRONCOSO

Octubre, 2012

Santiago, Chile

Directora de Seminario de Título: Dra. Marcela Hermoso Ramello

Patrocinante de Seminario de Título: Dra. María Rosa Bono





INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta, Nancy María Farfán Troncoso

“Caracterización de las variantes del receptor tipo Toll 2 (TLR2) humano en las enfermedades inflamatorias intestinales (EII)”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniería en Biotecnología Molecular

Dra. Marcela Hermoso Ramello

Directora Seminario de Título

Firma manuscrita en azul de Marcela Hermoso Ramello.

Comisión de Evaluación

Dr. Elías Utreras

Presidente Comisión

Firma manuscrita en azul de Elías Utreras.

Dra. Daniela Sauma

Evaluadora

Firma manuscrita en azul de Daniela Sauma.

Santiago, 27 de Octubre de 2012

Dedicado a mis padres

Julia y Arturo

AGRADECIMIENTOS

Primero quiero agradecer a mis padres por su apoyo incondicional durante todo este camino, los quiero con todo mi corazón. También a mi hermanita y su familia.

Agradezco a la directora de mi Seminario de Título, la Dra. Marcela Hermoso, por otorgarme un lugar en su laboratorio, por sus correcciones y por todos sus consejos. Muchas gracias por toda su ayuda académica durante todo este período y hasta la actualidad. También agradezco a la Dra. María Rosa Bono por sus correcciones en los experimentos planteados.

A mis compañeros de Laboratorio, porque de cada uno de ustedes aprendí. Gracias a Enzo, Caroll, Patti, Lucía, David, Paulina, Frano, Mayo, Lore y Karen. Especialmente a Don Roli, por toda su ayuda.

Agradezco a todos mis amigos, porque estoy feliz de haber compartido con ustedes y que sigan estando a mi lado: gracias Nallita, Val, Caro, Carlitos, Nico, Pame, Pauli y Katty por todos los momentos y las risas compartidas durante todos estos años.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
Índice	iv
Índice de Tablas y Figuras	vii
Abreviaturas	viii
Resumen	xi
Summary.....	xiii
<hr/>	
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 El sistema inmune.....	1
1.2 El sistema inmune intestinal y la mantención de la homeostasis.....	2
1.3 Quiebre de la homeostasis intestinal: enfermedades inflamatorias intestinales.....	4
1.4 Receptores de tipo Toll: su papel en las enfermedades inflamatorias intestinales.....	7
1.5 Relevancia de TLR2 en las enfermedades inflamatorias intestinales.....	9
1.6 Papel de las variantes solubles de TLR2 en la regulación negativa del receptor de membrana.....	11
<hr/>	
2. HIPÓTESIS.....	14
<hr/>	
3. OBJETIVO GENERAL.....	14
<hr/>	
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
<hr/>	
5. MATERIALES, MÉTODOS Y MUESTRAS	
5.1 Muestras de mucosa intestinal humanas y plasmas.....	15
5.2 Línea celular.....	18
5.3 Anticuerpos y reactivos.....	18
5.4 Extracción y cuantificación de proteínas.....	19

5.5 Inmunoblot.....	20
5.6 Inmunoprecipitación.....	21
5.7 Desglicosilación de proteínas.....	22
5.8 Concentración y ultracentrifugación de sobrenadantes celulares.....	22
5.9 ELISA.....	22
5.10 Estadística.....	23

6. RESULTADOS

6.1. Estandarización del proceso de extracción de proteínas totales de muestras quirúrgicas para detectar TLR2 mediante inmunoblot.....	24
6.2. Determinación de la especificidad de anticuerpos utilizados para detectar TLR2 en muestras de mucosa intestinal y de plasma humano.....	27
6.3. Especificidad de la detección de TLR2 en mucosa intestinal humana.....	31
6.4. Identificación de TLR2 de membrana en mucosa intestinal humana.....	33
6.5. Niveles de TLR2 aumentados en mucosa intestinal y en plasma de pacientes con colitis ulcerosa.....	37
6.6. Marcadores de inflamación en la mucosa intestinal de los pacientes con EII.....	42

7. RESUMEN DE RESULTADOS.....	44
--------------------------------------	-----------

8. DISCUSIÓN.....	45
--------------------------	-----------

9. CONCLUSIÓN.....	51
---------------------------	-----------

10. BIBLIOGRAFÍA.....	52
------------------------------	-----------

11. ANEXOS

11.1 Consentimiento informado para investigación (Grupo mayor de 18 años con Enfermedad Inflamatoria Intestinal refractaria al tratamiento).....	58
11.2 Consentimiento informado para investigación (Grupo entre 15 a 18 años con Enfermedad Inflamatoria Intestinal refractaria al tratamiento, autorización dada por el Padre/Madre/Tutor de Paciente).....	60
11.3 Consentimiento informado para investigación (Grupo control mayor de 18 años de edad).....	62
11.4 Consentimiento informado para investigación (Grupo control entre 15 a 18 años, autorización Padre/Madre/Tutor de Paciente).....	64
11.5 Consentimiento informado para investigación (Grupo Adulto con Enfermedad Inflamatoria Intestinal con actividad en diferentes estadios).....	66
11.6 Consentimiento informado para investigación (Grupo entre 15-18 años con Enfermedad Inflamatoria Intestinal con actividad en diferentes estadios, autorización Padre/Madre/Tutor de Paciente).....	68
11.7 Consentimiento informado para investigación (Grupo paciente entre 15-18 años con Enfermedad Inflamatoria Intestinal refractaria al tratamiento).....	70
11.8 Consentimiento informado para investigación (Grupo Control entre 15 a 18 años)	71
11.9 Consentimiento informado para investigación (Grupo entre 15 a 18 años con Enfermedad Inflamatoria Intestinal con actividad en diferentes estadios).....	72
11.10 Productos del Seminario de título	
11.10.1 Publicaciones.....	73
11.10.2 Resúmenes a congresos.....	82

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Variables para determinar la actividad de la CU según el Índice de Mayo y la actividad de la EC según el puntaje endoscópico simple (SES-EC).....	17
Tabla 2. Características del extracto proteico de mucosa intestinal humana.....	26
Tabla 3. Peso molecular teórico y experimental de TLR2 y sus dominios.....	36
Tabla 4. Características de los pacientes sometidos a cirugía y enrolados en el estudio para análisis mediante inmunoblot.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de un corte transversal de intestino normal, con colitis ulcerosa y con enfermedad de Crohn.....	6
Figura 2. Representación esquemática de TLR2 de membrana y soluble (sTLR2).....	12
Figura 3. Diagrama de un corte transversal de intestino.....	15
Figura 4. Proceso de extracción de proteínas de mucosa intestinal humana.....	25
Figura 5. Inmuno-detección de una banda de 97 kDa correspondiente a TLR2 en mucosa intestinal.....	29
Figura 6. Especificidad del anticuerpo biotilado BAF-2616 y condiciones experimentales para detectar TLR2.....	32
Figura 7. Identificación de TLR2 de membrana en mucosa intestinal y en medio condicionado de monocitos	35
Figura 8. Niveles de TLR2 de membrana aumentados en mucosa de pacientes con CU.....	40
Figura 9. Niveles de IL-10 y TNF- α en mucosa intestinal de pacientes con EII.....	43
Figura 10. Modelo propuesto para TLR2 en patologías inflamatorias del intestino.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

Ag:	Antígeno
ALT:	Ácido lipoteicoico
ASCA:	Anticuerpo anti <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
BCR:	Receptor de linfocito B
CD:	Grupo de diferenciación
CEI:	Células epiteliales intestinales
CU:	Colitis ulcerosa
CMN:	Células mononucleadas
CPA:	Célula presentadora de antígeno
DC:	Célula dendrítica
dsRNA:	RNA de doble hebra
DSS:	Sulfato de sodio dextrano
EC:	Enfermedad de Crohn
EII:	Enfermedades inflamatorias intestinales
Fc:	Fragmento cristizable del anticuerpo, contiene dos o tres dominios constantes
CEI:	Célula epitelial intestinal
HRP:	Enzima peroxidasa de rabanito, del inglés " <i>horseradish peroxidase</i> "
IFN:	Interferón
Igs:	Inmunoglobulinas
IPP:	Inmunoprecipitación
IRF:	Factor regulatorio de interferón
IL:	Interleuquina
LB:	Linfocito B

LP: Lámina *Propria*

LPS: Lipopolisacárido

LRR: Repeticiones ricas en leucina

LT: Linfocito T

LTreg: Linfocito T regulador

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógeno

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

mRNA: RNA mensajero

MyD88: Gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88

NFκB: Factor nuclear kappa B

NK: células asesinas naturales, del inglés "Natural killer"

NKT: Linfocitos T "Natural killer"

NOD2: Dominio de oligomerización de unión a nucleótido 2

Omp: Proteína de membrana externa de bacterias

P631H: Sustitución aminoacídica de prolina (P) por histidina (H) en la posición 631

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos

PBMC: Células mononucleadas de sangre periférica

P₃CSK₄: lipopéptido triacilado sintético (Pam₃Cys-Ser-Lys₄),

PG: Péptidoglicano

PI3K: Fosfoinositol 3 quinasa

PM: Peso molecular

PMA: Éster de forbol

PP: Placas de Peyer

PRRs: Receptores de reconocimiento de patrones

Rf: Migración relativa, razón entre la banda detectada en el gel de poliacrilamida y el total del frente de migración

R753Q: Sustitución aminoacídica de arginina (R) por glutamina (Q) en la posición 753

SCID: Inmunodeficiencia severa combinada

sTLR2: Variantes solubles de TLR2

TCR: Receptor de linfocito T

Th: Linfocito T cooperador CD4⁺

Th17: Linfocito T cooperador CD4⁺ productor de IL-17

TLR: Receptores tipo Toll

TNBS: Ácido trinitrobenzensulfónico

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

Tollip: Proteína que interacciona con Toll, adaptadora inhibitoria de TLR.

RESUMEN

Las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) se caracterizan por presentar una respuesta inmune intestinal exagerada frente a los antígenos de la dieta o a la microbiota. Entre las EII destacan la colitis ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn (EC).

La respuesta inflamatoria comprende la activación de vías de señalización intracelulares asociadas con los receptores de tipo *Toll* (TLRs) los cuales, al reconocer su ligando específico, desencadenan la expresión de citoquinas pro-inflamatorias. TLR2 es un integrante de esta familia de receptores que participa en la homeostasis intestinal, sin embargo, su papel en la fisiopatología de las EII no ha sido completamente aclarado. Por un lado, la mucosa intestinal de pacientes con EII presenta niveles del mRNA de TLR2 aumentados, los que se correlacionan con la actividad de la enfermedad. En cambio, la activación de la vía del TLR2 disminuye la inflamación en un modelo murino de CU, promoviendo un estado de protección de la barrera epitelial intestinal.

Diversos mecanismos regulatorios negativos de las vías pro-inflamatorias han sido descritos, los cuales evitan el daño tisular producido por la inflamación exacerbada. Uno de estos mecanismos comprende la generación de receptores solubles, los que compiten con el receptor de membrana por el mismo ligando, inhibiendo la activación de la señalización intracelular. Las variantes solubles del TLR2 humano (sTLR2) han sido identificadas en plasma, leche materna, saliva y líquido amniótico. El papel anti-inflamatorio de sTLR2 ha sido determinado *in vitro*, donde células incubadas con plasma depletado de sTLR2, aumentaron la producción de citoquinas pro-inflamatorias, con respecto a las incubadas con plasma normal.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar y cuantificar los niveles de las variantes de TLR2, solubles y del receptor anclado a membrana, en muestras de mucosa intestinal y plasma de pacientes con CU, EC y controles, mediante inmunoblot y ELISA. Para validar la movilidad electroforética de las bandas inmunoreactivas de TLR2, se utilizó la línea celular monocítica THP-1.

Los niveles proteicos de TLR2 de membrana (97 kDa) en la mucosa intestinal de pacientes con CU se encontraron aumentados respecto a los con EC y controles ($p < 0.05$, test de Kruskal Wallis, Dunn post-test). Similarmente, los niveles totales de TLR2 (solubles y de membrana) detectados mediante ELISA en mucosa intestinal de pacientes con CU se encontraron aumentados en relación a los otros grupos. Sin embargo, en las muestras de plasma humano no se observaron diferencias. Por último, los niveles de TNF- α e IL-10, marcadores de la respuesta pro- y anti- inflamatorias, respectivamente, no presentaron diferencias entre los grupos analizados.

En conclusión, la producción diferencial de TLR2 en pacientes con CU respecto a EC, podría contribuir al conocimiento de la fisiopatología de estas enfermedades y ser de utilidad para su diagnóstico y tratamiento.

SUMMARY

The inflammatory bowel diseases (IBD) are characterized by an exaggerated intestinal immune response against dietary antigens or microbiota. Among IBD, include ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD).

The inflammatory response include the activation of intracellular signalling pathways associated with Toll-like receptors (TLRs), which recognize its specific ligands and trigger the expression of pro-inflammatory cytokines. TLR2 is a member of this receptor family involved in intestinal homeostasis, however its role in IBD pathophysiology has not been completely clarified. On one hand, intestinal mucosa of IBD patients has elevated TLR2 mRNA level that correlates with the disease activity. In contrast, TLR2 activation decreases the inflammation in a UC murine model, promoting intestinal epithelial barrier protection.

Several negative regulatory mechanisms of pro-inflammatory pathways have been described, which prevent tissue damage from excessive inflammation. One such mechanism is the generation of soluble receptors, which recognize the same ligand as membrane receptor, inhibiting intracellular signalling activation. The soluble variants of human TLR2 (sTLR2) have been described in plasma, breast milk, saliva and amniotic fluid. The anti-inflammatory role of sTLR2 has been determined *in vitro*, where cells incubated with sTLR2-depleted plasma, increased the production of pro-inflammatory cytokines in comparison to those incubated with normal plasma.

The aim of this study was to characterize and quantify the levels of TLR2 variant, soluble and membrane-anchored receptor, in intestinal mucosa and plasma samples from patients with CU, EC and controls by using immunoblot and ELISA. To validate the electrophoretic mobility of TLR2 immunoreactive bands, a monocytic cell line THP-1 was used.

The levels of membrane TLR2 (97 kDa) in intestinal mucosa of UC patients were increased in comparison to CD and controls ($p < 0.05$, Kruskal Wallis, Dunn post-test). Similarly, the total TLR2 levels (soluble and membrane) detected by ELISA in intestinal mucosa of UC patients were increased in comparison to other groups. However, no

differences were found in the human plasma samples. Lastly, the TNF- α and IL-10 levels, markers of pro- and anti-inflammatory responses, respectively, did not differ between the analyzed groups.

In conclusion, the differential TLR2 production in patients with UC in comparison to CD, might contribute to the understanding of diseases pathophysiology and will be useful for diagnosis and treatment.

INTRODUCCIÓN

1.- El sistema inmune

En los seres vivos el sistema encargado de la defensa frente a algún microorganismo o sustancia extraña es el sistema inmune, el cual comprende dos respuestas: la innata y la adaptativa.

La respuesta inmune innata es la más ancestral y está presente tanto en invertebrados como en vertebrados. Ésta se activa inmediatamente por el hospedero frente a alguna agresión, tal como un organismo patógeno, extendiéndose hasta 12 horas post-infección. La respuesta inmune innata se manifiesta de la misma forma frente a infecciones repetitivas, lo cual indica que no presenta memoria. Esta respuesta está representada por las barreras fisicoquímicas, tales como el epitelio y la piel, factores solubles (proteínas del complemento, citoquinas y proteínas antimicrobianas), y células, tales como fagocitos (macrófagos, neutrófilos y células dendríticas (DC)) y células asesinas naturales (NK). Las células de la inmunidad innata poseen receptores expresados constitutivamente, los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), que reconocen estructuras comunes a varios grupos de patógenos, o patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Los PAMPs se encuentran altamente conservados, ya que son esenciales para la sobrevivencia de los patógenos, destacando el lipopolisacárido (LPS), el peptidoglicano (PG), el DNA bacteriano y el RNA de doble hebra (dsRNA) (Akira, Uematsu et al. 2006).

La respuesta inmune adaptativa se encuentra sólo en vertebrados mandibulados y es una respuesta tardía que se desarrolla un día post-infección, manifestándose desde el tercer al quinto día. La respuesta adaptativa está orquestada por dos tipos de células especializadas, los linfocitos T (LT) y los B (LB). Los receptores de los LT (TCR) y de los LB (BCR) abarcan un amplio repertorio. Cada linfocito posee un único receptor producido por recombinación somática, que reconoce un determinado epítipo del antígeno (Ag). Los Ags son procesados por las DC, o por las células presentadoras de Ag (CPA) profesionales para luego ser presentados en su superficie unidos al complejo

mayor de histocompatibilidad (MHC). El péptido antigénico es presentado a los LT en los órganos linfoides secundarios, donde los Ags seleccionan sólo un clon de linfocitos. Este proceso de selección clonal promueve la activación del LT y su posterior proliferación y diferenciación. La diferenciación de los LT, produce tanto células efectoras como de memoria. Las primeras se encargan de eliminar el agente extraño y las células de memoria actúan frente a una exposición posterior del mismo, produciéndose una respuesta adaptativa más rápida y aumentada (Delves and Roitt 2000).

La inmunidad innata y la adaptativa forman parte de un sistema integrado. La inmunidad innata es necesaria para la activación y condicionamiento del tipo de respuesta adaptativa. Ambas están coordinadas para activarse sólo frente a sustancias extrañas y mantener la tolerancia frente a los propios antígenos (de Souza, Mesquita Junior et al. 2010).

2.- El sistema inmune intestinal y la mantención de la homeostasis

El sistema inmune intestinal está constantemente expuesto a cambios físicos, químicos y microbianos provocados por los Ags de la dieta, tales como los microorganismos simbióticos que habitan la mucosa intestinal (McGuckin, Eri et al. 2009). La mantención de las condiciones intestinales necesarias para un correcto funcionamiento del sistema interno, u homeostasis, es consecuencia de una respuesta inmune capaz de reaccionar sólo frente a aquellos microorganismos patogénicos, y no frente a los Ags de la dieta o los microorganismos comensales o beneficiosos (Takahashi 2010).

Estructuralmente, el intestino posee en su superficie luminal múltiples vellosidades, que a su vez forman invaginaciones, denominadas criptas. Las vellosidades permiten aumentar la superficie y el área de contacto, aumentando así la absorción de nutrientes en el intestino delgado, y de vitaminas y agua en el intestino grueso. Las vellosidades están constituidas por una monocapa de células epiteliales intestinales (CEI) altamente polarizadas y estructuradas. Esta corresponde a la primera barrera

celular del intestino, cuya integridad es crucial para el mantenimiento de la homeostasis intestinal (McGuckin, Eri et al. 2009).

Las CEI secretan una densa capa de mucus que recubre toda la superficie de las vellosidades y criptas. El mucus es una barrera fisicoquímica compuesta principalmente por glicoproteínas tales como las mucinas, las cuales presentan funciones de hidratación y lubricación. Además de moléculas opsonizantes, tales como las inmunoglobulinas (Igs) del tipo A, G y M, y de péptidos trefoilos (del inglés *trefoil*), tales como TFF3/ITF, los cuales estimulan la reparación del epitelio. También hay péptidos antimicrobianos (defensinas, catelisinidas, y lisozimas) y lectinas del tipo-C (Abraham and Cho 2009; McGuckin, Eri et al. 2009). La capa de mucus comprende una capa externa densa de 700 μm de espesor, y una capa interna, de menor espesor. La capa externa está compuesta por péptidos antimicrobianos diluidos que tienen contacto directo con los microorganismos intraluminales. La capa interna, a su vez es mucho más adherente y enriquecida en péptidos antimicrobianos, además es estéril en condiciones normales (Atuma, Strugala et al. 2001).

Para el mantenimiento de la barrera epitelial, es fundamental la integridad de las uniones intercelulares, tales como las uniones estrechas, que sellan el espacio entre las CEI, y las uniones de tipo hendidura (del inglés *gap*), las cuales establecen la comunicación intracelular permitiendo el paso de pequeños metabolitos y regulando la proliferación y la diferenciación celular (Cario, Gerken et al. 2004; Ey, Eyking et al. 2009). Además de producir el mucus, las CEI secretan citoquinas que controlan la colonización microbiana y la respuesta inmune. Existen varios subtipos de CEI, entre los cuales destacan las células caliciformes, las que producen el mucus y los péptidos que mantienen la capa epitelial; las células de Paneth las cuales son productoras de péptidos antimicrobianos (α -defensinas y lectinas); y por último las células M, que permiten la fagocitosis de patógenos al interior del lumen y la transcitosis celular (Abraham and Cho 2009; McGuckin, Eri et al. 2009).

Entre las células epiteliales es posible encontrar algunos LT especializados (NKT y γ/δ), células NK y las DC, cuyas prolongaciones se extienden entre las CEI detectando el contenido intraluminal (Rescigno, Urbano et al. 2001; Cheroutre 2005; Malinarich,

Grabski et al. 2010). Bajo el epitelio se encuentra la lámina *propria* (LP) constituida por tejido conectivo y por una población de células de la respuesta inmune innata (monocitos, macrófagos, células NK, DC y mastocitos), y células de la respuesta inmune adaptativa (LT y LB) (McGuckin, Eri et al. 2009). Cuando las DC detectan algún patógeno o molécula dañina se activan y migran hacia los órganos linfoides secundarios mesentéricos (las Placas de Peyer (PP), los ganglios linfáticos mesentéricos, y los folículos linfoides aislados) activando así a los LT (Lorenz and Newberry 2004). En el intestino las CPA (DCs y macrófagos) poseen la capacidad de promover la tolerancia bajo condiciones normales. La tolerancia intestinal es mantenida además por los LT reguladores (LT_{reg}), los cuales son abundantes en la LP, y son capaces de secretar la citoquina anti-inflamatoria IL-10. Para el mantenimiento efectivo de la homeostasis intestinal, debe existir un estricto control del balance entre los LT efectores y los LT_{reg} (Abraham and Cho 2009).

3.- Quiebre de la homeostasis intestinal: enfermedades inflamatorias intestinales

La destrucción de la barrera epitelial intestinal expone de manera directa las células de la LP a los Ags intraluminales, activándose una respuesta inmune exacerbada, que promueve la infiltración de células inmunes y la inflamación, alterándose la homeostasis intestinal y desencadenándose un cuadro que caracteriza a las enfermedades inflamatorias intestinales (EII). Las EII son multifactoriales, influyendo en su patogénesis los factores genéticos, el sistema inmune del hospedero y el medioambiente (Bouma and Strober 2003; Strober, Fuss et al. 2007).

Las EII son patologías crónicas con episodios de crisis y remisión, clasificándose en colitis ulcerosa (CU) y en la enfermedad de Crohn (EC). Ambas enfermedades son consideradas de importancia clínica debido al gran deterioro de la calidad de vida, de su sintomatología, del elevado costo del tratamiento, y del riesgo elevado de desarrollar cáncer colorrectal en las personas que la padecen (Russel and Stockbrugger 1996). Los tratamientos utilizados son paliativos, entre los cuales se encuentran fármacos moduladores de la inflamación (mesalazina o ácido 5-aminosalicílico),

inmunosupresores (esteroidales y azatioprina) y anticuerpos anti-TNF- α . Sin embargo, estos fármacos pueden llevar a una evolución clínica desfavorable debido a sus efectos secundarios (Bouma and Strober 2003; Pieper, Haag et al. 2009). Las EII tienen mayor incidencia en países desarrollados y pueden afectar a personas de todas las edades, iniciándose principalmente entre los 15 y los 30 años de edad (Abraham and Cho 2009).

La CU y la EC tienen una epidemiología similar y comparten características clínicas y patológicas, tales como la diarrea, a veces con sangramiento y dolor abdominal (Bouma and Strober 2003), y manifestaciones inflamatorias extra-intestinales, tales como colangitis esclerosante primaria, espondilitis anquilosante y psoriasis (Bernstein, Wajda et al. 2005). Sin embargo, la CU y la EC presentan una patogénesis diferencial. En el caso de la CU, la extensión de la inflamación es continua, afectando desde el intestino grueso (o colon) al recto. En cambio, la EC presenta una afección de forma intermitente, a modo de parches, de todo el tracto digestivo, desde la boca hasta el ano, aunque son de mayor frecuencia las afecciones del ileon (último segmento del intestino delgado) y del colon (Abraham and Cho 2009).

Para el estudio de las EII se han desarrollado varios modelos murinos de EII inducida y espontánea. Los modelos animales de las EII inducidas se producen mediante la administración de químicos que irritan la mucosa y producen un daño agudo en la barrera epitelial, tales como el ácido trinitrobenzensulfónico (TNBS) para el estudio de la EC y el sulfato de sodio dextrano (DSS) para el estudio de la CU. Los modelos murinos de las EII espontáneas, se desarrollan por alteraciones en genes claves para la mantención de la homeostasis intestinal, tales como la deficiencia en el TFF3 (Mashimo, Wu et al. 1996), y animales defectuosos en la producción de IL-10 (Mahler and Leiter 2002).

Varios estudios epidemiológicos han establecido asociaciones genéticas con la susceptibilidad a las EII. En el caso de la EC se han descrito polimorfismos en genes codificantes para moléculas inmunes innatas, tales como NOD2 (que detecta bacterias intracelulares) (Figuroa, Peralta et al. 2006; Glas, Seiderer et al. 2010), y en ATG16L1 (componente del complejo de autofagia) (Gazouli, Pachoula et al. 2010). Asimismo, polimorfismos en genes codificantes de moléculas que participan en las vías de

señalización de IL-23/Th17, tales como el receptor de IL-23 (IL-23R) y en IL-12B, han sido asociados a CU y EC (Abraham and Cho 2009).

En las EII existe una elevada infiltración de células inmunes, por lo tanto se produce un aumento en los niveles de citoquinas pro-inflamatorias, tales como TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , y en la vía de señalización de IL-23/Th17 (ya que el receptor de IL-23 en las células Th17 induce su diferenciación) (Abraham and Cho 2009). También, las EII se caracterizan por un aumento de la respuesta de los LT efectores (de la subpoblación cooperadora (Th) CD4⁺, subtipos Th1, Th2 y Th17) que conlleva a una disminución de los LT_{reg} (Elson, Cong et al. 2005). El tipo de infiltración se diferencia entre la CU y la EC. En la CU se distingue una inflamación en la capa más superficial de la mucosa, con infiltración de linfocitos y granulocitos (neutrófilos, basófilos y eosinófilos) y pérdida de células caliciformes, que conduce a la producción de ulceraciones y abscesos. En cambio, en la EC el daño es transmural, con afección de todas las capas de la pared intestinal, en donde se presenta una infiltración densa de linfocitos y macrófagos, que provocan, en la mayoría de los casos, el desarrollo de granulomas, ulceraciones fisurantes y fibrosis en la submucosa (Bouma and Strober 2003) (Figura 1).

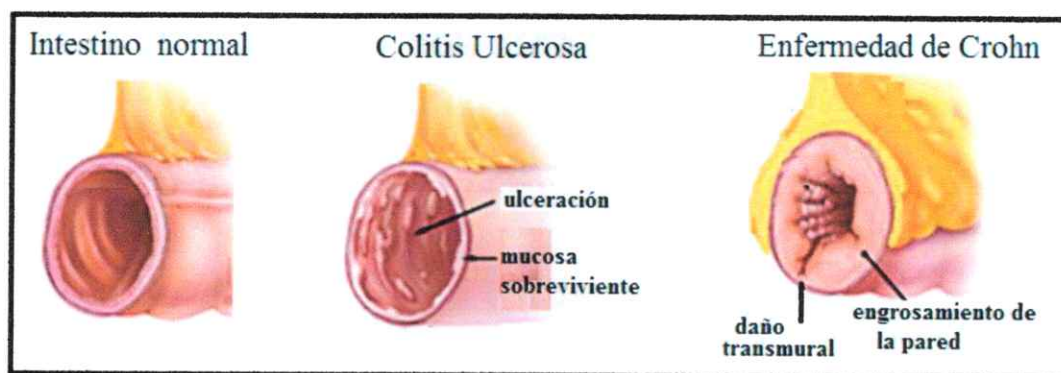


Figura 1. Diagrama de un corte transversal de intestino normal, con colitis ulcerosa y con enfermedad de Crohn. Modificado de: http://www.hopkins-gi.org/GDL_DiseaseLibrary.aspx?CurrentUDV=31

El perfil inmunológico a nivel periférico permite diferenciar entre la CU y la EC. La CU se asocia a la respuesta humoral de perfil Th2/Th17, evidenciado por los niveles aumentados de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-17. En cambio, en la EC prevalece la respuesta

inmune celular de tipo Th1/Th17, con secreción aumentada de IL-12, TNF- α , IFN- γ e IL-17 (Beltran, Candia et al. 2009; Brand 2009).

4.- Receptores de tipo Toll: su papel en las enfermedades inflamatorias intestinales

Los receptores de reconocimiento de patrones o PRRs son receptores transmembrana que se expresan en células del sistema inmune innato y adaptativo, y reconocen a los patrones moleculares asociados a patógenos o PAMPs. En el intestino, los PRRs son los primeros en distinguir lo “propio” de lo “ajeno”, por lo tanto, tienen un papel esencial en la respuesta inmune inmediata (Rakoff-Nahoum, Paglino et al. 2004). Los receptores tipo Toll (TLRs) son un tipo de PRRs relacionados a la proteína *Toll* de *D. melanogaster* y descubiertos en la década de los '90, cuyo papel es otorgar protección contra las infecciones fúngicas (Lemaitre, Nicolas et al. 1996). Al reconocer un ligando, los TLRs producen un aumento de la producción de citoquinas pro-inflamatorias, las que a su vez condicionan la inmunidad adaptativa (Aderem and Ulevitch 2000). En el intestino, los TLRs son expresados por monocitos y macrófagos de la LP, las DC, las CEI, los LT efectoros, los LT_{reg} y en menor cantidad por los LB (Cario 2010).

Los TLRs son glicoproteínas de transmembrana de tipo I, pertenecientes a la familia del receptor de IL-1 (IL-1R), que poseen tres dominios (amino-terminal, transmembrana y carboxilo-terminal). El dominio amino-terminal es extracelular, con repeticiones ricas en leucina (LRR), las cuales determinan la especificidad de unión a un PAMP específico (Bowie and O'Neill 2000). El dominio carboxilo terminal intracelular es altamente conservado, posee homología al dominio del IL-1R denominado TIR (Toll/IL-1R), y participa en el reclutamiento de proteínas de la cascada de señalización (Gay and Keith 1991).

Hasta el momento, diez tipos de TLRs han sido descritos en humanos. Los TLRs 1, 2, 4, 5, 6 y 10 se localizan en la superficie celular y reconocen principalmente PAMPs presentes en el exterior de bacterias, protozoos y hongos. Los TLRs 3, 7, 8 y 9 se localizan en compartimentos intracelulares en donde unen ácidos nucleicos derivados de virus y bacterias. Los TLRs pueden formar homo y heterodímeros, lo cual aumenta la

probabilidad de unión de ligandos (Akira, Uematsu et al. 2006). Posterior a la unión de su ligando, los TLRs reclutan proteínas adaptadoras que contienen un dominio TIR, tales como MyD88, TIRAP, TRIF y TRAM. MyD88 es adaptador de todos los TLRs, excepto TLR3, y su unión activa la vía de las MAP quinasas (MAPKs), tales como ERK, JNK y p38, activando el factor de transcripción NF- κ B e induciendo genes pro-inflamatorios, tales como TNF- α e IL-6. La proteína TRIF (adaptador de TLR3 y 4), activa la vía de las MAPKs y los factores de transcripción NF- κ B e IRF3/IRF7. IRF3/IRF7 induce la expresión de interferones de tipo I (IFN- α e IFN- β). Los TLRs de superficie activan principalmente NF- κ B, en cambio, los TLRs intracelulares además activan principalmente IRF3/IRF7 (Kumar, Kawai et al. 2009).

Las mutaciones genéticas en los TLRs causan un desbalance en la homeostasis intestinal. En un modelo murino de la CU inducida por DSS, se observa una deficiencia en la reparación tisular que se exagera en animales deficientes en MyD88, TLR2, TLR4 (Rakoff-Nahoum, Paglino et al. 2004), TLR3 (Vijay-Kumar, Wu et al. 2007), TLR5 (Vijay-Kumar, Aitken et al. 2008) y en TLR9 (Rachmilewitz, Katakura et al. 2004), lo cual indica que los TLRs activan vías protectoras de la integridad de la barrera epitelial. Sin embargo, ratones deficientes en NF- κ B presentan una menor severidad en la colitis inducida por DSS, debido a una menor expresión de citoquinas pro-inflamatorias (Erdman, Fox et al. 2001). Por lo tanto, las condiciones que otorgan un papel protector o pro-inflamatorio de los TLRs en el intestino aún son inciertas.

Mediante ensayos de inmunofluorescencia se determinó que la inmunoreactividad de algunos TLRs en las CEI de intestino inflamado de pacientes con EII difiere respecto al tejido no inflamado y a los individuos controles. Además en CEI y LP de pacientes con CU y EC, los niveles de TLR3 están disminuidos, mientras que los de TLR4 y TLR2 están aumentados (Cario and Podolsky 2000; Hausmann, Kiessling et al. 2002). Esto sugiere que las vías de señalización inflamatorias participan activamente en la mantención de la homeostasis de la mucosa intestinal.

5.- Relevancia de TLR2 en las enfermedades inflamatorias intestinales

La importancia de TLR2 en relación a los otros TLRs, se debe al amplio espectro de reconocimiento de PAMPs, debido a su homodimerización y heterodimerización con TLR1 o TLR6. La proteína TLR2 reconoce principalmente PAMPs derivados de bacterias Gram-Positivas, tales como PG, lipoproteínas, ácido lipoteicoico (ALT) y lipopéptidos di o tri-acilados (al heterodimerizar con TLR6 o TLR1). Además, reconoce lipoarabinomanano de *Mycobacteria tuberculosis*, zimosano de hongos, y glicosil-fosfatidil-inositol de *Trypanosoma Cruzi* (Akira, Uematsu et al. 2006).

Se desconoce si la señalización vía TLR2 es protectora o perjudicial para la homeostasis intestinal. Varias evidencias han demostrado que TLR2 cumple un papel protector en estas enfermedades. De esta forma se reportó que en un modelo murino de CU inducido por DSS y expuesto al lipopéptido triacilado *Pam₃CysSerLys₄* (*P₃CSK₄*), un ligando de TLR2 específico, disminuye la inflamación y se estimula la reparación epitelial (Cario, Gerken et al. 2007). Similarmente, la estimulación de cultivos primarios de CEI con *P₃CSK₄* induce la expresión de conexina 43, una subunidad de las uniones de tipo hendidura, y la formación de uniones estrechas, promoviendo la mantención de la integridad epitelial (Cario, Gerken et al. 2004; Ey, Eyking et al. 2009). También, en este modelo murino de CU inducida por DSS, ratones deficientes en TLR2, presentan una disminuida producción del TFF3, y un aumento en la apoptosis e infiltración leucocitaria (Podolsky, Gerken et al. 2009). Por otro lado, la estimulación de TLR2 induce la secreción de citoquinas pro- y anti-inflamatorias, dependiendo del tipo celular y de los ligandos utilizados. Los niveles de TLR2 aumentan con la exposición a ALT y zimosano en monocitos aislados de sangre periférica de pacientes con EII, y se correlacionan directamente con el contenido de TNF- α en el medio, produciendo el aumento de la respuesta inflamatoria (Canto, Ricart et al. 2006). Además, macrófagos CD14⁺/CD33⁺ obtenidos de la mucosa intestinal de pacientes con EC presentan niveles de TLR2 elevados, y la estimulación con bacterias comensales indujo la producción de IL-23, TNF- α e IL-6 (Kamada, Hisamatsu et al. 2008). En contraste, la estimulación de DCs CD11c⁺ con *P₃CSK₄* aumenta la producción de IL-10, suprimiendo la respuesta inmune

celular *in vitro* (Yanagawa and Onoe 2007). En relación con lo anterior, las DCs obtenidas de mucosa intestinal de modelos murinos de EII, estimuladas con un agonista de TLR2 inducen la secreción de IL-10 y su restitución disminuye la inflamación *in vivo* (Foligne, Dessein et al. 2007). Finalmente, la transferencia de LT efectores a ratones SCID indujo una colitis espontánea, que fue atenuada en presencia de LT_{reg} CD4⁺ CD25⁺ previamente estimulados con P₃CSK₄ (Liu, Komai-Koma et al. 2006). Por lo tanto, con los antecedentes previamente descritos, no se puede predecir con certeza el efecto funcional que tendría la estimulación vía TLR2, ni los efectos inmunológicos en un sistema *in vivo*, ya que estos efectos dependerían del tipo celular estimulado, del contexto inflamatorio o microambiente de citoquinas extracelulares que modifican el entorno, y del tipo de daño o de microorganismos que originen los PAMPs que servirán de ligandos para las moléculas de TLR2.

En la actualidad, se ha estudiado la proteína TLR2 a distintos niveles, ya sea determinando las frecuencias de variantes polimórficas de *tlr2* asociadas a enfermedades, comparando sus niveles de expresión en diversas enfermedades a nivel de transcripción, traducción y localización. Los polimorfismos genéticos son utilizados como marcadores moleculares de enfermedades específicas. En el caso de las EII, polimorfismos del gen *tlr2* (y de *tlr1* y *tlr6*) han sido asociados con el riesgo y la gravedad de las EII. Por ejemplo, la sustitución de R753Q en TLR2, presente en pacientes con CU (Pierik, Joossens et al. 2006), se asocia con una deficiencia en la síntesis de TFF3 y en uniones del tipo hendidura (Ey, Eyking et al. 2009; Podolsky, Gerken et al. 2009). Similarmente, la sustitución de P631H en TLR2 de pacientes con EII, se correlaciona con una menor prevalencia de anticuerpos anti-Ags bacterianos (IgA anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) e IgA anti-Omp), los cuales tienen una función protectora en el intestino (Henckaerts, Pierik et al. 2007).

Por otro lado, los niveles de mRNA de TLR2 se encuentran aumentados en un modelo murino de EC inducida por TNBS (Gomariz, Arranz et al. 2005), como también en monocitos y macrófagos aislados de mucosa intestinal de pacientes adultos y pediátricos con EII (Hausmann, Kiessling et al. 2002; Szebeni, Veres et al. 2008; Candia, Diaz-Jimenez et al. 2012). Estos resultados sugieren que la maquinaria

transcripcional para este receptor se encuentra aumentada, lo que podría reflejarse en un aumento de los niveles proteicos de TLR2 en estos pacientes.

Finalmente, los niveles proteicos de TLR2 en las CEI y en la LP de intestino de pacientes sanos se encuentran disminuidos (Cario and Podolsky 2000) con respecto a las muestras de intestino inflamado de pacientes con EII, o de un modelo murino con EC inducida por TNBS (Cario and Podolsky 2000; Hausmann, Kiessling et al. 2002; Gomariz, Arranz et al. 2005; Frolova, Drastich et al. 2008), lo que sugiere que el ambiente inflamatorio de la mucosa intestinal constituye un estímulo para la inducción del receptor.

6.- Papel de las variantes solubles de TLR2 en la regulación negativa del receptor de membrana

Existen diversos mecanismos regulatorios de los TLR2s que evitan el daño generado por la activación permanente de las vías de señalización pro-inflamatorias. Entre éstos destacan: a) las proteínas intracelulares secuestradoras de adaptadores de la vía de señalización de TLRs, b) la degradación de los TLR2s o de las proteínas de señalización, c) la disminución de la expresión de los genes *tlr*, y d) la generación de TLRs solubles que actúan como un señuelo que une los mismos ligandos que los TLRs de membrana (Liew, Xu et al. 2005). De estos últimos, se conocen variantes solubles para TLR2 (LeBouder, Rey-Nores et al. 2003), TLR4 (Iwami, Matsuguchi et al. 2000) y para TLR5 (Tsukada, Fukui et al. 2005). Se han descrito varios reguladores negativos de TLR2 que intervienen con las vías de señalización intracelulares, tales como PI3K (fosfo-inositol 3-quinasa) (Strassheim, Asehnoune et al. 2004; Arancibia, Benitez et al. 2011), Tollip (proteína que interacciona con Toll) (Zhang and Ghosh 2002) y NOD2 (Dominio de oligomerización de unión a nucleótido 2) (Watanabe, Kitani et al. 2004). Por otro lado, variantes solubles de TLR2 (sTLR2), han sido detectadas en plasma humano, leche materna (LeBouder, Rey-Nores et al. 2003), saliva (Kuroishi, Tanaka et al. 2007; Srinivasan, Kodumudi et al. 2008) y líquido amniótico (Dulay, Buhimschi et al. 2009). Además, monocitos de sangre periférica secretan de manera constitutiva

sTLR2, lo cual puede ser activado directamente con P_3CSK_4 o indirectamente por ésteres de forbol (PMA) (LeBouder, Rey-Nores et al. 2003). Además, la administración de sTLR2 a ratones infectados con bacterias Gram-Positivas produjo una disminución en la secreción de IL-8, la activación de NF- κ B y la infiltración leucocitaria, sin afectar la eliminación bacteriana. Esto sugiere que sTLR2 promueve una disminución de la señalización de la vía activada por TLR2. Similarmente, la estimulación de TLR2 en células mononucleadas de sangre periférica (PBMC) incubadas con plasma depletado de sTLR2, produjo una respuesta inflamatoria mucho mayor a la observada con plasma normal (Raby, Le Bouder et al. 2009), lo cual refuerza la idea de que sTLR2 tendría un papel anti-inflamatorio (Figura 2).

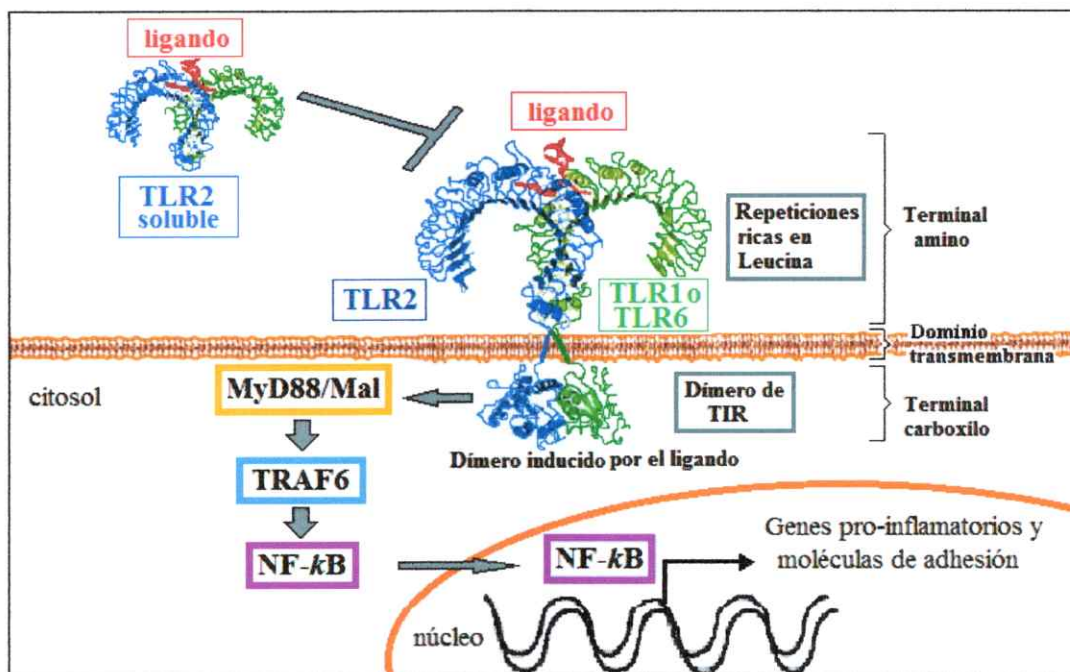


Figura 2. Representación esquemática de TLR2 de membrana y soluble (sTLR2). Se esquematiza el dímero de TLR2 (con TLR1 o TLR6) anclado a la membrana plasmática, el cual al unir su ligando, activa una vía de señalización intracelular promoviendo la expresión de genes pro-inflamatorios (IL-6, TNF- α , entre otros) y moléculas de adhesión. Esta vía es regulada negativamente por TLR2 soluble (sTLR2), que compite con el receptor de membrana por la unión del ligando. sTLR2 se representa como dímero, pero no se ha demostrado la existencia de dímeros en la fase soluble. Las estructuras de TLRs fueron adaptadas de (Jin, Kim et al. 2007).

Hasta la fecha, no existe consenso sobre el número de variantes de sTLR2 ni de su peso molecular (PM). Mediante inmunoblot los PMs de las variantes de sTLR2 varían según el origen de la muestra y del anticuerpo utilizado. En muestras de plasma humano, las variantes identificadas corresponden a 25, 38, 40, 66 y 83 kDa y en sobrenadante de monocitos se detectan las mismas variantes que en plasma y una variante adicional de 70 kDa (LeBouder, Rey-Nores et al. 2003). Sin embargo, en el líquido amniótico las variantes que se detectaron fueron de 30 y 42 kDa (Dulay, Buhimschi et al. 2009) y en saliva las variantes fueron de 27, 40, 55, y 75 kDa (Kuroishi, Tanaka et al. 2007; Srinivasan, Kodumudi et al. 2008).

Por otro lado, el análisis del mRNA de TLR2 demostró la presencia de un único transcrito, lo cual es sugerente de que las variantes de sTLR2 no serían producto de empalme alternativo (Haehnel, Schwarzfischer et al. 2002; LeBouder, Rey-Nores et al. 2003). Además, todas las variantes proteicas de sTLR2 comparten algún segmento del dominio extracelular de receptor, por lo que es altamente probable que sean resultado de un procesamiento proteolítico post-traducciona (LeBouder, Rey-Nores et al. 2003).

Debido a que sTLR2 ha sido identificada en varios fluidos humanos y que su función tendría un papel anti-inflamatorio, se han demostrado algunas asociaciones entre los niveles de sTLR2 y enfermedades de carácter inflamatorio. Los niveles de sTLR2 están disminuidos con respecto a individuos sanos en suero de pacientes con tuberculosis (LeBouder, Rey-Nores et al. 2003), pacientes con VIH en estado avanzado (Heggelund, Flo et al. 2004) y en pacientes con infarto agudo al miocardio (Heggelund, Flo et al. 2004; Ueland, Espevik et al. 2006). Por otro lado, los niveles de sTLR2 están aumentados en saliva de pacientes con síndrome de boca quemante (del inglés *burning*) (Srinivasan, Kodumudi et al. 2008) y en suero de pacientes con CU (Candia, Diaz-Jimenez et al. 2012). Además en varias patologías los niveles de sTLR2 se encuentran alterados con respecto a individuos sanos. Sin embargo, no se ha observado un patrón predecible de expresión de sTLR2, ya que depende de las características de cada patología. Por lo tanto, en este seminario de título se propuso determinar los niveles de TLR2 en pacientes con EII y además identificar la presencia de las variantes de sTLR2, como un mecanismo que contribuye al mantenimiento de la homeostasis intestinal.

HIPÓTESIS

Los niveles proteicos de las variantes de TLR2 (de membrana y solubles) se encuentran aumentados en la mucosa intestinal de pacientes con EII.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar cualitativa y cuantitativamente las variantes de TLR2 en pacientes con EII y su asociación con marcadores inflamatorios.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.- Determinar las variantes de TLR2 (de membrana y solubles) en el plasma y en la mucosa intestinal de pacientes con EII y controles.

1a.- Cuantificar los niveles de TLR2 en muestras de mucosa intestinal de pacientes con CU, EC y controles mediante inmunoblot.

1b.- Cuantificar los niveles totales de TLR2 en mucosa intestinal y en plasma mediante ELISA.

2.- Determinar los niveles de TNF- α e IL-10 en la mucosa intestinal de pacientes con CU, EC y controles, mediante ELISA.

2a.- Establecer una asociación mediante la correlación de Spearman entre los niveles de TLR2 con los de TNF- α e IL-10, en mucosa intestinal de pacientes con CU, EC y controles.

MATERIALES, MÉTODOS Y MUESTRAS

1.- Muestras de mucosa intestinal humana y plasmas

Un total de 28 muestras de mucosa intestinal fueron obtenidas de resecciones quirúrgicas o procedimientos colonoscópicos de pacientes con CU (n=8), EC (n=5) y cáncer de colon (n=8), provenientes del Hospital Clínico de la Universidad de Chile y de la Clínica Las Condes. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de cada Hospital o Clínica que participó en este protocolo. Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado para utilizar sus muestras de sangre y tejido para esta investigación (ver anexo).

El diagnóstico de los pacientes fue basado en criterios clínicos, endoscópicos e histológicos estándar. Los criterios de inclusión fueron: pacientes mayores de 18 años y con consentimiento informado diagnosticados con EII. Los criterios de exclusión fueron: enfermedades inflamatorias no clasificadas, colitis indeterminada, ileocolitis infecciosa, historia de enfermedades autoinmunes y enfermedad celíaca.

Las muestras de mucosa intestinal de pacientes con EII fueron obtenidas desde las áreas inflamadas del intestino las cuales comprendían la capa de mucus, la lámina epitelial, la lámina *propria* y la lámina muscular de la mucosa (Figura 3).

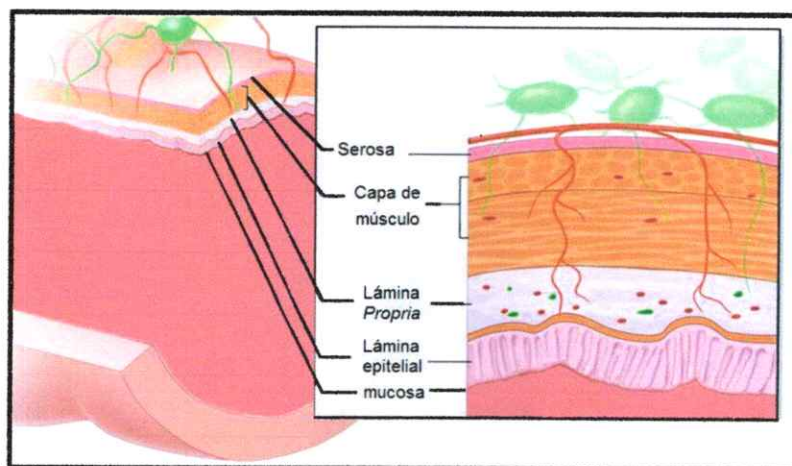


Figura 3. Diagrama de un corte transversal de intestino. (Modificado de: <http://www.cancer.gov/PublishedContent/MediaLinks/415961.html>)

Para el estudio de las muestras de CU, la actividad fue determinada en el área más inflamada usando el índice endoscópico de Mayo (Lewis, Chuai et al. 2008) (ver Tabla 2). En el caso de la EC, la actividad fue determinada de acuerdo al puntaje endoscópico simple para la EC (SES-EC) (Daperno, D'Haens et al. 2004; Sipponen, Nuutinen et al. 2010) (ver Tabla 2). El puntaje histológico fue usado para la evaluación de la inflamación intestinal en ambas enfermedades. Las muestras controles fueron tomadas desde pacientes con cáncer colorrectal, y la ausencia de inflamación fue confirmada histológicamente (el médico tratante apartó muestras sin compromiso inflamatorio durante la intervención). Posterior a la toma de muestras, éstas se guardaron en criotubos a -80°C hasta su procesamiento.

Las muestras de sangre fueron recolectadas antes de la cirugía o colonoscopia, para determinar los niveles plasmáticos de sTLR2 mediante ELISA. Las muestras sanguíneas fueron homogeneizadas por inversión y centrifugadas a 1500 g por 15 min. Posterior a la centrifugación, el plasma fue separado y alicuotado. Para los análisis de inmunoblot, el plasma fue pre-incubado con proteína A/G agarosa para eliminar uniones inespecíficas y posteriormente centrifugado. El sobrenadante fue separado del precipitado enriquecido en proteínas unidas inespecíficamente. Finalmente, las muestras fueron guardadas a -80°C .

Tabla 1. Variables para determinar la actividad de la CU según el Índice de Mayo y la actividad de la EC según el puntaje endoscópico simple (SES-EC).

Evaluación de la actividad	Variable	Puntaje*			
		0:	1:	2:	3:
Colitis Ulcerosa: "Índice de Mayo"	Frecuencia de deposiciones	ninguna	1: 1 a 2 veces al día más de lo normal	2: 3 a 4 veces al día más de lo normal	3: > 3 veces al día más de lo normal
	Sangrado rectal	ninguno	1: sangre visible con sangrado menos del 50% de las veces	2: sangre visible con sangrado el 50% de las veces	3: sangre visible y sangrado > 50% de las veces
	Apariencia de la mucosa intestinal en la endoscopia	normal	1: enfermedad leve (eritema, patrón vascular disminuido)	2: enfermedad moderada (eritema marcado, patrón vascular ausente, erosiones)	3: enfermedad severa (sangrado espontáneo, ulceración)
	Valoración global del médico	normal	1: media	2: moderada	3: severa
Enfermedad de Crohn: "Puntaje endoscópico simple para la enfermedad de Crohn" (SES-EC)	Tamaño de las úlceras	ninguna	1: úlceras pequeñas (diámetro de 0,1 a 0,5 cm)	2: úlceras de tamaño medio (diámetro de 0,5 a 2 cm)	3: úlceras grandes (diámetro > 2 cm)
	Superficie ulcerada (%)	ninguna	1: < 10	2: 10 a 30	3: > 30
	Superficie afectada (%)	ninguna	1: < 50	2: 50 a 75	3: > 75
	Estenosis del lumen intestinal	ninguna	1: única, puede ser pasada por el endoscopio	2: múltiples, pueden ser pasadas por el endoscopio	3: múltiples, no pueden ser pasadas por el endoscopio

* La sumatoria de los puntajes en el Índice de Mayo y SES-EC indican la actividad de la enfermedad. Para el Índice de Mayo el rango va de 0 a 12, donde 0: inactiva, 1 a 4: leve, 5 a 8: moderada, 9 a 12: severa. Para SES-EC el puntaje se otorga a los cinco segmentos del intestino, por lo tanto el rango va de 0 a > 16, donde 0 a 2: inactiva, 3 a 6: leve, 7 a 15: moderada, > 16: severa.



2.- Línea celular

La línea celular de monocitos humanos THP-1 (Número de catálogo ATCC: TIB-202), derivada de leucemia monocítica aguda, fue utilizada para caracterizar las variantes solubles o de membrana de TLR2 y para determinar el PM de éstas. Las células fueron crecidas en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino, penicilina/estreptomicina, al 5% CO₂ y 37°C. Las células fueron cultivadas en medio sin suero por 24 h antes de realizar la extracción de proteínas para evitar la sobreestimación de los niveles de TLR2, debido a la presencia de sTLR2 en el suero (LeBouder, Reynores et al. 2003). Las células se diferenciaron a macrófagos por el tratamiento con PMA a una concentración final de 10 nM por 24 h, ya que la diferenciación de monocitos a macrófagos genera un fenotipo con mayores niveles de expresión de TLR2 (Jouault, El Abed-El Behi et al. 2006).

3.- Anticuerpos y reactivos

Para identificar la proteína TLR2 mediante inmunoblot se utilizaron los siguientes anticuerpos: anticuerpo policlonal anti-dominio extracelular de TLR2 conjugado a biotina (BAF2616) (R&D Systems Inc., USA); anticuerpo monoclonal anti-dominio extracelular de TLR2 (clon 2.1; TL2.1 eBioscience Inc., San Diego, CA, USA); anticuerpo monoclonal anti-dominio extracelular de TLR2 (clon 1030A5.138; IMG-319, Imgenex, San Diego, CA, USA); anticuerpo policlonal anti-péptido de 19 aminoácidos del carboxilo-terminal de TLR2 (C-19) (sc-8690, Santa Cruz, CA, USA); anticuerpo policlonal anti-péptido de 17 aminoácidos del amino-terminal de TLR2 (N-17) (sc-8689, Santa Cruz, CA, USA); anticuerpo policlonal anti-dominio extracelular de ST2 conjugado a biotina (BAF1004, R&D Systems, Inc., USA). Además se utilizó el anticuerpo policlonal anti- β -actina (20-33, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y anticuerpos secundarios anti-conejo, anti-cabra y anti-ratón conjugados con HRP (enzima peroxidasa de rabanita) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA). Los siguientes péptidos fueron utilizados para el desplazamiento de anticuerpos: péptido de

19 aminoácidos ubicados en el extremo carboxilo de TLR2 (C-19P) (sc-8690P, Santa Cruz, CA, USA) y péptido de 17 aminoácidos ubicados en el extremo amino de TLR2 (N-17P) (sc-8689P Santa Cruz, CA, USA). Para verificar la especificidad del anticuerpo BAF2616, se utilizó el dominio extracelular recombinante de TLR2 humano (2616TR, R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA).

Los siguientes reactivos fueron utilizados: cóctel de inhibidores de proteasas (Roche® Applied Science, Indianápolis, IN, USA), inhibidores de fosfatasas (ortovanadato de sodio, pirofosfato de sodio y fluoruro de sodio), inhibidores de metaloproteasas (fenantrolina (Calbiochem, Alemania)), GM6001 (Chemicon, Temecula, CA, USA)), estreptavidina conjugada con peroxidasa (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), proteína A/G sefarosa (sc-2003 Santa Cruz, CA, USA), PNGasaF (New England Biolabs, Massachusetts, USA), reactivo de Bradford (BioRad, Hercules, CA, USA), reactivo de revelado ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK), 2-mercaptoetanol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), PMA (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), penicilina/estreptomicina (Cat. N° 15140-122, Gibco, Carlsbad, CA, USA), suero fetal bovino (Thermoscientific Hyclone, South Logan, UT, USA), marcador de PM de proteínas (RPN 800E, Amersham Little Chalfont, UK) y Tween-20 (Calbiochem, Alemania).

4.- Extracción y cuantificación de proteínas

Para la determinación de TLR2 por inmunoblot, se utilizaron 1×10^6 células/ml, las cuales fueron lavadas 2 veces con PBS 1X frío (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 1,4 mM KH_2PO_4). Posteriormente, las células y las resecciones quirúrgicas de mucosa intestinal se lisaron sobre hielo con 150 μl de tampón LDB (del inglés "*low detergent buffer*": 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, y 0,5% Tritón X-100), en presencia de inhibidores de proteasas, fosfatasas (100 nM de ortovanadato de sodio, 10 mM de pirofosfato de sodio y 10 mM de fluoruro de sodio) y metaloproteasas (10 mM de fenantrolina, 10 μM de GM6001). Después de 15 min, el contenido se traspasó a un tubo y se sometió a sonicación (sonicador de vástago

Microsan, Misonix Inc., Farmingdale, NY, USA) 3 veces a 14 watts por 10 s y a 4°C. La suspensión se centrifugó a 14000 rpm, 5 min a 4°C, recuperándose el sobrenadante. La cuantificación del contenido de proteínas en los homogeneizados celulares y de las muestras de mucosa intestinal se realizó por el método de Bradford, con la posterior determinación de la absorbancia a 595 nm (Bradford 1976).

5.- Inmunoblot

Las muestras se mezclaron con un volumen de tampón de carga 4X (SDS, tampón de muestra, 2-mercaptoetanol y azul de bromofenol) y fueron calentadas a 100°C por 5 min. 50 µg de homogeneizado de proteínas totales de las células THP-1 o 75 µl de los sobrenadantes de las células (volumen máximo contenido en el pocillo del gel de poliacrilamida, sin cuantificación de los µg cargados) se utilizaron para cargar los geles de poliacrilamida. Para los sobrenadantes no se cuantificó el contenido de proteína, ya que el contenido de TLR2 es escaso, por lo tanto, un volumen mayor de carga permitió su detección. Para la detección de TLR2 en las muestras de mucosa intestinal se utilizaron 35 µg de proteínas totales.

Geles de poliacrilamida SDS al 12% fueron corridos a 80 V por 30 min y luego a 125 V por 1,5 h. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa con poro de 0,45 µm (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) a 300 mA por 1,5 h. Para verificar la transferencia de las proteínas cargadas, las membranas fueron teñidas momentáneamente con rojo Ponceau al 1%. Posteriormente, las membranas fueron lavadas 5 veces por 5 min en TBS 1X (5M NaCl, 1M Tris/HCl pH 7,5). El bloqueo de la biotina intrínseca en la muestra de proteínas totales de mucosa intestinal, fue realizado con clara de huevo filtrada (diluida 1:2 en TBS 1X), por 30 min con agitación, seguido por el bloqueo de caseína, con leche descremada al 5% en TBS 1X por 1 h con agitación. Las membranas se lavaron 5 veces por 5 min con TBS 1X-Tween-20 0,1% con agitación y luego fueron incubadas con anticuerpos primarios (1:1000) durante toda la noche a 4° C con agitación orbital. Posteriormente, las membranas se lavaron 5 veces 5 min con TBS1X-Tween-20 0,1%. En el caso del anticuerpo primario biotinilado, las membranas se incubaron con

estreptavidina-HRP diluida 1:1000 en TBS 1X-Tween-20 0,1% por 20 min con agitación. Para los demás anticuerpos primarios, el anticuerpo secundario-HRP correspondiente se incubó por 1 h con agitación. A continuación, las membranas se lavaron 5 veces 5 min en TBS 1X-Tween-20 0,1% y fueron incubadas con el reactivo quimioluminiscente ECL para detectar las bandas inmunoreactivas de TLR2. Finalmente, las membranas fueron expuestas en placas autorradiográficas para bioluminiscencia (KODAK®, USA) y el análisis densitométrico de las bandas fue realizado con el programa Gel Pro Analyzer 4.5 Media Cybernetics, Inc., USA.

6.- Inmunoprecipitación

Trescientos µg de proteínas totales de mucosa intestinal (proveniente de un paciente con CU) fueron utilizados para la inmunoprecipitación (IPP). 5 µl de suero normal del animal donde fue producido el anticuerpo fueron agregados a la IPP para disminuir la inespecificidad de unión de los anticuerpos. De esta forma, suero normal de ratón y de cabra fueron usados para el anticuerpo anti-dominio extracelular de TLR2 (eBioscience), y para el anticuerpo anti-péptido de 19 aminoácidos carboxilo-terminal de TLR2 (Santa Cruz), respectivamente. La mezcla fue incubada durante 15 min a 4°C con agitación orbital, y luego se agregaron 20 µl de proteína A/G agarosa por 1 h a 4°C. Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm por 5 min a 4°C, recuperando el sobrenadante. Las muestras fueron inmunoprecipitadas con 2 µg de anticuerpo (con el anticuerpo anti-amino-terminal de TLR2 (eBioscience) y con el anti- 19 aminoácidos del carboxilo-terminal (C-19 Santa Cruz)), con una incubación de toda la noche a 4°C, con agitación orbital. Posteriormente, 20 µl de proteína A/G agarosa fueron agregados e incubados por 1 h a 4°C con agitación orbital. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas a 14000 rpm por 5 min a 4°C, y los IPPs se lavaron 4 veces con PBS1X, para su posterior análisis mediante inmunoblot.

7.- Desglicosilación de proteínas

La muestra de proteínas totales de células fueron desglicosiladas mediante el tratamiento con la enzima PNGasaF que remueve las glicosilaciones complejas del amino-terminal ricas en manosa. 25 µg de proteínas totales fueron denaturadas a 100° C por 10 min en tampón de denaturación. A la muestra de reacción se agregó 1 µl de tampón de reacción "G7", 1 µl de NP-40 10% y 0,3 µl de la enzima PNGasaF, y se incubó a 37° C por 1 h. Las muestras fueron guardadas a -80° C hasta el análisis por inmunoblot.

8.- Concentración y ultracentrifugación de sobrenadantes celulares

Las células monocíticas THP-1 (control) y macrófagos diferenciados (1×10^6 células/ml), fueron cultivados de 18 a 24 h, en ausencia de suero. Los sobrenadantes fueron obtenidos y concentrados 10 veces mediante centrifugación a 1200 rpm a 4°C por 5 min (para eliminar la posible presencia de células). Luego, los sobrenadantes fueron filtrados a través de un poro de 0.22 µm (para eliminar el debris celular) en hielo. Para mantener la integridad de la muestra de proteínas, se agregó un cóctel de inhibidores de proteasas, diluido en PBS 1X y 0.1% de NP-40. Cuatro ml de sobrenadantes fueron colocados sobre filtros Amicon (Millipore, Billerica, MA, USA) y centrifugados a 4000 g por 10 min. Luego, para solubilizar las proteínas y colectar el concentrado, las muestras fueron calentadas a 37°C por 2 min y los sobrenadantes concentrados fueron centrifugados a 10000 g por 30 min a 4°C, y posteriormente a 120.000 g por 1 h a 4°C. Los sobrenadantes fueron colectados cuidadosamente y el precipitado fue resuspendido en PBS 1X (en presencia de inhibidores de proteasas) y congelado a -80 °C.

9.- ELISA

En todos los ensayos se utilizaron placas de 96 pocillos Nunc ® Immunosoport de fondo tipo F (plano) MaxiSorp®. Para la detección de TLR2 en muestras de plasma y

mucosa intestinal de pacientes, se utilizó el ELISA *sandwich* (cat. N° DY2616, DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), el cual utiliza como sistema de detección la estreptavidina-HRP. El límite de detección para TLR2 fue de 66 pg/ml. Para la detección de TNF- α e IL-10 en muestras de mucosa intestinal, también fueron utilizados ELISA *sandwich* (cat. N° 88-7346 y N° 88-7106, eBioscience, San Diego, CA, USA respectivamente).

10.- Estadística

Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa Graph Pad Prism 5 (La Jolla, CA, USA). Para la comparación de los niveles de TLR2 en los tres grupos en estudio (controles, CU y EC) se utilizó el test no-paramétrico de Kruskal-Wallis, con la comparación posterior de pares individuales de grupos utilizando el test de Duns (con 5% de significancia). Para la comparación de dos grupos se utilizó el test de Mann Whitney (con 5% de significancia). Para los análisis de correlación se utilizó el Coeficiente de Correlación de Spearman (r). Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

1. Estandarización del proceso de extracción de proteínas totales de muestras quirúrgicas para detectar TLR2 mediante inmunoblot

Debido a que el método de extracción de proteínas utilizado en células produjo un bajo rendimiento en muestras de mucosa intestinal humana, y por consiguiente, una deficiente visualización de TLR2 mediante inmunoblot, se estandarizó el procedimiento que se describe a continuación. Las muestras de mucosa intestinal congeladas (de 0,5 cm² aprox.) fueron pulverizadas en un mortero y homogenizadas en tampón LDB en presencia de inhibidores de proteasas, fosfatasas y metaloproteasas a 4°C. Los homogeneizados fueron pasados 3 veces por una jeringa tuberculina para disgregar los trozos de tejido de mayor tamaño. La ruptura mecánica se llevó a cabo por 5 ciclos de congelamiento-descongelamiento sobre hielo seco y a temperatura ambiente, respectivamente. La suspensión se centrifugó a 14.000 rpm por 5 min a 4°C, recuperando el sobrenadante y finalmente las muestras fueron alicuotadas y guardadas a -80°C hasta su utilización (Figura 4 y Tabla 2). En la Tabla 2 se muestran las características de las proteínas obtenidas al aplicar este método.

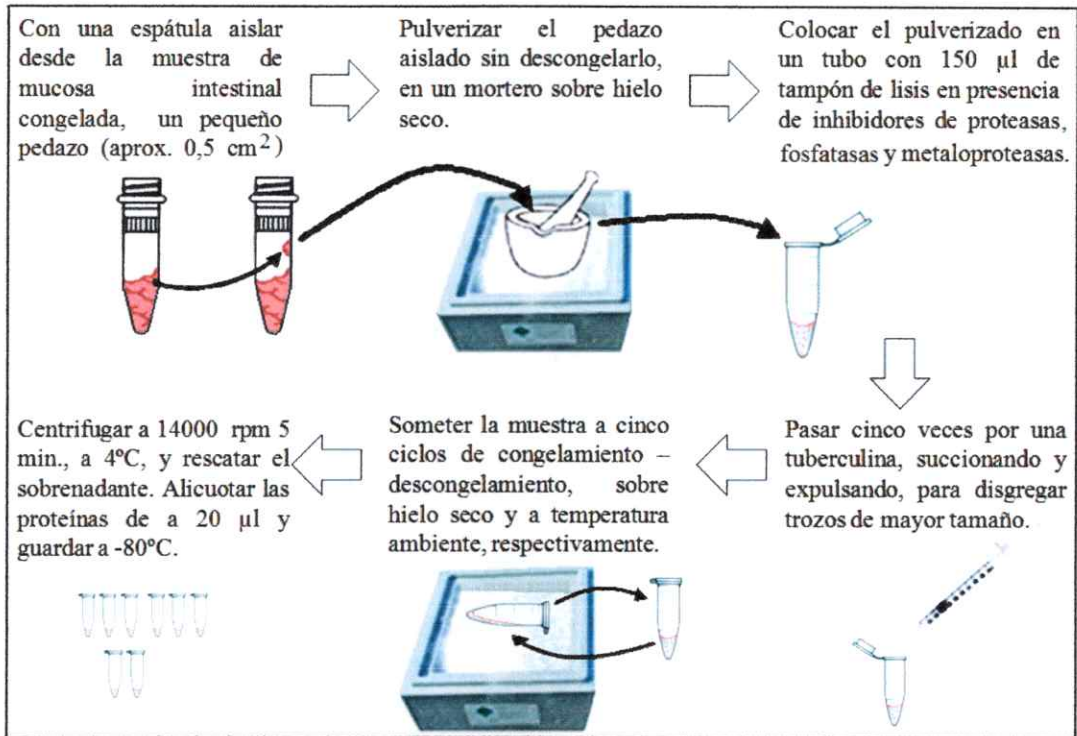


Figura 4. Proceso de extracción de proteínas de mucosa intestinal humana. Las muestras congeladas fueron trituradas en hielo seco disminuyendo la probabilidad de la degradación de las proteínas. La disgregación de la muestra se realizó a través de una jeringa tuberculina y la ruptura celular fue realizada por ciclos de congelamiento-descongelamiento, lo cual resultó ser más eficiente que el proceso de sonicación.

Tabla 2. Características del extracto proteico de mucosa intestinal humana *

Tamaño de la muestra a procesar	0,5 cm ²
Volumen de tampón de lisis en presencia de inhibidores de proteasas, fosfatasas y metaloproteasas	150 µl
Concentración de proteínas promedio obtenida	8 µg/µl
Estabilidad de la muestra a temperatura ambiente	Baja
Integridad post- descongelamiento	Baja
Duración de la muestra íntegra guardada a -80 °C.	2 meses

*Los datos mostrados corresponden al valor promedio de 6 muestras de mucosa intestinal, 2 muestras de cada condición (CU, EC y controles). El parámetro para la determinación de la integridad de las muestras y la duración del tratamiento, fue la detección de TLR2 por inmunoblot en el período establecido de 2 meses.

2. Determinación de la especificidad de anticuerpos utilizados para detectar TLR2 en muestras de mucosa intestinal y de plasma humano

Para la detección de las variantes de sTLR2 en muestras de mucosa intestinal, se utilizaron cuatro anticuerpos anti-dominio amino-terminal, y uno anti-dominio carboxilo-terminal de TLR2. En el caso de las muestras provenientes de biopsias, la detección de TLR2 no fue posible con los anticuerpos utilizados mediante inmunoblot (datos no mostrados) debido al tamaño de las muestras analizadas. Por lo tanto, el análisis realizado se utilizó sólo en muestras de resecciones quirúrgicas.

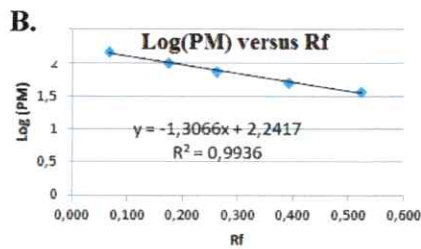
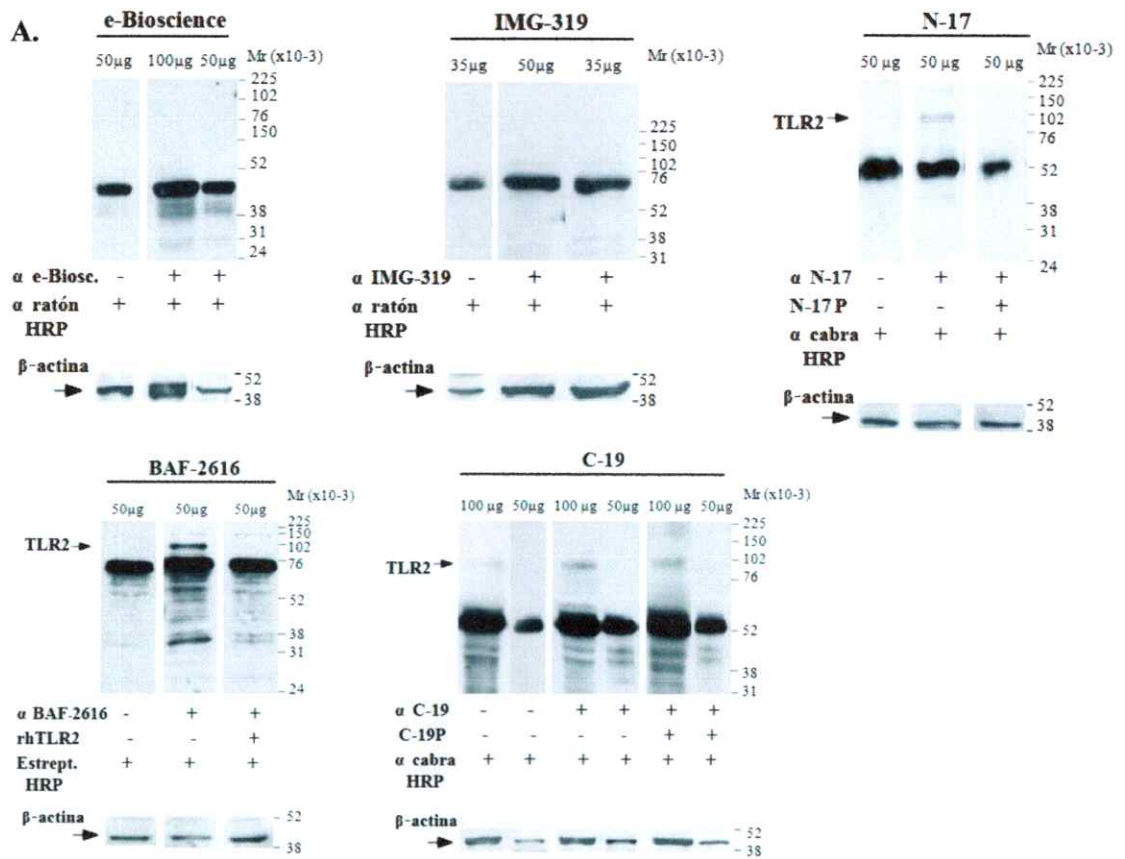
Los anticuerpos anti-dominio amino-terminal (extracelular) permiten la identificación de las variantes de sTLR2 y de la forma transmembrana, ya que ambas comparten este dominio proteico. Los anticuerpos utilizados fueron anticuerpos monoclonales de eBioscience (clon 2.1) y de Imgenex (IMG-319), y anticuerpos policlonales de Santa Cruz (N-17) y el de R&D Systems (BAF-2616 (biotinilado)). Los primeros tres anticuerpos mencionados requieren para su detección un anticuerpo secundario acoplado a HRP, mientras que el último utiliza estreptavidina-HRP. Una banda específica para TLR2 de 97 kDa sólo fue detectada con los anticuerpos anti-N-17 (detección muy débil) y el anticuerpo biotinilado BAF-2616 (marca más notoria) (Figura 5A, flecha negra). Los resultados sugieren que la expresión de TLR2 es muy baja en la mucosa intestinal. La banda de TLR2 posee un PM de 97 kDa, calculado por interpolación en la recta resultante del gráfico de Log(PM) versus migración relativa (Rf) (Figura 5B). Para asegurar la identificación de TLR2 en los ensayos posteriores, se utilizó el anticuerpo biotinilado (BAF-2616), cuyo sistema de detección es estreptavidina-HRP, el cual amplifica la señal más que un anticuerpo secundario acoplado a HRP, ya que la unión de biotina: estreptavidina es de 1:4, aumentando cuatro veces más la señal.

El anticuerpo que reconoce los 19 aminoácidos del carboxilo-terminal (C-19) de TLR2 (dominio intracelular) permite la identificación de TLR2 unido a membrana, ya que sólo esta variante presenta éste dominio. En la mucosa intestinal, el anticuerpo C-19 detectó la misma banda de 97 kDa que los anticuerpos anti-dominio amino-terminal de

TLR2. Sin embargo, la detección con el anticuerpo C-19, no es completamente específica, ya que los controles en los cuales se omite el anticuerpo primario, o cuando se desplaza la inmunoreactividad de TLR2 con el péptido (C-19P), el anticuerpo detecta la misma banda de 97 kDa (Figura 5A, flecha negra).

Reportes anteriores mostraron la detección de las variantes de sTLR2 en muestras de plasma de individuos sanos, con PM de 25, 38, 40, 66 y 83 kDa. El objetivo de este trabajo, era detectar sTLR2 en plasma de individuos con EII y controles. Para lo cual se utilizaron dos anticuerpos anti-dominio amino-terminal (N-17 y BAF-2616) que permitieron la identificación de TLR2 en mucosa intestinal, mostrando un patrón de bandeo muy similar al reportado anteriormente (LeBouder, Rey-Nores et al. 2003). Sin embargo, los resultados mostraron que esta detección correspondió a la identificación inespecífica según los controles realizados (Figura 5C). El anticuerpo C-19 tampoco permitió la detección específica de TLR2 en plasma (Figura 5C), lo cual era predecible ya que el contenido de la forma de membrana de TLR2 estaría presente en las células y no en plasma.

Interesantemente al utilizar los anticuerpos N-17, BAF-2616 y C-19, aparece una banda de 150 kDa aproximadamente en muestras de mucosa intestinal y de plasma, la cual corresponde a una banda inespecífica, ya que también aparece en los controles en donde se utilizó sólo el anticuerpo secundario-HRP (anticuerpo BAF-2616). Estos resultados permiten concluir que los anticuerpos anti-dominio amino-terminal (N-17 y BAF-2616) y anti-dominio carboxilo-terminal (C-19) permiten la detección de TLR2 en mucosa intestinal humana.



	Rf	Log(PM)	PM (kDa)
TLR2	0,195	1,986	96,8

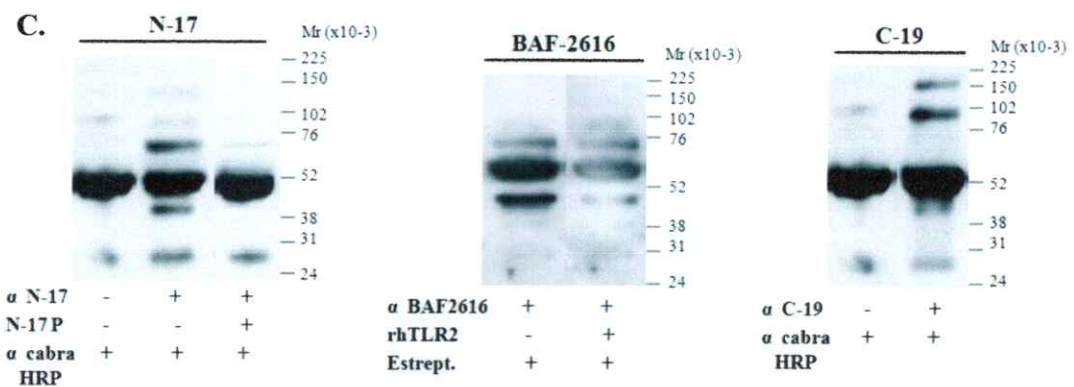


Figura 5. Inmuno-detección de una banda de 97 kDa correspondiente a TLR2 en mucosa intestinal. La especificidad de los anticuerpos fue confirmada mediante el control que carece del anticuerpo primario, y además por el desplazamiento de la unión con el péptido correspondiente a cada anticuerpo (5 veces: masa de péptido/anticuerpo primario). Los anticuerpos y la cantidad de proteína total utilizada de homogenizado de tejido se indican en la figura. **A.** Detección de TLR2 en mucosa intestinal con distintos anticuerpos dirigidos al dominio amino-terminal (eBioscience, IMG-319, N-17, BAF-2616) y al carboxilo-terminal (C-19) de TLR2. Se utilizó β -actina como control de carga. **B.** Determinación del PM de TLR2 identificado en mucosa intestinal con el anticuerpo BAF-2616, mediante interpolación en la recta de Log(PM) versus migración relativa (Rf). El valor obtenido del PM fue de 97 kDa. **C.** El contenido de TLR2 en muestras plasmáticas fue detectado sólo con el anticuerpo N-17. Se realizaron tres experimentos independientes con muestras de CU, EC y controles. Sólo se muestran los resultados obtenidos a partir del uso de muestras de un paciente con CU. α : anti-. Mr: masa relativa. N-17P: péptido de 17 aminoácidos del amino-terminal de TLR2. Estrept.: estreptavidina. rhTLR2: proteína recombinante humana del dominio extracelular de TLR2. C-19P: péptido de los 19 aminoácidos del carboxilo-terminal de TLR2.

3. Especificidad de la detección de TLR2 en mucosa intestinal humana

La mejor detección de TLR2 en muestras de mucosa intestinal se obtuvo al usar el anticuerpo policlonal biotinilado BAF-2616. Este anticuerpo permitió la detección de una banda específica de TLR2 de 97 kDa pero además detectó varias bandas inespecíficas, entre ellas un duplete de 73 kDa aproximadamente y bandas de bajo PM. Estas últimas bandas podrían corresponder a uniones inespecíficas de los dominios Fc de los anticuerpos acomplejados a una proteína recombinante humana de TLR2 (rhTLR2) que poseen una alta afinidad por la membrana de nitrocelulosa (Figura 6A). Para dilucidar este planteamiento, las muestras proteicas, conteniendo los anticuerpos y la proteína rhTLR2 se incubó con proteína A/G agarosa, la cual tiene una alta afinidad por el dominio Fc de los anticuerpos, y por lo tanto, los complejos formados deberían ser precipitados. Sin embargo, esta suposición fue descartada, ya que la intensidad de las bandas inmunoreactivas de bajo PM no disminuyeron (Figura 6B, lado izquierdo). La unión inespecífica de proteínas endógenas biotiniladas se bloqueó con avidina, presente en la clara de huevo (más leche al 5%), lo cual disminuyó considerablemente las bandas de bajo PM, comparado con el bloqueo sólo con leche al 5% (Figura 6B, lado derecho comparado con el izquierdo).

Entre las bandas detectadas en las muestras de mucosa intestinal, se observó un duplete de 73 kDa, el cual según el uso de controles correspondería a bandas inespecíficas. Sin embargo, la migración de la proteína recombinante correspondiente al dominio extracelular de TLR2, posee un PM muy cercano de 75 kDa (Figura 6C). Este resultado indica que el duplete de 73 kDa podría estar enmascarado por la detección inespecífica de otras proteínas biotiniladas de mucosa intestinal, con una migración similar a la del dominio extracelular de TLR2. Estos resultados permiten concluir que el anticuerpo anti-dominio amino-terminal BAF-2616, identifica específicamente sólo a una banda de TLR2 de 97kDa en mucosa intestinal.

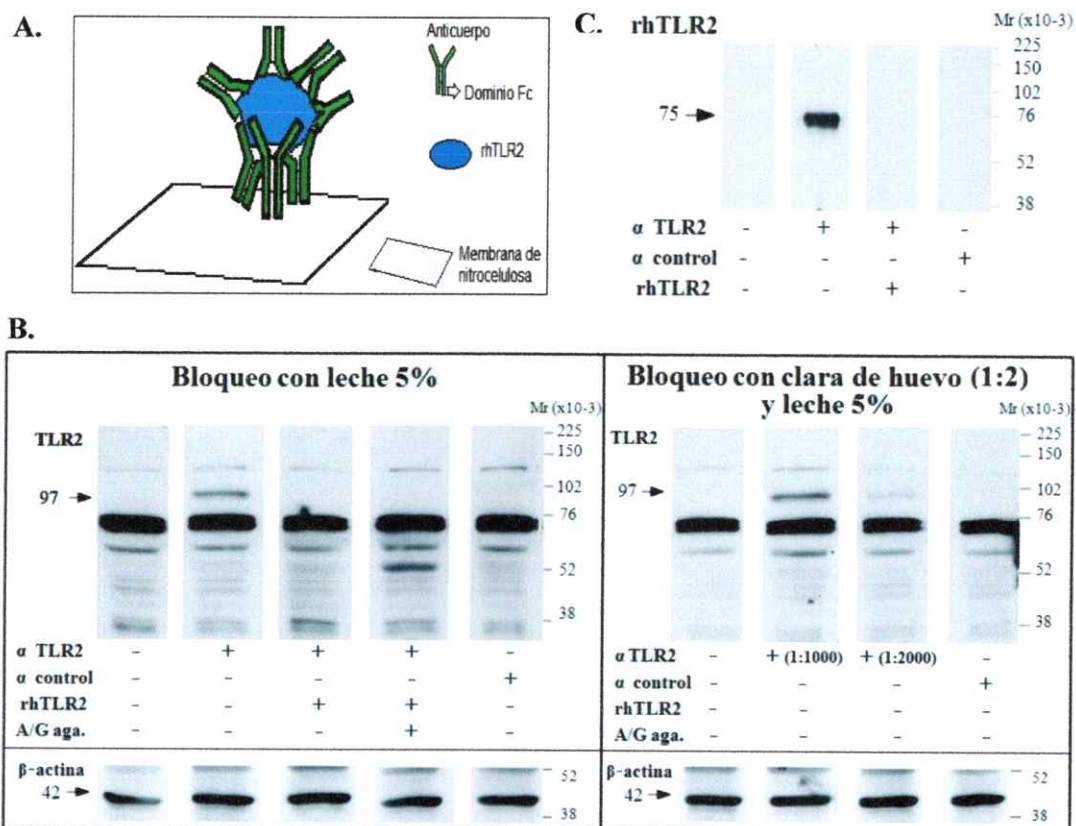


Figura 6. Especificidad del anticuerpo biotinilado BAF-2616 y condiciones experimentales para detectar TLR2. **A.** Esquema representativo de la unión de los anticuerpos a una molécula de rhTLR2 a la membrana de nitrocelulosa (por medio de su dominio Fc). **B.** Detección de una banda inmunoreactiva específica de TLR2 de 97 kDa en mucosa intestinal en un extracto de proteínas (35 μ g). El bloqueo de la biotina endógena con clara de huevo (1:2) previo al bloqueo con leche 5%, disminuye notoriamente las bandas inespecíficas de bajo PM. Las bandas inespecíficas siguieron apareciendo cuando el anticuerpo fue pre-incubado con 15 veces más masa de rhTLR2/anticuerpo primario y cuando se incubó en ausencia del anticuerpo primario. Los ensayos mostrados corresponden a la muestra de mucosa intestinal proveniente de un paciente con CU. Este ensayo fue realizado en 5 experimentos independientes (CU n=3, EC n=2, control n=1). **C.** Ensayos de especificidad para la detección de la proteína rhTLR2 (10 ng), con un PM de 75 kDa. Este ensayo fue realizado 3 veces. α : anti-. Mr: masa relativa. α control: anticuerpo control de isotipo: anticuerpo anti-ST2 biotinilado (IgG), producido en el mismo animal en que se produjo el anticuerpo anti-TLR2. rhTLR2: proteína recombinante humana del dominio extracelular de TLR2. A/G aga.: proteína A/G agarosa. Estrept.: estreptavidina.

4. Identificación de TLR2 de membrana en mucosa intestinal humana

Se ha demostrado un amplio rango del PM para las diferentes variantes de TLR2. TLR2 de membrana fue detectado anteriormente por inmunoblot en mucosa intestinal de pacientes pediátricos con EII, con un PM de 90 kDa (Szebeni, Veres et al. 2008). Mientras que las variantes solubles se han reportado en plasma, leche materna, líquido amniótico y saliva, con un rango de PM entre 25 y 80 kDa (LeBouder, Rey-Nores et al. 2003; Kuroishi, Tanaka et al. 2007; Dulay, Buhimschi et al. 2009).

Para demostrar que la banda identificada de 97 kDa corresponde al TLR2 de membrana, se realizaron los siguientes ensayos. Se comparó el PM calculado por la secuencia aminoacídica de TLR2 con el PM detectado por inmunoblot de la proteína glicosilada y desglicosilada. Además se determinó la detección de TLR2 en sobrenadantes celulares ultracentrifugados y en inmunoprecipitaciones (IPPs) con los anticuerpos anti-dominio amino-terminal y carboxilo-terminal de TLR2 en la mezcla de proteínas totales (Figura 7). La proteína TLR2 presenta cuatro sitios de glicosilaciones en el extremo amino-terminal, las cuales son necesarias para el tráfico vesicular de la proteína y su inserción en la superficie (Weber, Morse et al. 2004). Para determinar el PM de TLR2 más las glicosilaciones, se utilizaron extractos proteicos de células THP-1 diferenciadas a macrófagos, debido a que la detección de TLR2 en éstas células es comparable a la detección en mucosa intestinal (Figura 7A; 95 y 97 kDa, en monocitos y mucosa intestinal, respectivamente). La proteína TLR2 desglicosilada tiene un PM de 86 kDa, de esta forma, el PM otorgado por las glicosilaciones fue de aproximadamente 9,5 kDa (Figura 7A). Posteriormente, el PM teórico correspondientes a la secuencia aminoacídica de los diferentes dominios de TLR2 fueron calculados utilizando tres programas disponibles en la web (Tabla 3). Una vez obtenidos los PMs para la secuencia aminoacídica, se sumaron los 9,5 kDa otorgados por las glicosilaciones al dominio extracelular, obteniéndose un PM de 73,7 kDa. Este PM fue muy similar a las bandas dupletes de alrededor de 73 kDa detectados en mucosa intestinal. La detección específica está enmascarada por proteínas biotiniladas endógenas con la misma migración relativa, y equivalente al PM experimental de la rhTLR2 de 75 kDa. Para la

proteína completa, la suma del PM de la secuencia aminoacídica con el PM de las glicosilaciones, fue de 97,27 kDa, lo cual fue muy similar al PM detectado experimentalmente en monocitos y mucosa intestinal, de 95,5 y 97 kDa, respectivamente (Tabla 3).

Para determinar si la variante de TLR2 de 97 kDa se encuentra unida a membrana, se realizó una ultracentrifugación de los sobrenadantes de los monocitos THP-1 y se detectó una banda inmunoreactiva de 97 kDa correspondiente a TLR2 en el precipitado de los sobrenadantes ultracentrifugados (Figura 7B). Esta detección podría sugerir la posibilidad de que la forma de membrana de TLR2 se encuentre en endosomas que permanecen en los sobrenadantes posterior a la ultracentrifugación.

Para optimizar la identificación de las variantes de sTLR2 y de membrana en mucosa intestinal, el extracto inmunorreactivo se enriqueció mediante IPP utilizando el anticuerpo dirigido contra el amino-terminal y el carboxilo-terminal de TLR2. Ambas IPPs enriquecieron sólo la variante de 97 kDa (Figura 7C). Como control de las IPPs, se realizó la carga de los sobrenadantes de las IPPs (rotulado como A en la Figura 7C), en la cual no aparece la banda de 97 kDa, corroborando así la eficiencia de la IPP y la especificidad en la detección. Estos resultados permiten concluir que en mucosa intestinal humana sólo es identificable específicamente el TLR2 de membrana con el anticuerpo BAF-2616.

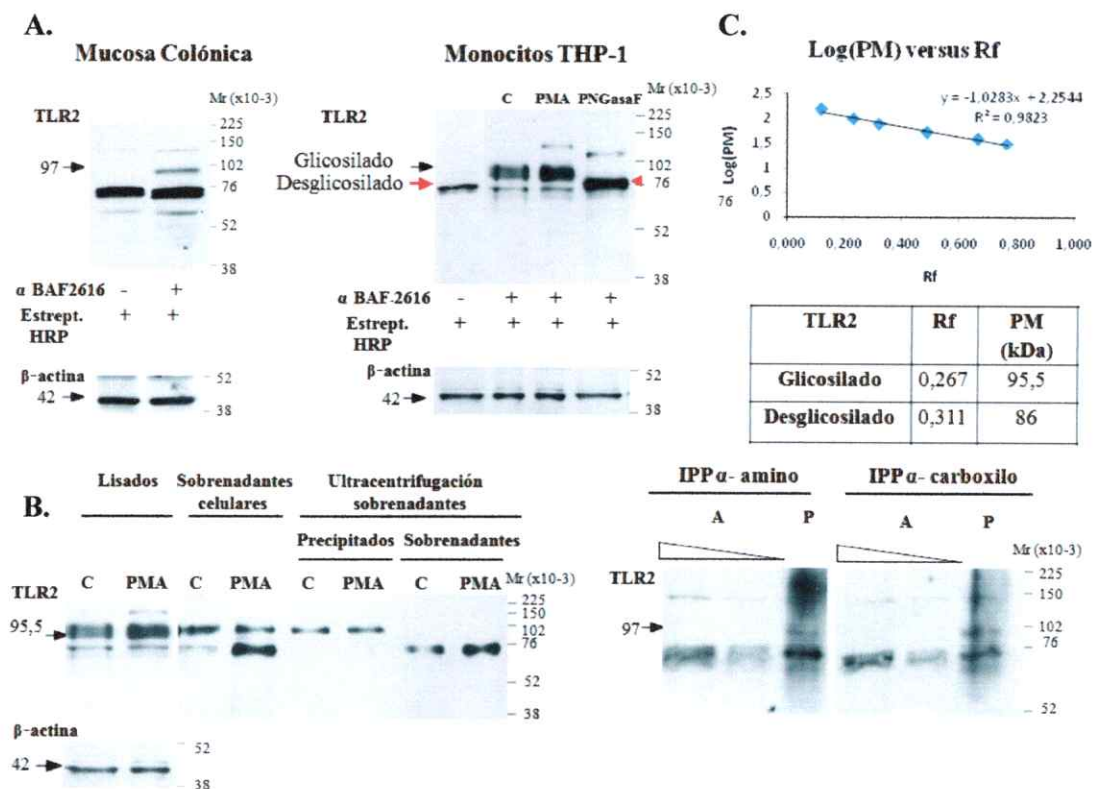


Figura 7. Identificación de TLR2 de membrana en mucosa intestinal y en medio condicionado de monocitos. **A.** La detección de TLR2 en mucosa intestinal (97 kDa) es comparable a la obtenida en muestras proteicas de monocitos THP-1 control (C) y diferenciados a macrófagos con PMA (95,5 kDa). La desglicosilación con PNGasaF en el extracto proteico de monocitos control muestra una banda de 86 kDa (flecha roja). Los PM fueron deducidos por interferencia en el gráfico del Log(PM) versus Rf. **B.** Detección de TLR2 de membrana (95 kDa) en los sobrenadantes y en los precipitados de la ultracentrifugación de sobrenadantes de monocitos, es detectado el TLR2 (n= 2, experimentos independientes). **C.** Inmunoprecipitación (IPP) de 300 µg de proteínas de mucosa intestinal, con el anticuerpo anti-amino-terminal eBioscience (IPP α-amino) y con el anticuerpo anti- 19 aminoácidos del carboxilo terminal C-19 (IPP α-carboxilo). El precipitado (P) de ambas IPPs detectan la banda de 97 kDa, confirmando que corresponde a TLR2 de membrana. A partir de la fase acuosa de las IPPs, 35 y 50 µl fueron cargados en los geles (A), y en ambas muestras no se detectó el TLR2 de 97 kDa. La figura es representativa de resultados obtenidos con muestras de pacientes con CU y controles. (n= 2, experimentos independientes).

Tabla 3. Peso molecular teórico y experimental de TLR2 y sus dominios.

TLR2	PM (kDa) teórico Calculado por sec. aa. *	PM (kDa) por sec. aa. más PM por glicosilaciones**	PM (kDa) experimental obtenido por immunoblot
Forma completa (aa. 19 – aa. 781)	87,77	97,27	97 (mucosa intestinal) 95,5 (monocitos)
Dominio extracelular (aa. 19 – aa. 586)	64,19	73,70	75 (rhTLR2)
Dominio transmembrana (aa. 587 – aa. 639)	6,22	-	-
Dominio intracelular (aa. 640 – aa. 784)	17,40	-	-

* El PM teórico fue calculado por la secuencia aminoacídica (sec. aa.) de TLR2 humano (número de acceso: AAH33756.1). Se muestra el promedio de los resultados obtenidos con tres programas disponibles en la web: <http://www.sciencegateway.org/tools/proteinmw.htm>
<http://www.encorbio.com/protocols/Prot-MW.htm>

<http://www.peptideguide.com/peptide-calculator.html>

** El PM otorgado por glicosilaciones en el dominio extracelular terminal amino de TLR2, se calculó experimentalmente y es de 9,5 kDa (Fig. 4A). Este valor fue sumado al obtenido del cálculo teórico.

5. Niveles de TLR2 aumentados en mucosa intestinal y en el plasma de pacientes con colitis ulcerosa

Un total de 28 muestras de pacientes obtenidas mediante cirugía fueron analizadas mediante inmunoblot. De éstas muestras 14 fueron diagnosticadas con CU (50%), 8 con EC (28.6%) y 6 muestras fueron de pacientes sanos a la patología (controles) (21.4%). Algunas de las características demográficas y clínicas de los pacientes analizados se muestran en la Tabla 4. En el grupo de pacientes con CU, la edad promedio fue de 37.8 años (rango 26 - 45); 35.7% fueron mujeres; el 85.7% presentó colitis extensiva y el 14.3% colitis lateral izquierda. Para el grupo de pacientes con la EC, la edad promedio fue de 39.3 años (rango 29 - 58); 62.5% fueron mujeres; el 37.5% de los pacientes tenía afectado el ileon; el 25% el colon; el 25% la región ileo-colónica y el 12.5% la región ileo-cecal. De los pacientes control, la edad promedio fue de 66 años (rango 64 - 68); 50% fueron mujeres. Se excluyeron del grupo control pacientes con manifestaciones inflamatorias extra-intestinales. La localización de la zona dañada fue en su mayoría en el colon de pacientes con CU, pero para la EC fue mucho más variable, abarcando en algunos casos el último segmento del intestino delgado (ileon) y/o el intestino grueso (colon). El análisis en este estudio, se encuentra determinado por las condiciones inflamatorias propias de cada patología, por lo que las diferencias entre el intestino grueso y delgado, en cuanto a estructura y representación celular, no fueron consideradas. La agrupación fue según CU o EC, independiente de la actividad de ésta. El análisis de los casos por actividad versus inactividad de las EII, sólo fue posible para la CU, ya que no había un mínimo de pacientes inactivos para el estudio estadístico en el caso de la EC.

Para determinar la saturación de la detección de los niveles proteicos de TLR2, en muestras de mucosa intestinal humana, cantidades crecientes de proteínas totales (15, 25, 35 y 50 µg), provenientes de un paciente con CU fueron cargadas. Esto se realizó para evitar el error asociado a la semi-cuantificación de bandas saturadas, lo cual provocaría una subestimación de los niveles reales a comparar. Los resultados indicaron que 35 µg de proteína permitió la detección de TLR2 sin saturación (Figura 8A). Esto se

representa claramente en el gráfico de densidad óptica (DO) de TLR2 versus masa de proteína, donde la tendencia lineal se pierde con valores superiores a los 35 μg (Figura 8A, lado derecho). La semi-cuantificación de los niveles de TLR2 de membrana (97 kDa) reveló un aumento significativo en los pacientes con CU con respecto a los pacientes con la EC y a los controles. Las medianas de los niveles de TLR2 para los pacientes con CU, EC y controles fueron de 0.60, 0.24 y 0.31, respectivamente. Las medianas fueron significativamente diferentes entre CU y controles ($p < 0.05$) y entre CU y EC ($p < 0.05$) (Figura 8B y C). La comparación entre los niveles de TLR2 de membrana entre la CU activa (CUa) y CU inactiva (CUi) mostró una expresión de TLR2 que tiende a aumentar en el estado activo, sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas (Figura 8C).

Para determinar los niveles totales de TLR2 (variantes solubles y de membrana), las mismas muestras de mucosa intestinal fueron analizadas mediante ELISA, ya que el anticuerpo utilizado detecta el dominio extracelular y no discrimina por PM. De estos ensayos se obtuvo una tendencia aumentada de los niveles de TLR2 total en CU con respecto a la EC y controles, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Figura 8D). No obstante, al aumentar el número de pacientes analizados mediante ELISA, dentro de los cuales se encuentra el análisis de muestras de resecciones quirúrgicas y de biopsias, los niveles totales de TLR2 obtenidos fueron significativamente elevados en pacientes con CU con respecto a los pacientes controles ($p < 0.05$) (Figura 8F). El grupo de pacientes con CU analizados mediante ELISA no presentó diferencias significativas entre la enfermedad activa e inactiva en los niveles totales de TLR2 (Figura 8F).

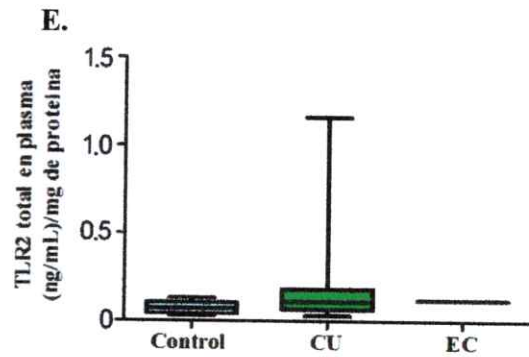
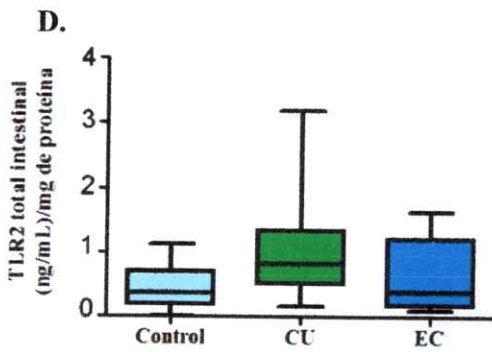
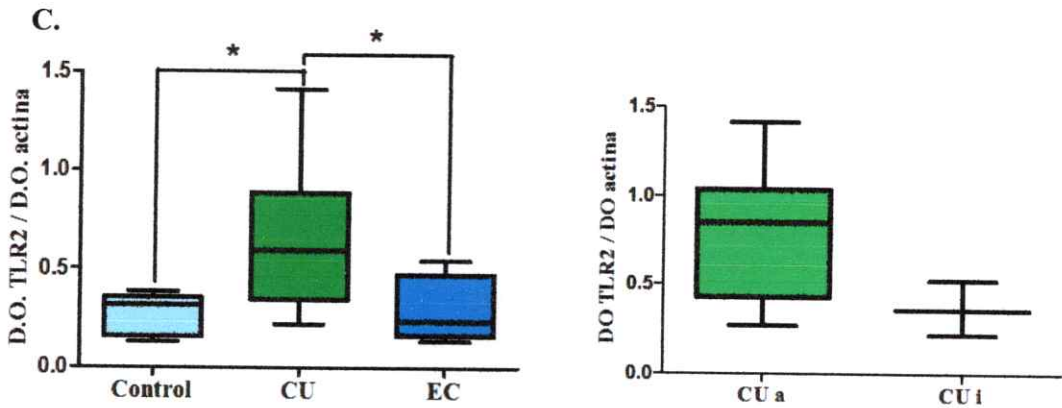
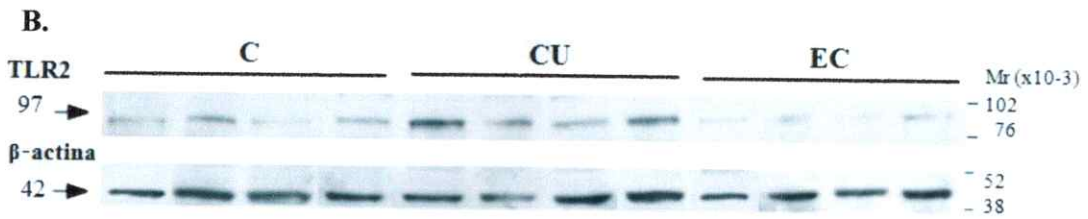
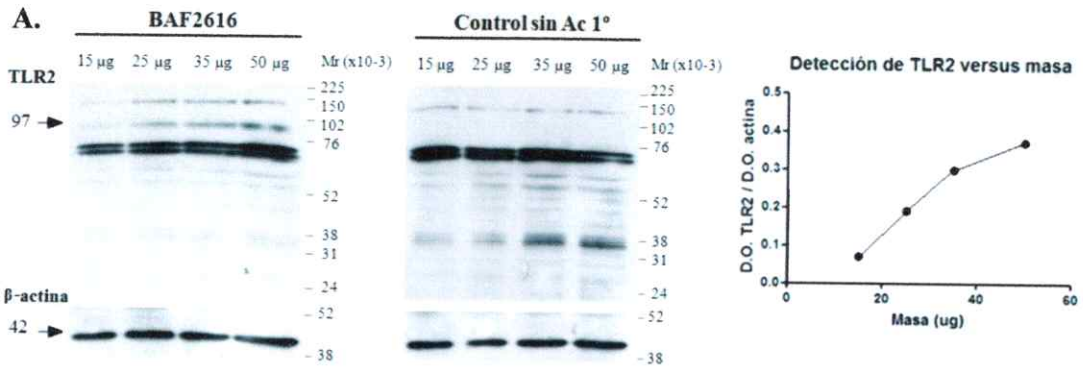
De los pacientes cuyas muestras de mucosa intestinal fueron analizadas por inmunoblot, además se examinaron los niveles plasmáticos de TLR2 total mediante ELISA. Se observó solo una tendencia aumentada en pacientes con CU con respecto a los pacientes controles. Esto puede deberse a que una muestra analizada se aleja de la mediana del grupo (Figura 8E). De estos resultados se concluye que los niveles de TLR2 en la mucosa intestinal de pacientes con CU se encuentran significativamente aumentados con respecto a la EC y controles.

Tabla 4. Características de los pacientes sometidos a cirugía y enrolados en el estudio para análisis mediante inmunoblot.

		Control	EC	CU
n	Pacientes	6	8	14
sexo	Masculino/Femenino	3/3	4/5	9/5
edad	Rango (promedio \pm DE) (años)	64 - 68 (66 \pm 2,8)	29 - 58 (39,3 \pm 10,5)	26 - 45 (37,8 \pm 7,4)
Extensión de la enfermedad*	CU	Extensiva		12
		Lateral izquierda		2
	EC	Ileal		3
		Colónica		2
		Íleo-colónica		2
		Íleo-cecal		1
Actividad**	CU	Índice de Mayo (n° de pacientes inactivos / activos)		5/9
	EC	SES-CD (n° de pacientes inactivos / activos)	1/8	

* La extensión se refiere a los segmentos del intestino afectados.

** Los criterios para la actividad de la enfermedad se muestran en la Tabla 1.



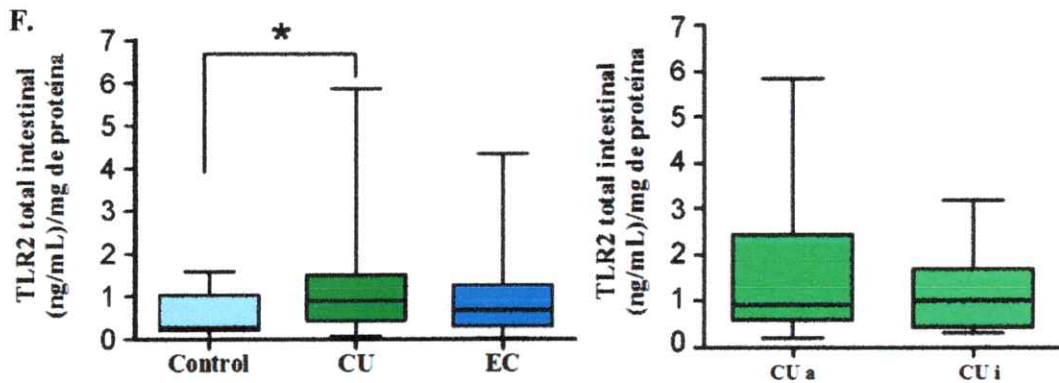


Figura 8. Niveles de TLR2 de membrana aumentados en mucosa intestinal de pacientes con CU. **A.** Estandarización de la masa de proteínas cargadas para determinar la saturación en la detección de TLR2 de membrana (97 kDa). El gráfico muestra la masa de proteína cargada (μg) versus la densidad óptica (DO). Se determinó que con 35 μg de proteínas se obtiene una detección sin saturación. **B.** Figura representativa de la detección de TLR2 de membrana en la mucosa intestinal de resecciones quirúrgicas de pacientes control, con CU y EC. **C.** Semi-cuantificación de los niveles de TLR2 de membrana (97 kDa) normalizada a los niveles de β -actina. Los niveles de TLR2 fueron estadísticamente diferentes entre los grupos ($p = 0.0026$, Kruskal Wallis Test). Los valores de la mediana en la CU fue significativamente mayor comparado con el grupo de EC y control ($* p < 0.05$, Dunn post-test). (Controles $n = 6$, CU $n = 14$, EC $n = 8$). En el panel derecho, se muestra que en la CU activa (CUa) los niveles de TLR2 tienden a aumentar con respecto a la CU inactiva (CUi), sin presentar diferencias significativas (Mann Withney test). **D.** Cuantificación de los niveles totales de TLR2 por ELISA de las mismas muestras de mucosa intestinal analizadas en la Figura 5C. La lectura fue normalizada a la cantidad de proteína total. No se encontraron diferencias significativas (Kruskal Wallis test). **E.** Determinación de los niveles totales de TLR2 por ELISA en plasmas de algunos de los pacientes analizados en la Figura 5C. No se encontraron diferencias significativas (Kruskal Wallis test). (Controles $n = 5$, CU = 10 y EC = 1). **F.** Cuantificación de los niveles totales de TLR2 por ELISA en muestras de resecciones quirúrgicas y biopsias de mucosa intestinal. Al aumentar el número de pacientes se encontraron diferencias significativas en las medianas de los grupos analizados ($p = 0.0066$). Los pacientes con CU presentaron niveles mayores que los controles ($p < 0.05$). Se utilizaron los tests de Kruskal Wallis y Mann Withney, respectivamente (Controles $n = 34$, CU $n = 35$, EC $n = 29$).

6. Marcadores de inflamación en la mucosa intestinal de los pacientes con EII

Para determinar la producción de citoquinas pro- y anti-inflamatorias, los niveles de TNF- α e IL-10 fueron cuantificados mediante ELISA en extractos proteicos de mucosa intestinal en los que se determinó la expresión de TLR2 mediante inmunoblot y ELISA. Los niveles de IL-10 no fueron diferentes entre los grupos analizados (Figura 9A, lado izquierdo). Similarmente, los niveles de TNF- α no presentaron diferencias significativas, pero si una tendencia aumentada en el grupo de EC. Las medianas fueron de 24.28, 16.85 y 34.87 ((pg/mL)/mg de proteína) en controles, CU y EC, respectivamente (Figura 9A lado derecho). Al comparar los niveles de TNF- α e IL-10 en mucosa intestinal en todos los grupos analizados se aprecia que los niveles de TNF- α son mayores en un orden de magnitud con respecto a los de IL-10 (Figura 9A). Esto último sugiere que en el grupo analizado, pequeñas variaciones en las cantidades de IL-10 podrían tener un efecto funcional apreciable, a diferencia de los niveles de TNF- α .

Posteriormente, se determinó la posible asociación entre los niveles de TLR2 totales (detectados mediante ELISA) y los niveles de citoquinas en la mucosa intestinal. Sin embargo, no se encontró una asociación estadísticamente significativa. Aunque el grupo de EC se acerca a una correlación positiva de los niveles totales de TLR2 con TNF- α e IL-10 ($p=0,5075$ y $p=0,2475$, respectivamente) (Figura 9B). Por el contrario, en el caso del grupo de CU pareciera existir una tendencia hacia una correlación negativa entre los niveles totales de TLR2 con TNF- α e IL-10 ($p=0,4563$ y $p=0,7427$, respectivamente) (Figura 9B). Estas observaciones sugieren que podría existir alguna influencia del contexto inflamatorio (determinado por los niveles de citoquinas pro y anti-inflamatorias) en la expresión o estabilidad de TLR2 de manera diferencial para CU y EC, aunque es necesario aumentar el número de pacientes analizados para tener una mayor certeza en los resultados.

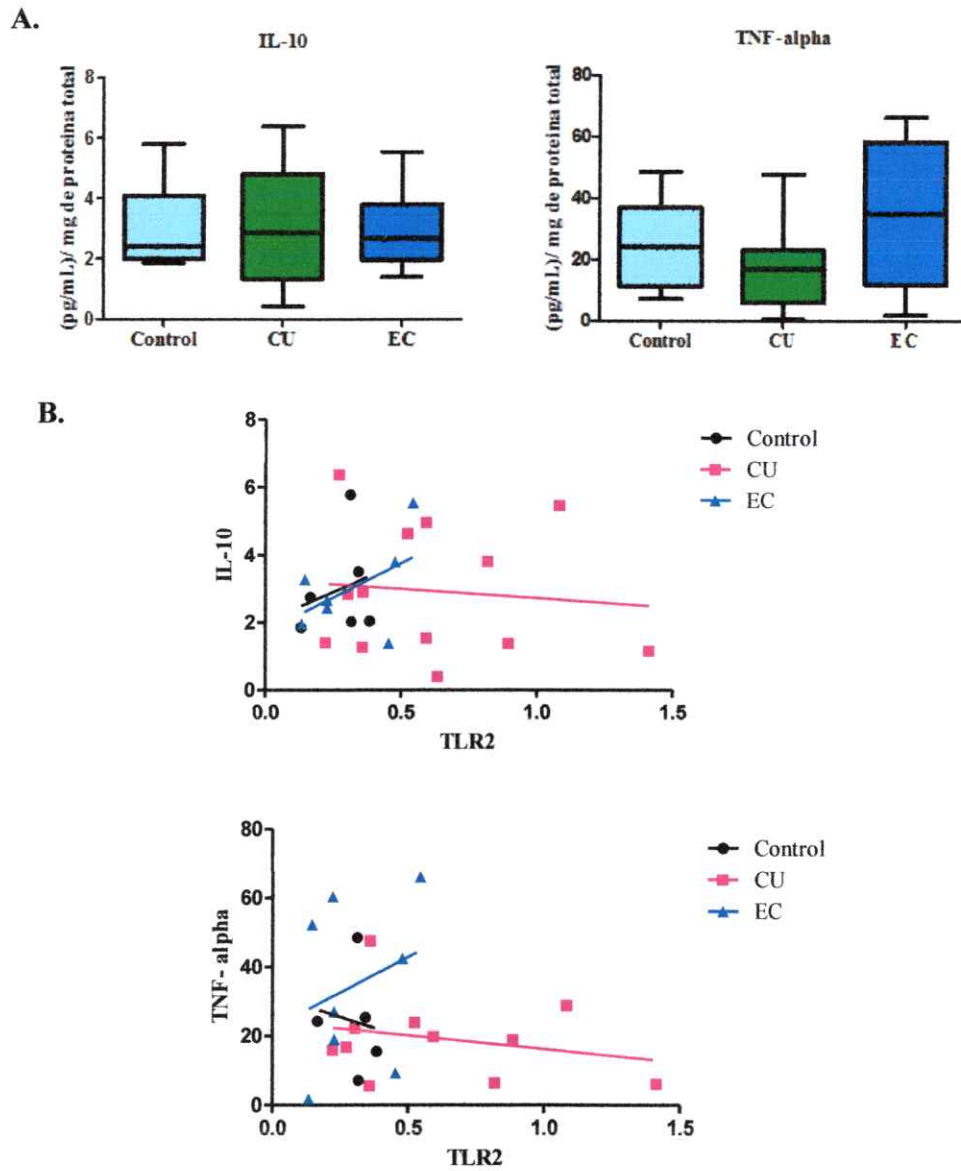


Figura 9. Niveles de IL-10 y TNF- α en mucosa intestinal de pacientes con EII. **A.** Niveles de IL-10 y TNF- α medidos por ELISA en muestras de mucosa intestinal de los pacientes analizados por inmunoblot. Los niveles de cada una de estas citoquinas no presentan diferencias significativas entre los grupos analizados (test de Kruskal Wallis). **B.** Análisis de correlación de Spearman entre los niveles de TLR2 totales y los niveles de IL-10 (lado izquierdo) o entre los niveles de TLR2 totales y los niveles de TNF- α (lado derecho), no mostró asociación significativa para ninguno de los grupos analizados.

RESUMEN DE RESULTADOS

- En la mucosa intestinal se detectó TLR2 de membrana con un PM de 97 kDa.
- Bajo los métodos utilizados (immunoblot y ELISA) no es posible la detección y caracterización de las variantes solubles de TLR2 en la mucosa intestinal y en el plasma de pacientes.
- Los niveles de TLR2 de membrana y totales, están aumentados en mucosa intestinal de pacientes con CU con respecto a pacientes con EC y a pacientes control.

DISCUSIÓN

En este seminario de título se demostró que los niveles de TLR2 de membrana se encuentran aumentados en pacientes con CU respecto a EC y controles. Nuestros resultados muestran una clara asociación entre la expresión de TLR2 con las EII y sugieren que este receptor cumple un papel importante en la fisiopatología de la CU. Una característica que diferencia la CU y la EC se relaciona con la naturaleza del daño en la mucosa intestinal. En el caso de la CU es superficial, con disrupción casi completa de la barrera epitelial (Bouma and Strober 2003), lo cual podría influir en el desarrollo natural de una respuesta protectora. Además, la señalización de la vía intracelular de TLR2 promueve la reparación epitelial y controla procesos celulares, tales como la proliferación, la formación de uniones estrechas y la apoptosis (Cario, Gerken et al. 2007). En cambio este tipo de respuesta protectora vía TLR2, podría no tener el efecto esperado en el caso de la EC, ya que en esta enfermedad existen lesiones profundas que involucran las paredes del intestino y el engrosamiento de la pared intestinal con una infiltración densa de linfocitos y macrófagos (Bouma and Strober 2003).

En un modelo murino de CU inducido por DSS, el papel protector de TLR2 ha sido extensamente estudiado. La barrera epitelial del intestino de estos animales se encuentra interrumpida de manera similar a lo observado en las EII de humanos. De esta forma, la activación de TLR2 ha sido asociada con la reparación epitelial que conlleva a una protección en el desarrollo del proceso inflamatorio (Cario, Gerken et al. 2007). En cambio, en el modelo murino de EC generado a partir de la transferencia de LT efectores a ratones SCID infectados con *H. hepaticus*, se demostró que la activación de TLR2 no participa en el desarrollo de la enfermedad. Adicionalmente, la transferencia de LT deficientes en TLR2, no produjeron cambios en el cuadro inflamatorio en comparación al grupo control (Boulard, Asquith et al. 2010). El papel protector de TLR2 en la barrera epitelial intestinal, sólo sería apreciable en la CU en donde se presenta un daño superficial en la capa epitelial. Por el contrario, en la EC el daño del tejido es más profundo, es decir, más allá de la barrera epitelial, por lo que otros mecanismos serían necesarios para lograr frenar el daño tisular provocado por la inflamación. En relación a

estas observaciones, los resultados obtenidos en este trabajo son equivalentes, en el sentido de que en los pacientes con CU en etapa activa, los niveles de TLR2 de membrana tienden al aumento, con respecto a los pacientes en etapa inactiva (Figura 8C y 8F, lado derecho).

La importancia de TLR2 en las EII también podría asociarse a la etapa de desarrollo de la enfermedad (Mowat 2010). Durante un proceso inflamatorio agudo (una etapa temprana de la enfermedad) las moléculas pro- y anti-inflamatorias serían más efectivos en ejercer su efecto, condicionando así el desarrollo de la enfermedad. Es por esto, que en el modelo de colitis con inflamación aguda inducida por DSS, donde el evento primario de la enfermedad es el daño en el epitelio, la participación de la vía de señalización de TLR2 es muy importante en la progresión de la enfermedad (Mowat 2010). Según Mowat y cols., la similitud entre el modelo murino de EII crónica con la EC humana es un punto crítico, en donde el papel de TLR2 no sería relevante y los daños en el epitelio son secundarios y consecuencia de la desregulación inmune, entre otros mecanismos. Este planteamiento es coherente con los resultados obtenidos en este seminario de título, puesto que los pacientes con EC no presentaron diferencias en los niveles de TLR2 con respecto a los controles (Figura 8C y 8F, lado izquierdo). En resumen, la observación de que los niveles de TLR2 en CU son más elevados que en EC, podrían ser adjudicados al papel de TLR2 en la reparación de la barrera epitelial, la cual no ejercería efecto alguno en la EC, donde el daño es mucho más profundo (Figura 10)

En nuestro laboratorio, los niveles de TLR2 totales (de membrana y solubles) de mucosa intestinal fueron determinados por ELISA. Además, la expresión de variantes solubles de TLR2 (sTLR2) fue identificada en medio condicionado de células mononucleadas provenientes de mucosa intestinal de pacientes con EII (Candía, Diaz-Jimenez et al. 2012). Los niveles de sTLR2 de resecciones quirúrgicas de pacientes con CU se encontraron aumentados con respecto a las muestras de EC y controles (Candía, Diaz-Jimenez et al. 2012). No obstante, las variantes de sTLR2 no se pudieron determinar específicamente por inmunoblot en mucosa intestinal, debido a la

complejidad del tejido a analizar, a la baja producción de sTLR2 y a la limitante de la inmunodetección mediante los anticuerpos utilizados para detectar estas variantes.

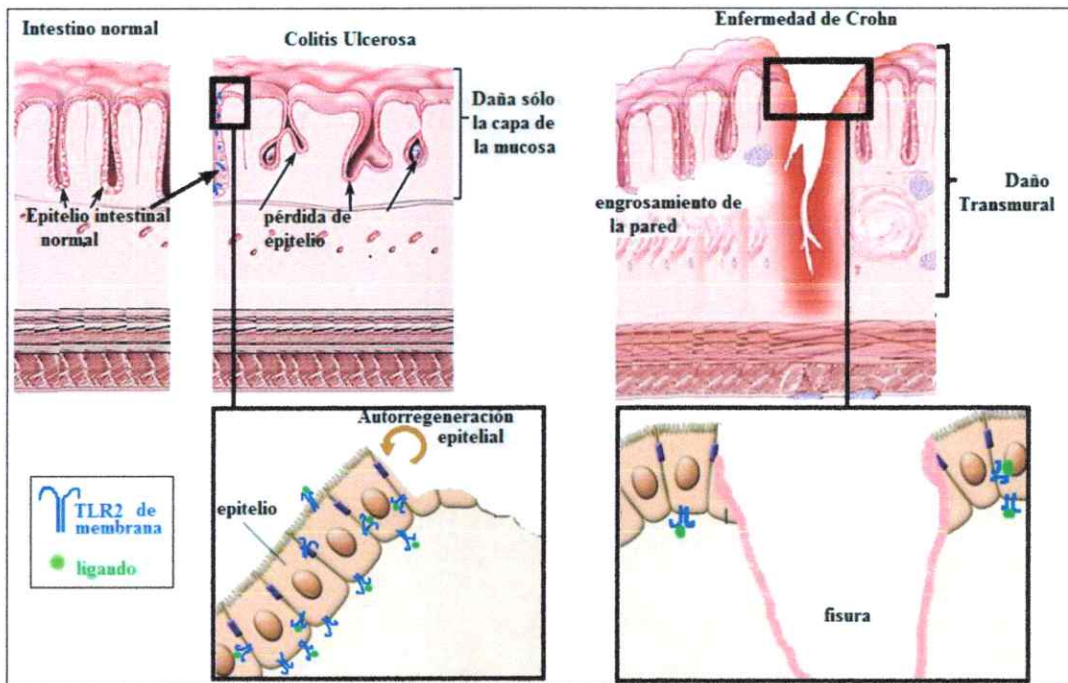


Figura 10. Modelo propuesto para TLR2 en patologías inflamatorias del intestino. En la CU, aún se encuentran células epiteliales, las cuales poseen altos niveles de TLR2 de membrana, el cual, al unir su ligando, podría estar favoreciendo la reparación epitelial, en un daño superficial. En cambio, en la EC el daño es transmural, y la barrera física se encuentra profundamente interrumpida. Además en la EC, los niveles de TLR2 disminuidos no contribuirían en los procesos de reparación. Modificado de: http://www.hopkins-gi.org/GDL_DiseaseLibrary.aspx?CurrentUDV=31

El análisis de la mucosa intestinal completa refleja un sistema complejo, ya que es un tejido compuesto por variados tipos celulares, además de factores solubles y mucus. Las células que podrían estar contribuyendo al aumento de TLR2 de membrana en la mucosa de pacientes con CU, son aquellas ubicadas en la LP (Cario and Podolsky 2000). Entre éstas, se encuentran neutrófilos y células mononucleadas (linfocitos y macrófagos), los cuales podrían corresponder a células residentes o infiltradas en la

mucosa (Nishida, Murase et al. 2002). En nuestro laboratorio células mononucleadas fueron aisladas de la LP y se observó que la población de macrófagos CD33⁺TLR2⁺ se encuentra aumentada en muestras provenientes de pacientes con CU en comparación a pacientes con EC y controles (Candia, Díaz-Jimenez et al. 2012). Estos resultados sugieren que los macrófagos residentes y/o infiltrantes son una de las principales células que expresan TLR2 de membrana y una fuente de sTLR2.

En la mucosa intestinal se detectaron dos bandas inmunoreactivas muy próximas entre sí de alrededor de 73 kDa, las cuales, según los controles realizados, serían inespecíficas (Figura 6A). Sin embargo, estos resultados no son del todo concluyentes, ya que este duplete de 73 kDa podría corresponder a variantes de sTLR2, dada la similitud en el PM con la proteína rhTLR2 correspondiente al dominio extracelular completo (Figura 6B). Así el PM del dominio extracelular de TLR2 (calculado por secuencia aminoacídica), sumado al PM otorgado por las glicosilaciones (determinado experimentalmente), corresponde a 75 kDa, muy similar al duplete de 73 kDa (Tabla 3). Estos resultados sugieren que el reconocimiento del duplete alrededor de 73 kDa podría estar enmascarando por otras proteínas biotiniladas del intestino, con una migración electroforética similar a las variantes de sTLR2. El anticuerpo utilizado es biotinilado y la reactividad se detectó con estreptavidina, que podría unirse inespecíficamente a proteínas intestinales biotiniladas. Si esto fuese correcto, el duplete no sería una banda única consecuencia del grado de glicosilación en el extremo amino-terminal de TLR2 (Weber, Morse et al. 2004).

Debido a que el mRNA de TLR2 no se procesa mediante empalme alternativo (LeBouder, Rey-Nores et al. 2003), las variantes de sTLR2 se generarían a partir de mecanismos post-traduccionales. De esta forma, la producción de sTLR2 se generaría a partir del TLR2 de membrana por la acción de proteasas presentes en mucosa intestinal, tales como las metaloproteinasas de matriz (MMPs). Las MMPs son proteasas que controlan varios procesos celulares, tales como la homeostasis de la matriz extracelular, el crecimiento y la división celular, la respuesta inmune innata y adquirida. Las MMPs participan en la proteólisis de proteínas de membrana facilitando el reclutamiento de células inflamatorias, y por ende, participando en el remodelamiento del tejido. De esta

forma, la expresión de MMP-9 y MMP-3 se encuentra aumentada en modelos murinos de EII (CU inducida por DSS, EC inducida por TNBS y colitis inducida por transferencia de LT efectoras en ratones SCID) (Ravi, Garg et al. 2007). Similarmente, nosotros hemos demostrado que la generación de variantes de sTLR2 por monocitos *in vitro* esta mediada por la acción de las MMPs (datos no publicados).

El análisis de los niveles periféricos de sTLR2 en plasmas de pacientes analizados en este estudio no fue diferente estadísticamente. Sin embargo, al aumentar el número de pacientes analizados, los niveles totales de TLR2 fueron aumentados en CU respecto a EC y a los controles. Además, el análisis de asociación de Spearman demostró que sólo los pacientes con CU presentan niveles periféricos de sTLR2 que se correlacionaron negativamente con los niveles totales de TLR2 en mucosa intestinal (Candia, Diaz-Jimenez et al. 2012). Esto podría sugerir que el transporte de sTLR2 desde la mucosa inflamada hacia la periferia se ve reflejado en un aumento relativo a nivel periférico (plasma), determinando una disminución relativa a nivel local.

Los niveles de TNF- α en mucosa intestinal proveniente de pacientes con EC presentan una tendencia al aumento. Sin embargo, los antecedentes indican que la citoquina TNF- α , de carácter pro-inflamatorio y del tipo Th1, se expresa más en el intestino de pacientes con CU en estado activo, comparados con pacientes con CU inactivos, con EC y controles (Olsen, Goll et al. 2007). Por otro lado, los niveles de la citoquina anti-inflamatoria IL-10, de tipo Th2, no presentaron diferencias en la mucosa intestinal de los pacientes analizados. Reportes previos indican que los niveles plasmáticos de IL-10 se encuentran aumentados en pacientes con CU respecto a EC y controles (Szkardkiewicz, Marciniak et al. 2009). La diferencia entre los datos obtenidos en este estudio con los reportados previamente podría deberse al número reducido de pacientes analizados o al tratamiento farmacológico que ellos reciben como por ejemplo, glucocorticoides e inmunosupresores de otros tipos, los cuales podrían influir en la expresión de moléculas inflamatorias (Tursi, Elisei et al. 2011). Además, los pacientes con CU y EC analizados en este trabajo, corresponden en su mayoría a pacientes en etapa activa de la enfermedad (Tabla 4), por lo tanto, los marcadores de inflamación estarían más representados que los anti-inflamatorios. Es importante

mencionar que al analizar las muestras provenientes de pacientes, es común obtener datos con una gran dispersión, principalmente debido a las variaciones genéticas entre los individuos. Otro factor que determina la gran variabilidad de los datos obtenidos es la exposición a diferentes tratamientos farmacológicos, los cuales influyen la expresión de muchas moléculas mediadoras de la inflamación. Precisamente, los tratamientos utilizados en las EII, tales como glucocorticoides y anticuerpos anti-TNF- α , son capaces de influenciar la expresión de TLR2 (Hermoso, Matsuguchi et al. 2004), lo cual sería interesante de analizar en un futuro estudio. Sin embargo, aumentar el número de pacientes analizados, permitirá obtener una mayor claridad de la tendencia de los resultados obtenidos en muestras de pacientes con EII (Candia, Diaz-Jimenez et al. 2012).

En el estudio de las EII, es necesaria la búsqueda de factores diferenciales entre la CU y la EC, lo cual sería de utilidad para su diagnóstico, ya que los tratamientos son exclusivos de cada una, enfocándose en mecanismos diferentes para frenar el desarrollo de éstas. Por lo mismo, el hallazgo y la caracterización de moléculas anti-inflamatorias, que ya se encuentren presentes en el tejido, son abordadas como futuras contribuciones en el tratamiento complementario actual de estas patologías.

CONCLUSIÓN

Los niveles de TLR2 de membrana (97 kDa) se encuentran aumentados en la mucosa intestinal de pacientes con CU con respecto a los pacientes con EC y controles. También la detección mediante ELISA permitió la cuantificación de los niveles totales de TLR2 (soluble y de membrana) en mucosa intestinal, los cuales se encuentran aumentados en pacientes con CU con respecto a EC. Por lo tanto, se podría postular a TLR2 como un biomarcador diferencial entre ambas EII. En los ensayos con monocitos THP-1 diferenciados a macrófagos, la detección de TLR2 de membrana en los sobrenadantes celulares indicaron que también podría encontrarse este receptor en el medio extracelular, posiblemente contenido en exosomas, lo cual queda por ser dilucidado, así como también los efectos funcionales que esto tendría.

Los niveles de marcadores pro- y anti-inflamatorios (TNF- α e IL-10) no mostraron diferencias estadísticamente significativas en correlación con los niveles totales de TLR2 determinados en los grupos analizados. Sin embargo, este resultado podría mejorarse al incorporar mayor número de muestras de pacientes a analizar. Finalmente, la importancia de encontrar moléculas marcadoras diferenciales entre la CU y la EC, podría ayudar al diagnóstico de estas enfermedades y además otorgaría un tratamiento más adecuado para estas EII.

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, C. and J. H. Cho (2009). "Inflammatory bowel disease." N Engl J Med **361**(21): 2066-2078.
- Aderem, A. and R. J. Ulevitch (2000). "Toll-like receptors in the induction of the innate immune response." Nature **406**(6797): 782-787.
- Akira, S., S. Uematsu, et al. (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." Cell **124**(4): 783-801.
- Arancibia, S., D. Benitez, et al. (2011). "Phosphatidylinositol 3-kinase interacts with the glucocorticoid receptor upon TLR2 activation." J Cell Mol Med **15**(2): 339-349.
- Atuma, C., V. Strugala, et al. (2001). "The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **280**(5): G922-929.
- Beltran, C. J., E. Candia, et al. (2009). "Peripheral cytokine profile in Chilean patients with Crohn's disease and ulcerative colitis." Eur Cytokine Netw **20**(1): 33-38.
- Bernstein, C. N., A. Wajda, et al. (2005). "The clustering of other chronic inflammatory diseases in inflammatory bowel disease: a population-based study." Gastroenterology **129**(3): 827-836.
- Boulard, O., M. J. Asquith, et al. (2010). "TLR2-independent induction and regulation of chronic intestinal inflammation." Eur J Immunol **40**(2): 516-524.
- Bouma, G. and W. Strober (2003). "The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease." Nat Rev Immunol **3**(7): 521-533.
- Bowie, A. and L. A. O'Neill (2000). "The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products." J Leukoc Biol **67**(4): 508-514.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Brand, S. (2009). "Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease." Gut **58**(8): 1152-1167.
- Candia, E., D. Diaz-Jimenez, et al. (2012). "Increased production of soluble TLR2 by lamina propria mononuclear cells from ulcerative colitis patients." Immunobiology **217**(6): 634-642.
- Canto, E., E. Ricart, et al. (2006). "TNF alpha production to TLR2 ligands in active IBD patients." Clin Immunol **119**(2): 156-165.
- Cario, E. (2010). "Toll-like receptors in inflammatory bowel diseases: a decade later." Inflamm Bowel Dis **16**(9): 1583-1597.
- Cario, E., G. Gerken, et al. (2004). "Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C." Gastroenterology **127**(1): 224-238.
- Cario, E., G. Gerken, et al. (2007). "Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function." Gastroenterology **132**(4): 1359-1374.

- Cario, E. and D. K. Podolsky (2000). "Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease." Infect Immun **68**(12): 7010-7017.
- Cheroutre, H. (2005). "IELs: enforcing law and order in the court of the intestinal epithelium." Immunol Rev **206**: 114-131.
- Daperno, M., G. D'Haens, et al. (2004). "Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD." Gastrointest Endosc **60**(4): 505-512.
- de Souza, A. W., D. Mesquita Junior, et al. (2010). "Immune system: part III. The delicate balance of the immune system between tolerance and autoimmunity." Rev Bras Reumatol **50**(6): 665-679.
- Delves, P. J. and I. M. Roitt (2000). "The immune system. First of two parts." N Engl J Med **343**(1): 37-49.
- Dulay, A. T., C. S. Buhimschi, et al. (2009). "Soluble TLR2 is present in human amniotic fluid and modulates the intraamniotic inflammatory response to infection." J Immunol **182**(11): 7244-7253.
- Elson, C. O., Y. Cong, et al. (2005). "Experimental models of inflammatory bowel disease reveal innate, adaptive, and regulatory mechanisms of host dialogue with the microbiota." Immunol Rev **206**: 260-276.
- Erdman, S., J. G. Fox, et al. (2001). "Typhlocolitis in NF-kappa B-deficient mice." J Immunol **166**(3): 1443-1447.
- Ey, B., A. Eyking, et al. (2009). "TLR2 mediates gap junctional intercellular communication through connexin-43 in intestinal epithelial barrier injury." J Biol Chem **284**(33): 22332-22343.
- Figueroa, C., A. Peralta, et al. (2006). "NOD2/CARD15 and Toll-like 4 receptor gene polymorphism in Chilean patients with inflammatory bowel disease." Eur Cytokine Netw **17**(2): 125-130.
- Foligne, B., R. Dessein, et al. (2007). "Prevention and treatment of colitis with *Lactococcus lactis* secreting the immunomodulatory *Yersinia* LcrV protein." Gastroenterology **133**(3): 862-874.
- Frolova, L., P. Drastich, et al. (2008). "Expression of Toll-like receptor 2 (TLR2), TLR4, and CD14 in biopsy samples of patients with inflammatory bowel diseases: upregulated expression of TLR2 in terminal ileum of patients with ulcerative colitis." J Histochem Cytochem **56**(3): 267-274.
- Gay, N. J. and F. J. Keith (1991). "Drosophila Toll and IL-1 receptor." Nature **351**(6325): 355-356.
- Gazouli, M., I. Pachoula, et al. (2010). "NOD2/CARD15, ATG16L1 and IL23R gene polymorphisms and childhood-onset of Crohn's disease." World J Gastroenterol **16**(14): 1753-1758.
- Glas, J., J. Seiderer, et al. (2010). "The NOD2 Single Nucleotide Polymorphisms rs2066843 and rs2076756 Are Novel and Common Crohn's Disease Susceptibility Gene Variants." PLoS One **5**(12): e14466.

- Gomariz, R. P., A. Arranz, et al. (2005). "Time-course expression of Toll-like receptors 2 and 4 in inflammatory bowel disease and homeostatic effect of VIP." J Leukoc Biol 78(2): 491-502.
- Hachnel, V., L. Schwarzfischer, et al. (2002). "Transcriptional regulation of the human toll-like receptor 2 gene in monocytes and macrophages." J Immunol 168(11): 5629-5637.
- Hausmann, M., S. Kiessling, et al. (2002). "Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation." Gastroenterology 122(7): 1987-2000.
- Heggelund, L., T. Flo, et al. (2004). "Soluble toll-like receptor 2 in HIV infection: association with disease progression." AIDS 18(18): 2437-2439.
- Henckaerts, L., M. Pierik, et al. (2007). "Mutations in pattern recognition receptor genes modulate seroreactivity to microbial antigens in patients with inflammatory bowel disease." Gut 56(11): 1536-1542.
- Hermoso, M. A., T. Matsuguchi, et al. (2004). "Glucocorticoids and tumor necrosis factor alpha cooperatively regulate toll-like receptor 2 gene expression." Mol Cell Biol 24(11): 4743-4756.
- Iwami, K. I., T. Matsuguchi, et al. (2000). "Cutting edge: naturally occurring soluble form of mouse Toll-like receptor 4 inhibits lipopolysaccharide signaling." J Immunol 165(12): 6682-6686.
- Jin, M. S., S. E. Kim, et al. (2007). "Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide." Cell 130(6): 1071-1082.
- Jouault, T., M. El Abed-El Behi, et al. (2006). "Specific recognition of *Candida albicans* by macrophages requires galectin-3 to discriminate *Saccharomyces cerevisiae* and needs association with TLR2 for signaling." J Immunol 177(7): 4679-4687.
- Kamada, N., T. Hisamatsu, et al. (2008). "Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis." J Clin Invest 118(6): 2269-2280.
- Kumar, H., T. Kawai, et al. (2009). "Toll-like receptors and innate immunity." Biochem Biophys Res Commun 388(4): 621-625.
- Kuroishi, T., Y. Tanaka, et al. (2007). "Human parotid saliva contains soluble toll-like receptor (TLR) 2 and modulates TLR2-mediated interleukin-8 production by monocytic cells." Mol Immunol 44(8): 1969-1976.
- LeBouder, E., J. E. Rey-Nores, et al. (2003). "Soluble forms of Toll-like receptor (TLR)2 capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and breast milk." J Immunol 171(12): 6680-6689.
- Lemaitre, B., E. Nicolas, et al. (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults." Cell 86(6): 973-983.
- Lewis, J. D., S. Chuai, et al. (2008). "Use of the noninvasive components of the Mayo score to assess clinical response in ulcerative colitis." Inflamm Bowel Dis 14(12): 1660-1666.
- Liew, F. Y., D. Xu, et al. (2005). "Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses." Nat Rev Immunol 5(6): 446-458.

- Liu, H., M. Komai-Koma, et al. (2006). "Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4+ CD25+ regulatory T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(18): 7048-7053.
- Lorenz, R. G. and R. D. Newberry (2004). "Isolated lymphoid follicles can function as sites for induction of mucosal immune responses." Ann N Y Acad Sci **1029**: 44-57.
- Mahler, M. and E. H. Leiter (2002). "Genetic and environmental context determines the course of colitis developing in IL-10-deficient mice." Inflamm Bowel Dis **8**(5): 347-355.
- Malinarich, F. H., E. Grabski, et al. (2010). "Constant TCR triggering suggests that the TCR expressed on intestinal intraepithelial gammadelta T cells is functional in vivo." Eur J Immunol **40**(12): 3378-3388.
- Mashimo, H., D. C. Wu, et al. (1996). "Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor." Science **274**(5285): 262-265.
- McGuckin, M. A., R. Eri, et al. (2009). "Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases." Inflamm Bowel Dis **15**(1): 100-113.
- Mowat, A. M. (2010). "Does TLR2 regulate intestinal inflammation?" Eur J Immunol **40**(2): 318-320.
- Nishida, Y., K. Murase, et al. (2002). "Different distribution of mast cells and macrophages in colonic mucosa of patients with collagenous colitis and inflammatory bowel disease." Hepatogastroenterology **49**(45): 678-682.
- Olsen, T., R. Goll, et al. (2007). "Tissue levels of tumor necrosis factor-alpha correlates with grade of inflammation in untreated ulcerative colitis." Scand J Gastroenterol **42**(11): 1312-1320.
- Pieper, C., S. Haag, et al. (2009). "Guideline adherence and patient satisfaction in the treatment of inflammatory bowel disorders--an evaluation study." BMC Health Serv Res **9**: 17.
- Pierik, M., S. Joossens, et al. (2006). "Toll-like receptor-1, -2, and -6 polymorphisms influence disease extension in inflammatory bowel diseases." Inflamm Bowel Dis **12**(1): 1-8.
- Podolsky, D. K., G. Gerken, et al. (2009). "Colitis-associated variant of TLR2 causes impaired mucosal repair because of TFF3 deficiency." Gastroenterology **137**(1): 209-220.
- Raby, A. C., E. Le Boudier, et al. (2009). "Soluble TLR2 reduces inflammation without compromising bacterial clearance by disrupting TLR2 triggering." J Immunol **183**(1): 506-517.
- Rachmilewitz, D., K. Katakura, et al. (2004). "Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis." Gastroenterology **126**(2): 520-528.
- Rakoff-Nahoum, S., J. Paglino, et al. (2004). "Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis." Cell **118**(2): 229-241.
- Ravi, A., P. Garg, et al. (2007). "Matrix metalloproteinases in inflammatory bowel disease: boon or a bane?" Inflamm Bowel Dis **13**(1): 97-107.

- Rescigno, M., M. Urbano, et al. (2001). "Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria." Nat Immunol 2(4): 361-367.
- Russel, M. G. and R. W. Stockbrugger (1996). "Epidemiology of inflammatory bowel disease: an update." Scand J Gastroenterol 31(5): 417-427.
- Sipponen, T., H. Nuutinen, et al. (2010). "Endoscopic evaluation of Crohn's disease activity: comparison of the CDEIS and the SES-CD." Inflamm Bowel Dis 16(12): 2131-2136.
- Srinivasan, M., K. N. Kodumudi, et al. (2008). "Soluble CD14 and toll-like receptor-2 are potential salivary biomarkers for oral lichen planus and burning mouth syndrome." Clin Immunol 126(1): 31-37.
- Strassheim, D., K. Asehnoune, et al. (2004). "Phosphoinositide 3-kinase and Akt occupy central roles in inflammatory responses of Toll-like receptor 2-stimulated neutrophils." J Immunol 172(9): 5727-5733.
- Strober, W., I. Fuss, et al. (2007). "The fundamental basis of inflammatory bowel disease." J Clin Invest 117(3): 514-521.
- Szebeni, B., G. Veres, et al. (2008). "Increased expression of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the colonic mucosa of children with inflammatory bowel disease." Clin Exp Immunol 151(1): 34-41.
- Szkaradkiewicz, A., R. Marciniak, et al. (2009). "Proinflammatory cytokines and IL-10 in inflammatory bowel disease and colorectal cancer patients." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 57(4): 291-294.
- Takahashi, K. (2010). "Interaction between the intestinal immune system and commensal bacteria and its effect on the regulation of allergic reactions." Biosci Biotechnol Biochem 74(4): 691-695.
- Tsukada, H., A. Fukui, et al. (2005). "Fish soluble Toll-like receptor 5 (TLR5) is an acute-phase protein with integral flagellin-recognition activity." Int J Mol Med 15(3): 519-525.
- Tursi, A., W. Elisci, et al. (2011). "Tumour necrosis factor-alpha expression in segmental colitis associated with diverticulosis down-regulates after treatment." J Gastrointest Liver Dis 20(4): 365-370.
- Ueland, T., T. Espevik, et al. (2006). "Mannose binding lectin and soluble Toll-like receptor 2 in heart failure following acute myocardial infarction." J Card Fail 12(8): 659-663.
- Vijay-Kumar, M., J. D. Aitken, et al. (2008). "Flagellin treatment protects against chemicals, bacteria, viruses, and radiation." J Immunol 180(12): 8280-8285.
- Vijay-Kumar, M., H. Wu, et al. (2007). "Activation of toll-like receptor 3 protects against DSS-induced acute colitis." Inflamm Bowel Dis 13(7): 856-864.
- Watanabe, T., A. Kitani, et al. (2004). "NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses." Nat Immunol 5(8): 800-808.
- Weber, A. N., M. A. Morse, et al. (2004). "Four N-linked glycosylation sites in human toll-like receptor 2 cooperate to direct efficient biosynthesis and secretion." J Biol Chem 279(33): 34589-34594.

- Yanagawa, Y. and K. Onoe (2007). "Enhanced IL-10 production by TLR4- and TLR2-primed dendritic cells upon TLR restimulation." J Immunol 178(10): 6173-6180.
- Zhang, G. and S. Ghosh (2002). "Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip." J Biol Chem 277(9): 7059-7065.

ANEXOS



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA INVESTIGACIÓN CLÍNICA (Grupo mayor de 18 años con Enfermedad Inflamatoria Intestinal refractaria al tratamiento)

El objeto de esta información es ayudarlo a tomar la decisión de participar o no en este estudio que trata de evaluar la presencia de la molécula TLR2 en el intestino de pacientes que tienen una enfermedad similar a la suya (Enfermedad Inflamatoria Intestinal, ya sea Enfermedad de Crohn o Colitis Ulcerosa).

Su médico tratante, que es uno de los coinvestigadores, ha considerado que dado el fracaso al tratamiento médico con fármacos, necesita someterme a un tratamiento quirúrgico para poder manejar de manera adecuada su enfermedad. Es por esto que se le está solicitando su autorización para tomar después de la cirugía una pequeña muestra de una zona de su colon o intestino delgado ya resecado con el fin de ser analizadas y llevar a cabo esta investigación.

OBJETIVOS: Comprobar que esta molécula; *TLR2* se encuentra mayoritariamente presente en los pacientes que sufren de Enfermedad de Crohn o Colitis Ulcerosa y no en pacientes que sufren de otra enfermedad diferente, podría ser útil para entender mejor porqué se produce la enfermedad, y a futuro plantear nuevos tratamientos posibles.

PROCEDIMIENTOS: Una vez resecado su colon o intestino, uno de los coinvestigadores de este estudio seccionará un área del colon o intestino de aproximadamente 5 cm. El resto de la pieza quirúrgica (colon o intestino resecado) se enviará al Servicio de Anatomía Patológica para su evaluación por el patólogo con el fin de determinar la severidad de su enfermedad. La evaluación del colon o intestino por parte del patólogo es un procedimiento que se realiza de rutina en toda pieza quirúrgica que se obtiene de una cirugía, por lo que su evaluación no estará condicionada por su eventual participación en este estudio. Además, al término de su cirugía se obtendrá una muestra de 15 ml de sangre para poder determinar la presencia de esta molécula en el conjunto de células presentes en la sangre, como la que podría circular en el suero. El procedimiento de extraer su sangre será similar al que se ha realizado cuando su médico tratante le ha solicitado exámenes de sangre.

Los resultados obtenidos del estudio de sus muestras de intestino, colon o sangre serán conocidos por su médico tratante quien le informará personalmente de los resultados obtenidos al estudiar sus muestras.

Se le solicita su autorización para que las muestras de sangre y biopsias que no sean utilizadas en este estudio puedan ser congeladas en un refrigerador a -80°C , lo que permitirá a nuestro grupo de investigación seguir realizando estudios de su enfermedad con el fin de lograr entender mejor los mecanismos que la producen y tener la posibilidad de encontrar nuevos y mejores tratamientos. En caso de que nuestro grupo de investigación desee utilizar sus muestras para un próximo estudio destinado a conocer que otros factores provocan la aparición o modifican la evolución de su enfermedad, nosotros nos comprometemos a solicitar previamente su aprobación.

CONFIDENCIALIDAD: Los resultados obtenidos del estudio de sus muestras de intestino, colon o sangre serán conocidos solamente por el equipo de investigación que forma parte de este estudio manteniendo de esta manera la máxima confidencialidad de su participación.

BENEFICIOS: La opción de entender mejor esta enfermedad y lograr tener nuevos tratamientos podría permitir tratar mejor a los pacientes que padecen su enfermedad.

RIESGOS: Debe quedar claro que la muestra que se evaluará en este estudio se obtendrá solamente una vez resecado su colon o intestino, por lo tanto este procedimiento no implicará ninguna demora o riesgo para usted durante su cirugía como tampoco implicará un riesgo en su evolución postoperatoria.

COSTOS: Usted debe estar tranquilo de que tanto la toma de las muestras de colon e intestino y de sangre como su análisis no tendrán ningún costo para usted.

COMPENSACIÓN: No existirá ninguna ayuda económica por su participación dado que la indicación de la cirugía está dada por la falta de respuesta al tratamiento médico y que las muestras serán obtenidas una vez resecados su colon o intestino sin existir ningún riesgo.

COMUNICACIÓN: La investigación a la cual se me esta invitando a participar se realiza en la Sección de Gastroenterología y el Departamento de Cirugía del Hospital Clínico de la Universidad de Chile y la Clínica Las Condes, en conjunto con el Laboratorio de Inmunidad Innata, Programa Disciplinario de Inmunología, Instituto de Ciencias Biomédicas, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. En caso necesario usted se podrá contactar con el coinvestigador principal: Dr. Rodrigo Quera P (teléfono: 4888300, Servicio de Gastroenterología Clínica Las Condes).

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico de la Universidad de Chile (teléfono) y de la Clínica Las Condes (teléfono).

DERECHOS DEL PARTICIPANTE: Debe tener claro que en caso de no aceptar participar en este estudio, la atención y dedicación entregada por el equipo de médicos tratantes no serán afectadas.

Por lo tanto declaro que YO he sido informado por el Investigador Principal/Médico Responsable quien estimó que mi Diagnóstico es compatible con los criterios de selección del estudio.

Declaro además haber entendido toda y cada una de las partes del documento que estoy firmando.

Firma paciente

Investigador Principal
o Médico Responsable

Fecha y hora de la Firma Consentimiento Informado:



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA INVESTIGACIÓN CLÍNICA (Grupo entre 15 a 18 años con Enfermedad Inflamatoria Intestinal refractaria al tratamiento, AUTORIZACION dada por el Padre/Madre/Tutor de Paciente)

El objeto de esta información es solicitar que su hijo o persona enferma a su cargo pueda participar en este estudio que trata de evaluar la presencia de la molécula TLR2 en el intestino de pacientes que tienen una enfermedad similar a la de mi hijo o persona a mi cuidado (Enfermedad Inflamatoria Intestinal, ya sea Enfermedad de Crohn o Colitis Ulcerosa).

El médico tratante, que es uno de los coinvestigadores, ha considerado que dado el fracaso al tratamiento médico con fármacos, el enfermo necesita someterse a un tratamiento quirúrgico para poder manejar de manera adecuada su enfermedad. Es por esto que se le está solicitando su autorización para que nosotros podamos tomar una pequeña muestra de una zona su colon o intestino delgado ya reseca después de la cirugía con el fin de ser analizadas y llevar a cabo esta investigación.

OBJETIVOS: Comprobar que esta molécula *TLR2* se encuentra presente en los pacientes que sufren de Enfermedad de Crohn o Colitis Ulcerosa y que no están en pacientes que sufren de otra enfermedad intestinal diferente, podría ser útil para entender mejor porqué se produce la enfermedad y a futuro plantear nuevos tratamientos posibles.

PROCEDIMIENTOS: Una vez reseca su colon o intestino uno de los coinvestigadores de este estudio seccionará un área del colon o intestino de aproximadamente 5 cm. El resto de la pieza quirúrgica (colon o intestino reseca) se enviará al Servicio de Anatomía Patológica para su evaluación por el patólogo con el fin de determinar la severidad de su enfermedad. La evaluación del colon o intestino por parte del patólogo es un procedimiento que se realiza de rutina en toda pieza quirúrgica que se obtiene de una cirugía por lo que su evaluación no estará condicionada por su eventual participación en este estudio. Además, al término de su cirugía se obtendrá una muestra de 15 ml de sangre para poder determinar la presencia de esta molécula tanto en el conjunto de células presentes en el suero. El procedimiento de extraer su sangre será hecho durante la operación aprovechando la anestesia, sin molestia para el paciente.

Los resultados obtenidos del estudio de sus muestras de intestino, colon o sangre serán conocidos por el médico tratante a quien se le informará personalmente de los resultados obtenidos al estudiar sus muestras.

Se solicita su autorización para que las muestras de sangre y biopsias que no sean utilizadas en este estudio puedan ser congeladas en un refrigerador a -80°C , lo que podría permitir a nuestro grupo de investigación aprovechar nuevas tecnologías y conocimientos que aparezcan para seguir realizando estudios de su enfermedad con el fin de entender mejor los mecanismos que la producen y tener la posibilidad de encontrar nuevos y mejores tratamientos. En caso de que nuestro grupo de investigación desee utilizar estas muestras para un próximo estudio de inmunología o genético en el área de su enfermedad, nosotros nos comprometemos a solicitar previamente tanto su aprobación como la de su hijo.

CONFIDENCIALIDAD: Los resultados obtenidos del estudio de estas muestras de intestino, colon o sangre serán conocidos solamente por el equipo de investigación que forma parte de este estudio manteniendo de esta manera la máxima confidencialidad de su participación.

BENEFICIOS: La opción de entender mejor esta enfermedad y lograr tener nuevos tratamientos podría permitir a futuro tratar mejor a los pacientes que padecen estas enfermedades.

RIESGOS: Debe quedar claro que la muestra que se evaluará en este estudio se obtendrá solamente después de resecado su colon o intestino, por lo tanto este procedimiento no implicará ninguna demora o riesgo durante su cirugía o durante su evolución postoperatoria.

COSTOS: Tanto la toma de las muestras de colon e intestino y de sangre como su análisis no tendrán ningún costo extra para el enfermo.

COMPENSACIÓN: No existirá ninguna ayuda económica por su participación dado que la indicación de la cirugía está dada por la falta de respuesta al tratamiento médico y que las muestras serán obtenidas del colon o intestino ya resecados sin existir ningún riesgo para el paciente.

COMUNICACIÓN: La investigación a la cual se está invitando a participar se realiza en la Sección de Gastroenterología y el Departamento de Cirugía del Hospital Clínico de la Universidad de Chile y la Clínica Las Condes, en conjunto con el Laboratorio de Inmunidad Innata, Programa Disciplinario de Inmunología, Instituto de Ciencias Biomédicas, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. En caso necesario usted se podrá contactar con el coinvestigador principal: Dr. Rodrigo Quera P (teléfono: 4888300, Servicio de Gastroenterología Clínica Las Condes).

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico de la Universidad de Chile (teléfono) y de la Clínica Las Condes (teléfono).

DERECHOS DEL PARTICIPANTE: Debe tener claro que en caso de no aceptar que el enfermo participe en este estudio, la atención y dedicación entregada a él/ella por el equipo de médicos tratantes no serán afectadas.

Por lo tanto declaro que YO he sido informado por el Investigador Principal/Médico Responsable quien estimó que el Diagnóstico de mi hijo o persona a cargo es compatible con los criterios de selección del estudio.

Declaro además haber entendido toda y cada una de las partes del documento que estoy firmando.

Firma Madre/Padre/Persona a cargo

Investigador Principal
o Médico Responsable

Fecha y hora de la Firma Consentimiento Informado:



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA INVESTIGACIÓN CLINICA (Grupo control mayor de 18 años de edad)

El objeto de esta información es ayudarlo a tomar la decisión de participar o no en este estudio, en que médicos y un grupo de científicos, están interesados en estudiar la presencia de la molécula llamada TLR2 que puede estar presente en el intestino de pacientes que tienen una enfermedad distinta a la que yo tengo llamada Enfermedad Inflamatoria Intestinal (ya sea Enfermedad de Crohn o Colitis Ulcerosa). Sin embargo para que este estudio sea útil, es necesario comparar los resultados de estos pacientes con los obtenidos desde un grupo control que pueden ser pacientes con apendicitis aguda, diverticulitis o cáncer colorectal.

Su médico tratante ha considerado que presenta una de estas tres patologías motivo por el cual requiere de un tratamiento quirúrgico para su manejo. Es por esto que se ha solicitado su autorización para tomar muestras de su colon si es que tengo diagnóstico de diverticulitis o cáncer de colon. O bien tomar muestras de apéndice, si es que padezco de apendicitis, durante mi cirugía para ser analizadas y llevar a cabo esta investigación.

OBJETIVOS: El poder comprobar que esta molécula *TLR2* se encuentra presente en los pacientes que sufren de Enfermedad de Crohn o Colitis Ulcerosa y que no está en pacientes que sufren de otra enfermedad diferente como la que usted presenta, podría ser útil para entender mejor porqué se produce la enfermedad inflamatoria intestinal y a futuro plantear nuevos tratamientos posibles.

PROCEDIMIENTOS: Una vez reseca su colon o apéndice uno de los coinvestigadores de este estudio seccionarán un área del colon (aproximadamente 5 cm) o apéndice (un cm) según el diagnóstico inicial (diverticulitis/cáncer de colon o apendicitis respectivamente). El resto de la pieza quirúrgica (colon o apéndice reseca) se enviará al Servicio de Anatomía Patológica para su evaluación por el patólogo con el fin de determinar el diagnóstico y severidad de su enfermedad. La evaluación del colon o apéndice por parte del patólogo es un procedimiento que se realiza de rutina en toda pieza quirúrgica que se obtiene de una cirugía por lo que su evaluación no estará condicionada por su eventual participación en este estudio. Además, al término de su cirugía se obtendrá una muestra de 15 ml de sangre para poder determinar la presencia de esta molécula el conjunto de células presentes en la sangre como en la que podría circular en el suero. El procedimiento de extraer su sangre será similar al que se ha realizado cuando su médico tratante le ha solicitado exámenes de sangre.

Los resultados obtenidos del estudio de sus muestras de colon, apéndice o sangre serán conocidos por su médico tratante quien le informará personalmente de los resultados obtenidos al estudiar sus muestras.

Se le solicita su autorización para que las muestras de sangre y biopsias que no sean utilizadas en este estudio puedan ser congeladas en un refrigerador a -80°C , lo que permitirá a nuestro grupo de investigación seguir realizando estudios sobre enfermedad inflamatoria intestinal (enfermedad de Crohn y

colitis ulcerosa) con el fin de lograr entender mejor los mecanismos que la producen y tener la posibilidad de encontrar nuevos y mejores tratamientos. En caso de que nuestro grupo de investigación desee utilizar sus muestras para un próximo estudio destinado a conocer que otros factores provocan la aparición o modifican la evolución de su enfermedad, nosotros nos comprometemos a solicitar previamente su aprobación.

CONFIDENCIALIDAD: Los resultados obtenidos del estudio de sus muestras de colon, apéndice o sangre serán conocidos solamente por el equipo de investigación que forma parte de este estudio manteniendo de esta manera la máxima confidencialidad de su participación.

BENEFICIOS: La opción de entender mejor el origen y los mecanismos de la enfermedad inflamatoria intestinal y lograr tener nuevos tratamientos podría permitir tratar mejor a estos pacientes. Para usted, por no padecer esta enfermedad, no significaría ningún beneficio directo.

RIESGOS: Debe quedar claro que la muestra de colon o apéndice que se evaluará en este estudio se obtendrá solamente una vez reseca su colon o apéndice, por lo tanto este procedimiento no implicará ninguna demora o riesgo para usted durante su cirugía como tampoco implicará un riesgo en su evolución postoperatoria.

COSTOS: Usted debe estar tranquilo que tanto la toma de las muestras de colon o apéndice y de sangre como su análisis no tendrán ningún costo para usted.

COMPENSACIÓN: No existirá ninguna ayuda económica por su participación dado que la indicación de la cirugía por apendicitis, diverticulitis o cáncer de colon no está determinada por su posible participación en este estudio.

COMUNICACIÓN: La investigación a la cual se le está invitando a participar se realiza en la Sección de Gastroenterología y el Departamento de Cirugía del Hospital Clínico de la Universidad de Chile y la Clínica Las Condes, en conjunto con el Laboratorio de Inmunidad Innata, Programa Disciplinario de Inmunología, Instituto de Ciencias Biomédicas, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. En caso necesario usted se podrá contactar con el coinvestigador principal: Dr. Rodrigo Quera P (teléfono: 4888300, Servicio de Gastroenterología Clínica Las Condes).

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico de la Universidad de Chile (teléfono) y de la Clínica Las Condes (teléfono).

DERECHOS DEL PARTICIPANTE: Debe tener claro que en caso de no aceptar participar en este estudio, la atención y dedicación entregada por el equipo de médicos tratantes no serán afectadas.

Por lo tanto declaro que YO he sido informado por el Investigador Principal/Médico Responsable quien estimó que mi Diagnóstico es compatible con los criterios de selección del estudio.

Declaro además haber entendido toda y cada una de las partes del documento que estoy firmando.

Firma paciente

Investigador Principal
o Médico Responsable

Fecha y hora de la Firma Consentimiento Informado:



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA INVESTIGACIÓN CLINICA (Grupo control entre 15 a 18 años, AUTORIZACION Padre/Madre/Tutor de Paciente)

El objeto de esta carta es solicitar que su hijo/hija/persona enferma a su cargo pueda participar en este estudio, que médicos y un grupo de científicos están interesados en evaluar la presencia de la molécula llamada TLR2 que puede estar presente en el intestino de pacientes que tienen una enfermedad distinta a la de su hijo/hija/persona a cargo llamada Enfermedad Inflamatoria Intestinal (enfermedad de Crohn o Colitis Ulcerosa). Sin embargo para que este estudio sea útil, es necesario comparar los resultados de estos pacientes con los obtenidos desde un grupo control que pueden ser pacientes con apendicitis aguda. El médico tratante a cargo de su hijo/hija/persona a cargo ha considerado que él/ella presenta este cuadro motivo por el cual necesita un tratamiento quirúrgico para su manejo. Es por esto que se ha solicitado su autorización para tomar muestras del apéndice una vez extraído con el fin de analizarla y poder llevar a cabo esta investigación.

OBJETIVOS: Comprobar que esta molécula *TLR2* se encuentra presente en los pacientes que sufren de Enfermedad de Crohn o Colitis Ulcerosa y que no está en pacientes que sufren de otra enfermedad diferente como la que su hijo/hija/persona a cargo presenta, podría ser útil para entender mejor porqué se produce la enfermedad inflamatoria intestinal y a futuro plantear nuevos tratamientos posibles.

PROCEDIMIENTOS: Una vez resecado el apéndice, uno de los coinvestigadores de este estudio seccionará un área del apéndice (aproximadamente un cm). El resto del apéndice se enviará al Servicio de Anatomía Patológica para su evaluación por el patólogo con el fin de determinar el diagnóstico y severidad de su enfermedad. La evaluación del apéndice por parte del patólogo es un procedimiento se realiza de rutina en toda pieza quirúrgica que se obtiene de una cirugía por lo que su evaluación no estará condicionada por la eventual participación de su hijo/hija/persona a cargo en este estudio. Además, al término de su cirugía se obtendrá una muestra de 15 ml de sangre para poder determinar la presencia de esta molécula tanto en el conjunto de células presentes en la sangre como en el suero. El procedimiento de extraer su sangre será hecho durante la operación aprovechando la anestesia, sin molestia para el paciente.

Los resultados obtenidos del estudio de las muestras del apéndice o sangre de su hijo/hija/persona a cargo serán conocidos por su médico tratante a quien se le informará personalmente de los resultados obtenidos al estudiar estas muestras.

Se solicita su autorización para que las muestras de sangre y biopsias que no sean utilizadas en este estudio puedan ser congeladas en un refrigerador a -80°C , lo que podría permitir a nuestro grupo de investigación aprovechar nuevas tecnologías y conocimientos que aparezcan para seguir realizando estudios sobre enfermedad inflamatoria intestinal con el fin de entender mejor los mecanismos que la producen y tener la posibilidad de encontrar nuevos y mejores tratamientos. En caso de que nuestro grupo de investigación desee utilizar las muestras de su hijo/hija/persona a cargo para un próximo estudio

destinado a conocer que otros factores provocan la aparición o modifican la evolución de su enfermedad, nosotros nos comprometemos a solicitar previamente su aprobación y la de su hijo.

CONFIDENCIALIDAD: Los resultados obtenidos del estudio de las muestras de apéndice o sangre serán conocidos solamente por el equipo de investigación que forma parte de este estudio manteniendo de esta manera la máxima confidencialidad de su participación.

BENEFICIOS: La opción de entender mejor el origen y los mecanismos de la enfermedad inflamatoria intestinal y lograr tener nuevos tratamientos podría permitir tratar mejor a estos pacientes. Para su hijo/hija/persona a cargo por no padecer estas enfermedades, no significaría ningún beneficio directo.

RIESGOS: Debe quedar claro que la muestra de colon o apéndice de su hijo/hija/persona a cargo que se evaluará en este estudio se obtendrá solamente después de resecado el apéndice, por lo tanto este procedimiento no implicará ninguna demora o riesgo para durante su cirugía o durante su evolución postoperatoria.

COSTOS: Tanto la toma de las muestras de apéndice y de sangre como su análisis no tendrán ningún costo extra para el enfermo.

COMPENSACIÓN: No existirá ninguna ayuda económica por usted o su hijo/hija/persona a cargo por la participación dado que la indicación de la cirugía por apendicitis no está determinada por la posible participación de él o ella en este estudio.

COMUNICACIÓN: La investigación a la cual se le está invitando a participar se realiza en la Sección de Gastroenterología y el Departamento de Cirugía del Hospital Clínico de la Universidad de Chile y la Clínica Las Condes, en conjunto con el Laboratorio de Inmunidad Innata, Programa Disciplinario de Inmunología, Instituto de Ciencias Biomédicas, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. En caso necesario usted se podrá contactar con el coinvestigador principal: Dr. Rodrigo Quera P (teléfono: 4888300, Servicio de Gastroenterología Clínica Las Condes).

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico de la Universidad de Chile (teléfono) y de la Clínica Las Condes (teléfono).

DERECHOS DEL PARTICIPANTE: Debe tener claro que en caso de no aceptar participar en este estudio, la atención y dedicación entregada por el equipo de médicos tratantes no serán afectadas.

Por lo tanto declaro que YO he sido informado por el Investigador Principal/Médico Responsable quien estimó que el Diagnóstico de mi hijo es compatible con los criterios de selección del estudio.

Declaro además haber entendido toda y cada una de las partes del documento que estoy firmando.

Firma Madre/Padre/Persona a cargo Paciente/

Investigador Principal
o Médico Responsable

Fecha y hora de la Firma Consentimiento Informado:



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA INVESTIGACIÓN CLINICA (Grupo Adulto con Enfermedad Inflamatoria Intestinal con actividad en diferentes estadios)

El objeto de esta información es ayudarlo a tomar la decisión de participar o no en este estudio que trata de evaluar la presencia de la molécula TLR2 en el intestino de pacientes que tienen una enfermedad similar a la suya llamada Enfermedad Inflamatoria Intestinal (ya sea Enfermedad de Crohn o Colitis Ulcerosa).

OBJETIVOS: El poder comprobar que esta molécula *TLR2* se encuentra presente en los pacientes que sufren de Enfermedad de Crohn o Colitis Ulcerosa y que no están en pacientes que sufren de otra enfermedad diferente, podría ser útil para entender mejor porqué se produce la enfermedad y a futuro plantear nuevos tratamientos posibles.

PROCEDIMIENTOS: Durante un crisis de mi enfermedad determinada clínicamente por su médico tratante se tomará una muestra de sangre de 15 ml, este procedimiento se realizará como cualquier otro examen de sangre solicitado previamente por su médico tratante durante sus controles. En esta muestra se determinará los niveles de la molécula *TLR2* circulante en el suero. Cuando usted haya alcanzando la etapa de inactividad de su enfermedad, se le tomará nuevamente 15 ml de sangre para volver a determinar la presencia de esta molécula en el suero circulante.

Los resultados obtenidos del estudio de sus muestras de sangre serán conocidos por su médico tratante quien le informará personalmente de los resultados obtenidos al estudiar sus muestras.

Se le solicita su autorización para que las muestras de sangre que no sean utilizadas en este estudio puedan ser congeladas en un refrigerador a -80°C , lo que permitirá a nuestro grupo de investigación seguir realizando estudios de su enfermedad con el fin de lograr entender mejor los mecanismos que la producen y tener la posibilidad de encontrar nuevos y mejores tratamientos. En caso de que nuestro grupo de investigación desee utilizar sus muestras para un próximo estudio destinado a conocer que otros factores pueden provocar la aparición o modificar la evolución de su enfermedad, nosotros nos comprometemos a solicitar previamente su aprobación.

CONFIDENCIALIDAD: Los resultados obtenidos del estudio de sus muestras sangre serán conocidos solamente por el equipo de investigación que forma parte de este estudio manteniendo de esta manera la máxima confidencialidad de su participación.

BENEFICIOS: La opción de entender mejor esta enfermedad y lograr tener nuevos tratamientos podría permitir tratar mejor a los pacientes que padecen su enfermedad.

RIESGOS: Debe quedar claro que la toma de muestra de sangre será similar a los exámenes de sangre solicitados por su médico tratante por lo que están exentas de riesgo para la evolución de su enfermedad.

COSTOS: Usted debe estar tranquilo que tanto la toma de las muestras de sangre como su análisis no tendrán ningún costo para usted.

COMPENSACIÓN: No existirá ninguna ayuda económica por su participación en este estudio.
COMUNICACIÓN: La investigación a la cual se le está invitando a participar se realiza en la Sección de Gastroenterología y el Departamento de Cirugía del Hospital Clínico de la Universidad de Chile y la Clínica Las Condes, en conjunto con el Laboratorio de Inmunidad Innata, Programa Disciplinario de Inmunología, Instituto de Ciencias Biomédicas, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. En caso necesario usted se podrá contactar con el coinvestigador principal: Dr. Rodrigo Quera P (teléfono: 4888300, Servicio de Gastroenterología Clínica Las Condes).

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico de la Universidad de Chile (teléfono) y de la Clínica Las Condes (teléfono).

DERECHOS DEL PARTICIPANTE: Debe tener claro que en caso de no aceptar participar en este estudio, la atención y dedicación entregada por el equipo de médicos tratantes no serán afectadas.

Por lo tanto declaro que YO he sido informado por el Investigador Principal/Médico Responsable quien estimó que mi Diagnóstico es compatible con los criterios de selección del estudio.

Declaro además haber entendido toda y cada una de las partes del documento que estoy firmando.

Firma paciente

Investigador Principal
o Médico Responsable

Fecha y hora de la Firma Consentimiento Informado:



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA INVESTIGACIÓN CLINICA (Grupo entre 15-18 años con Enfermedad Inflamatoria Intestinal con actividad en diferentes estadios, AUTORIZACION Padre/Madre/Tutor de Paciente)

El objeto de esta información es solicitar que su hijo/hija/persona enferma a su cargo pueda participar en este estudio que quiere evaluar la presencia de la molécula TLR2 en el intestino de pacientes que tienen una enfermedad similar a la de su hijo/hija/persona a cargo llamada Enfermedad Inflamatoria Intestinal (Enfermedad de Crohn o Colitis Ulcerosa).

OBJETIVOS: Comprobar que esta molécula *TLR2* se encuentra presente en los pacientes que sufren de Enfermedad de Crohn o Colitis Ulcerosa y que no están en pacientes que sufren de otra enfermedad diferente, podría ser útil para entender mejor porqué se produce la enfermedad y a futuro plantear nuevos tratamientos posibles.

PROCEDIMIENTOS: Durante un crisis de la enfermedad de su su hijo/hija/persona a cargo, la cual será determinada clínicamente por su médico tratante, se tomará una muestra de sangre de 15 ml, este procedimiento se realizará como cualquier otro examen de sangre solicitado previamente por el médico tratante de su hijo/hija/persona a cargo durante sus controles. En esta muestra se determinará los niveles de la molécula *TLR2* circulante en el suero. Cuando su su hijo/hija/persona a cargo haya alcanzando la etapa de inactividad de su enfermedad, se le tomará nuevamente 15 ml de sangre para volver a determinar la presencia de esta molécula en el suero circulante.

Los resultados obtenidos del estudio de sus muestras de sangre serán conocidos por su médico tratante quien le informará personalmente de los resultados obtenidos al estudiar las muestras de su su hijo/hija/persona a cargo.

Se le solicita su autorización para que las muestras de sangre de su su hijo/hija/persona a cargo que no sean utilizadas en este estudio puedan ser congeladas en un refrigerador a -80°C , lo que permitirá a nuestro grupo de investigación seguir realizando estudios de la enfermedad de su hijo/hija/persona a cargo con el fin de lograr entender mejor los mecanismos que la producen y tener la posibilidad de encontrar nuevos y mejores tratamientos. En caso de que nuestro grupo de investigación desee utilizar sus muestras para un próximo estudio destinado a conocer que otros factores pueden provocar la aparición o modificar la evolución de la enfermedad que presentan su hijo/hija/persona a cargo, nosotros nos comprometemos a solicitar previamente su aprobación y la de él/ella.

CONFIDENCIALIDAD: Los resultados obtenidos del estudio de las muestras sangre de su hijo/hija/persona a cargo serán conocidos solamente por el equipo de investigación que forma parte de este estudio manteniendo de esta manera la máxima confidencialidad de su participación.

BENEFICIOS: La opción de entender mejor esta enfermedad y lograr tener nuevos tratamientos podría permitir tratar mejor a los pacientes que padecen estas enfermedades.

RIESGOS: Debe quedar claro que la toma de muestra de sangre será similar a los exámenes de sangre solicitados por el médico tratante de su hijo/hija/persona a cargo por lo que están exentas de riesgo para la evolución de su enfermedad.

COSTOS: Tanto la toma de las muestras de sangre como su análisis no tendrán ningún costo extra para usted ni para el enfermo.

COMPENSACIÓN: No existirá ninguna ayuda económica por la participación de su hijo/hija/persona a cargo en este estudio.

COMUNICACIÓN: La investigación a la cual se le está invitando a participar se realiza en la Sección de Gastroenterología y el Departamento de Cirugía del Hospital Clínico de la Universidad de Chile y la Clínica Las Condes, en conjunto con el Laboratorio de Inmunidad Innata, Programa Disciplinario de Inmunología, Instituto de Ciencias Biomédicas, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. En caso necesario usted se podrá contactar con el coinvestigador principal: Dr. Rodrigo Quera P (teléfono: 4888300, Servicio de Gastroenterología Clínica Las Condes).

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico de la Universidad de Chile (teléfono) y de la Clínica Las Condes (teléfono).

DERECHOS DEL PARTICIPANTE: Debe tener claro que en caso de no aceptar que el enfermo participen en este estudio, la atención y dedicación entregada por el equipo de médicos tratantes no serán afectadas.

Por lo tanto declaro que YO he sido informado por el Investigador Principal/Médico Responsable quien estimó que el Diagnóstico de mi hijo es compatible con los criterios de selección del estudio.

Declaro además haber entendido toda y cada una de las partes del documento que estoy firmando.

Firma paciente

Investigador Principal
o Médico Responsable

Fecha y hora de la Firma Consentimiento Informado:



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA INVESTIGACIÓN CLINICA (Grupo paciente entre 15-18 años con Enfermedad Inflamatoria Intestinal refractaria al tratamiento)

El objeto de esta información es explicarte porque nosotros te estamos pidiendo que nos ayudes a realizar este estudio de investigación donde buscamos determinar la presencia de una molécula llamada TLR2 en el intestino de pacientes que tienen una enfermedad similar a la suya (Enfermedad Inflamatoria Intestinal, ya sea Enfermedad de Crohn o Colitis Ulcerosa).

Si nosotros logramos demostrar que esta molécula *TLR2* se encuentra presente en los pacientes que sufren de Enfermedad de Crohn o Colitis Ulcerosa y que no están en pacientes que sufren de otra enfermedad diferente, podría ser útil para entender mejor porqué se produce la enfermedad y a futuro plantear nuevos tratamientos posibles.

Tu médico tratante, que es uno de los coinvestigadores, ha considerado que el tratamiento no ha logrado controlar tu enfermedad y que tú necesitas ser operado para poder manejarla de manera adecuada. Es por eso que te solicitamos, si es posible que una vez que el médico te haya sacado el colon o el intestino, nosotros podamos tomar un pequeño trozo de estos para poder realizar nuestro estudio. Estas muestras las obtendremos sólo después que te hayan extraído el colon o el intestino. Además nosotros te tomaremos una muestra de sangre que será similar a las muestras de sangre que te ha solicitado tu médico tratante antes de tu operación. Ninguno de los dos procedimientos de toma de muestras alterará tu evolución.

Los resultados obtenidos del estudio de sus muestras de intestino, colon o sangre serán conocidos por su médico tratante quien le informará personalmente de los resultados obtenidos al estudiar sus muestras.

También te pedimos tu aprobación para que las muestras de sangre y biopsias que no sean utilizadas en este estudio puedan ser congeladas en un refrigerador a -80°C , lo que permitirá a nuestro grupo de investigación seguir realizando estudios sobre tu enfermedad con el fin de lograr entender mejor los mecanismos que la producen y tener la posibilidad de encontrar nuevos y mejores tratamientos. En caso de que nuestro grupo de investigación desee utilizar tus muestras para un próximo estudio destinado a conocer que otros factores provocan la aparición o modifican la evolución de su enfermedad, nosotros nos comprometemos a solicitar previamente tu aprobación.

Aunque tus padres o la persona a tu cargo han aceptado nuestra petición de que tú puedas participar en nuestro estudio, tú estás en todo tu derecho de negarte a participar y nosotros aceptaremos esa decisión.

Declaro además haber entendido toda y cada una de las partes del estudio y documento que estoy firmando.

Firma paciente

Investigador Principal
O Médico Responsable

Fecha y hora de la Firma Asentimiento Informado:



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA INVESTIGACIÓN CLINICA (Grupo Control entre 15 a 18 años)

El objeto de esta información es explicarte porque nosotros te estamos pidiendo que nos ayudes a realizar este estudio de investigación donde buscamos determinar la presencia de una molécula llamada TLR2 en el intestino de pacientes que tienen una enfermedad diferente a la tuya y que se llama Enfermedad Inflamatoria Intestinal (Enfermedad de Crohn o Colitis Ulcerosa).

Si nosotros logramos demostrar que esta molécula *TLR2* se encuentra presente en los pacientes que sufren de Enfermedad de Crohn o Colitis Ulcerosa y que no están en pacientes que sufren de otra enfermedad diferente, podría ser útil para entender mejor porqué se produce la enfermedad y a futuro plantear nuevos tratamientos posibles. Sin embargo para que este estudio sea útil, es necesario comparar los resultados de estos pacientes con los obtenidos desde un grupo control que pueden ser pacientes con apendicitis aguda. El médico tratante a cargo tuyo ha considerado que tú tienes este cuadro por lo que necesitas ser operado.

Nosotros te solicitamos si es posible que una vez que el médico te haya sacado el apéndice, nosotros podamos tomar un pequeño trozo de este para poder realizar nuestro estudio. Estas muestras las obtendremos sólo después que te hayan extraído el apéndice. Además nosotros te tomaremos una muestra de sangre que será similar a las muestras de sangre que te ha solicitado tu médico tratante antes de tu operación. Ninguno de los dos procedimientos de toma de muestras alterará tu evolución.

Los resultados obtenidos del estudio de tus muestras de apéndice y sangre serán conocidos por tu médico tratante quien te informará personalmente de los resultados obtenidos al estudiar tus muestras.

También te pedimos tu aprobación para que las muestras de sangre y biopsias que no sean utilizadas en este estudio puedan ser congeladas en un refrigerador a -80°C , lo que permitirá a nuestro grupo de investigación seguir realizando estudios sobre la enfermedad inflamatoria intestinal con el fin de lograr entender mejor los mecanismos que la producen y tener la posibilidad de encontrar nuevos y mejores tratamientos. En caso de que nuestro grupo de investigación desee utilizar tus muestras para un próximo estudio destinado a conocer que otros factores provocan la aparición o modifican la evolución de su enfermedad, nosotros nos comprometemos a solicitar previamente tu aprobación.

Aunque tus padres o la persona a tu cargo han aceptado nuestra petición de que tú puedas participar en nuestro estudio, tú estás en todo tu derecho de negarte a participar y nosotros aceptaremos esa decisión.

Declaro además haber entendido toda y cada una de las partes del estudio y documento que estoy firmando.

Firma paciente

Investigador Principal
o Médico Responsable

Fecha y hora de la Firma Asentimiento Informado:



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA INVESTIGACIÓN CLÍNICA (Grupo entre 15 a 18 años con Enfermedad Inflamatoria Intestinal con actividad en diferentes estadios)

El objeto de esta información es explicarte porque nosotros te estamos pidiendo que nos ayudes a realizar este estudio de investigación donde buscamos determinar la presencia de una molécula llamada TLR2 en el intestino de pacientes que tienen una enfermedad similar a la suya (Enfermedad Inflamatoria Intestinal, ya sea Enfermedad de Crohn o Colitis Ulcerosa).

Si nosotros logramos demostrar que esta molécula *TLR2* se encuentra presente en los pacientes que sufren de Enfermedad de Crohn o Colitis Ulcerosa y que no están en pacientes que sufren de otra enfermedad diferente, podría ser útil para entender mejor porqué se produce la enfermedad y a futuro plantear nuevos tratamientos posibles.

Tu médico tratante, que es uno de los coinvestigadores, ha considerado que tu enfermedad se encuentra activa. Nosotros que remos solicitarte si es posible tomar una muestra de sangre ahora y una nuevamente cuando te encuentres en buenas condiciones y tu enfermedad se encuentre inactiva. Esto nos permitirá determinar la molécula *TLR2* en las dos etapas de tu enfermedad (actividad e inactividad). Estas muestras de sangre serán similares a las muestras de sangre que te ha solicitado tu médico tratante en otras ocasiones. Ninguno de los dos procedimientos de toma de muestras alterará tu evolución.

Los resultados obtenidos del estudio de sus muestras sangre serán conocidos por tu médico tratante quien te informará personalmente de los resultados obtenidos al estudiar sus muestras.

También te pedimos tu aprobación para que las muestras de sangre que no sean utilizadas en este estudio puedan ser congeladas en un refrigerador a -80°C , lo que permitirá a nuestro grupo de investigación seguir realizando estudios sobre tu enfermedad con el fin de lograr entender mejor los mecanismos que la producen y tener la posibilidad de encontrar nuevos y mejores tratamientos. En caso de que nuestro grupo de investigación desee utilizar tus muestras para un próximo estudio destinado a conocer que otros factores provocan la aparición o modifican la evolución de su enfermedad, nosotros nos comprometemos a solicitar previamente tu aprobación.

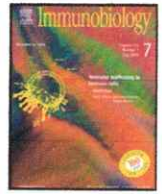
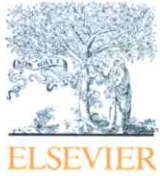
Aunque tus padres o la persona a tu cargo han aceptado nuestra petición de que tú puedas participar en nuestro estudio, tú estás en todo tu derecho de negarte a participar y nosotros aceptaremos esa decisión.

Declaro además haber entendido toda y cada una de las partes del estudio y documento que estoy firmando.

Firma paciente
o Médico Responsable

Investigador Principal

Fecha y hora de la Firma Asentimiento Informado:



Increased production of soluble TLR2 by lamina propria mononuclear cells from ulcerative colitis patients

Enzo Candia^a, David Díaz-Jiménez^a, Patricia Langjahr^a, Lucía E. Núñez^a, Marjorie de la Fuente^a, Nancy Farfán^a, Francisco López-Kostner^b, Mario Abedrapo^c, Manuel Alvarez-Lobos^d, George Pinedo^e, Carol J. Beltrán^f, Carlos González^g, María-Julietta González^h, Rodrigo Queraⁱ, Marcela A. Hermoso^{a,*}

^a Disciplinary Program of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, Universidad de Chile, Santiago, CL 8380453, Chile

^b Oncology and Molecular Genetics Laboratory, Colorectal Surgery Unit, Clínica Las Condes, Santiago, CL 7591018, Chile

^c Colorectal Surgery Unit, Department of Surgery, Hospital Clínico de la Universidad de Chile, Santiago, CL 6530499, Chile

^d Gastroenterology Department, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, CL 6513677, Chile

^e Coloproctology Section, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, CL 8330023, Chile

^f Gastroenterology Department, Hospital Clínico de la Universidad de Chile, Santiago, CL 6530499, Chile

^g Veterinary School, Universidad Andrés Bello, Santiago, CL 0251, Chile

^h Cell and Molecular Biology Program, Biomedical Sciences Institute, Faculty of Medicine, Universidad de Chile, Santiago, CL 8380453, Chile

ⁱ Gastroenterology Unit, Clínica Las Condes, Santiago, CL 7591018, Chile

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 April 2011

Received in revised form

13 September 2011

Accepted 28 October 2011

Keywords:

Toll-like receptor 2

Ulcerative colitis

Inflammatory bowel diseases

Monocytes

ABSTRACT

Toll-like receptor 2 (TLR2) is a type I pattern recognition receptor that has been shown to participate in intestinal homeostasis. Its increased expression in the lamina propria has been associated with the pathogenesis in inflammatory bowel disease (IBD), such as ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD). Recently, soluble TLR2 (sTLR2) variants have been shown to counteract inflammatory responses driven by the cognate receptor. Despite the evident roles of TLR2 in intestinal immunity, no study has elucidated the production and cellular source of sTLR2 in IBD. Furthermore, an increase in the population of activated macrophages expressing TLR2 that infiltrates the intestine in IBD has been reported. We aimed first to assess the production of the sTLR2 by UC and CD organ culture biopsies and lamina propria mononuclear cells (LPMCs) as well as the levels of sTLR2 in serum, and then characterize the cell population from lamina propria producing the soluble protein.

Mucosa explants, LPMCs and serum were obtained from UC, CD patients and control subjects. The level of sTLR2 was higher in conditioned media from organ culture biopsies and LPMCs from UC patients in comparison to CD and controls. Moreover, an inverse correlation between the content of intestinal and serum sTLR2 levels was observed in UC patients. Additionally, when characterizing the cellular source of the increased sTLR2 by LPMCs from UC patients, an increase in TLR2⁺/CD33⁺ cell population was found. Also, these cells expressed CX3CR1, which was related to the increased levels of intestinal FKN in UC patients, suggesting that a higher proportion of TLR2⁺ mononuclear cells infiltrate the lamina propria. The increased production of sTLR2 suggests that a differential regulating factor of the innate immune system is present in the intestinal mucosa of UC patients.

© 2011 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

The two main clinically defined forms of inflammatory bowel disease (IBD) are ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD).

Abbreviations: TLR2, toll-like receptor 2; sTLR2, soluble TLR2; IBD, inflammatory bowel diseases; UC, ulcerative colitis; CD, Crohn's disease; FKN, fractalkine; CX3CR1, FKN receptor; LPMCs, lamina propria mononuclear cells; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; IL, interleukin.

* Corresponding author at: Disciplinary Program of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, Universidad de Chile, Independencia 1027, Santiago, CL 8380453, Chile. Tel.: +56 2 978 6572; fax: +56 2 978 6979.

E-mail address: mhermoso@med.uchile.cl (M.A. Hermoso).

Although the etiology of IBD remains unclear, accumulating evidence suggests that deregulation of mucosal immune response to bacterial microbiota plays an important role in their pathogenesis, resulting in chronic inflammation in a genetically susceptible host (Baumgart and Carding 2007). Several genetic factors have been associated with susceptibility or IBD phenotype, such as variants in the immune receptor genes NOD2 (CARD15), CD14, and toll-like receptors (TLRs) 1, 2, 4 and 6 (Figuroa et al. 2006; Franchimont et al. 2004; Henckaerts et al. 2007; Pierik et al. 2006).

Toll-like receptors (TLRs) are a class of pattern recognition receptors (PRRs) that play a key role in microbial recognition and induction of the immune response. TLRs recognize components from pathogenic or commensal associated molecular patterns

(PAMPs or CAMPs, respectively) and endogenous ligands (Cario et al. 2002). Multiple mechanisms of negative regulation operate at different levels of the pathway to prevent over-activation of TLRs signaling. Intracellularly, the TLR signaling pathway can be regulated by cytoplasmic molecules, such as MyD88s, IRAK-M, TOLLIP, and by activation of the PI3K/Akt pathway, among others (Arancibia et al. 2011; Berglund et al. 2010; Burns et al. 2003; Kobayashi et al. 2002; Zhang and Ghosh 2002). Extracellularly, soluble TLR (sTLR) behaves as a decoy receptor that counteracts receptor activation. sTLR2 has been detected in human fluids, such as serum, plasma, breast milk, saliva and amniotic fluid (Dulay et al. 2009; Kuroishi et al. 2007; LeBouder et al. 2003). In particular, sTLR2 variants have been shown to block inflammatory responses driven by TLR2 activation, through negative regulatory effects, by acting as a decoy receptor, and by disrupting the close proximity between the coreceptor (CD14) and the receptor (TLR2) that is crucial to highly efficient signaling (LeBouder et al. 2003; Raby et al. 2009). The data indicates the presence of a single encoding TLR2 mRNA, and sTLR2 might result from a post-translational processing of the full-length receptor (LeBouder et al. 2003).

In the normal intestine, TLR2 is expressed in low levels by different cell types throughout the gastrointestinal tract, including lamina propria mononuclear cells (LPMCs) and intestinal epithelial cells (IECs) (Cario 2008; Cario and Podolsky 2000; Hausmann et al. 2002). Among the mononuclear cells, resident intestinal macrophages behave as anergic cells with a down-regulated expression of innate response-related receptors, such as CD14, CD16, CD32, Fc α R (CD89), Fc γ R (CD64), CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18). These cells produce low levels of cytokines, such as IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, TGF- β and TNF- α , and chemokines as RANTES, CCL4 and CCL21, while retaining their phagocytic and bactericidal activities (Smith et al. 2011; Smythies et al. 2005). This “no response phenotype” resident intestinal macrophage likely prevents an inappropriate activation, preserving intestinal homeostasis.

In IBD, a variety of inflammatory cells infiltrate the intestine. An increase in the population of activated macrophages has been demonstrated to be a central characteristic of the inflammatory process involved in the disease (Kamada et al. 2008; Nishida et al. 2002). An increased expression of TLR2 and TLR4 in intestinal macrophages from IBD patients has been reported (Hausmann et al. 2002; Tanaka 2008), suggesting that these pathways may be implicated in the inflammatory process and mononuclear cell phenotype. Additionally, cellular migration and recruitment to intestinal inflammatory areas are mainly mediated by a gradient of chemokines. Of these, fractalkine (FKN, or CX3CL1) is increased in IBD patients (Kobayashi et al. 2007). Experimental DSS-induced colitis in knock-out mice for its receptor (CX3CR1) promotes a reduced recruitment of macrophages to the tissue (Kostadinova et al. 2010).

Despite the data from the literature stating that TLR2 is highly expressed in IBD, no study has elucidated the identification of sTLR2 and its cellular source in the disease. In this study, we demonstrated that the expression of total TLR2 and sTLR2 in intestinal mucosa is increased in patients with UC. We further established that sTLR2 production and CD33⁺/TLR2⁺/CX3CR1⁺ cells are increased in the LPMCs from UC patients, suggesting that the intestinal mononuclear cell population with high levels of surface TLR2 may be the main cellular source of the decoy receptor.

Materials and methods

Patients and controls

Participants included in colonoscopic procedures and/or undergoing surgery were recruited from the Gastroenterology

Department as well as Colorectal Surgery Unit from Clínica Las Condes, Hospital Clínico Universidad de Chile and Hospital Clínico Pontificia Universidad Católica de Chile. Patients were diagnosed based on standard clinical, endoscopic and histological criteria. The study was approved by the Ethics Committee/Ethics Review Board of each participating center and all patients signed an informed consent prior to their enrollment in this study.

Between January 2009 and December 2010, 98 patients, including 35 (35.7%) with UC, 29 (29.6%) with CD and 34 (34.7%) controls to the pathology were subjected to colonoscopy. Biopsy specimens were obtained endoscopically from compromised areas of the intestine for mucosal tissue samples from active patients. Control samples were taken from patients with colorectal cancer or family history of colorectal cancer, and the absence of inflammation was histopathologically confirmed. Procedures were carried out by gastroenterologists with more than 5 years of experience in colonoscopy (co-authors RQ, FL-K, MA-L); findings were classified according to the clinical criteria of the Montreal Classification (Silverberg et al. 2005). Inclusion criteria for the study were: IBD diagnosed patient, >18 years-old. Patients excluded from the study were those with non-classifiable IBD, indeterminate colitis, celiac disease, eosinophilic enterocolitis, infectious ileocolitis, and history of autoimmune diseases, asthma and allergic disorders.

The histopathological score was used to evaluate intestinal inflammation in both diseases. Each biopsy was graded on a scale of 0–3 (0 = normal; 1 = mild; 2 = moderate; 3 = severe, including those patients with active ulceration) as previously described (Gomes et al. 1986) and reported (Díaz-Jiménez et al. 2011). In the case of UC, the mean age was 39.24 years (range 21–70), 40% were female, 17.1% presented with proctitis, 14.3% left-sided colitis and 68.6% presented with colitis, and endoscopic activity was determined in the most inflamed area using the endoscopic Mayo Score (Lewis et al. 2008). In the case of CD, the mean age was 43.15 years (21–86 range) and 51.7% were female. Of these patients, 48.3, 24.1 and 24.1% had colonic, ileal and ileocolonic compromise, respectively, and the endoscopic activity was determined according to the Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease (SES-CD) (Daperno et al. 2004; Sipponen et al. 2010). 89.7% presented with inflammatory behavior (non-stricturing, non-penetrating), and 4 (13.8%) patients had perianal involvement. Of all patients with IBD, only 4 (6.3%) had extraintestinal manifestations, such as arthralgia, erythema nodosum and pyoderma gangrenosum.

Intestinal resections from IBD patients subjected to surgery were collected for isolation of lamina propria mononuclear cells (UC = 14 (40.0%); CD = 9 (31.0%); control = 11 (32.4%)). Control samples were obtained from unaffected intestinal tissues of colon cancer patients. Samples of IBD patients were obtained from inflamed areas of each resected tissue. The IBD patients subjected to surgery were those refractory to treatment and the control patients were those with non-stricturing colon cancer requiring removal. At the moment of the colonoscopic or surgical procedure, 19 UC (54.2%) and 12 CD (41.4%) patients were active according to endoscopic Mayo score ≥ 2 and SES-CD score > 6 , respectively. For each group, 17.1% UC (6/35) and 27.6% CD (8/29) patients did not receive any medication and the predominant treatment consisted of 5-aminosalicylic acid (5-ASA) in 62.8% UC (22/35) and 37.9% CD (11/29) of patients. Although the low number of patients receiving a specific medication did not allow for statistical evaluation, the groups showed similar values for analyzed intestinal and serum TLR2.

Blood specimens were collected just before colonoscopy or surgery to determine serum sTLR2 levels. For total TLR2 determination in intestinal mucosa, biopsies were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until

analysis. For detection of sTLR2 production, organ culture biopsies were incubated in RPMI media containing 5% fetal calf serum, 100 IU/mL penicillin/streptomycin, 50 µg/mL gentamicin and 50 IU/mL amphotericin B. Cultures were maintained in a 5% CO₂ humidified incubator at 37 °C.

Preparation of lamina propria mononuclear cells (LPMCs) from intestinal mucosa

LPMCs were isolated from surgically resected intestinal tissue using enzymatic techniques as previously described (Kobayashi et al. 2007). Briefly, dissected mucosa was incubated with Hank's balanced salt solution (HBSS, Gibco, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 1 mM dithiothreitol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). The mucosa was then incubated in HBSS (Gibco, Carlsbad, CA, USA) containing 1 mM EDTA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) and incubated for 1 h in RPMI culture medium (Thermoscientific Hyclone, South Logan, UT, USA) with 1 mg/mL type IV collagenase and 1 mg/mL DNase I (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA). The cellular fraction was pelleted and separated twice through 40% isotonic Percoll solution, and cells were centrifuged over Ficoll-Hypaque density gradient (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Viable LPMCs population was determined by negative staining of propidium iodide by flow cytometry. Finally, the cell population that corresponded to LPMCs was cultured in RPMI medium containing 100 IU/mL penicillin/streptomycin, 50 µg/mL gentamicin and 50 IU/mL amphotericin B and maintained in a 5% CO₂ humidified incubator at 37 °C.

Flow cytometric analysis

Specific antibodies against CD33, TLR2 and isotype-matched control antibodies were purchased from eBiosciences (San Diego, CA, USA). Monoclonal antibodies for CX3CR1 and isotype-matched antibody were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA).

For cell staining, 3×10^5 freshly isolated cells were incubated with fluorescent-conjugated specific antibodies against CD33, TLR2 or CX3CR1, or isotype-matched antibodies for 30 min on ice. Cell-surface fluorescence intensity was assessed using a FACSCalibur analyzer and CellQuest software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

RNA isolation and amplification by RT-PCR

Total RNA was isolated from colonoscopic biopsies using Trizol[®] Reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) followed by treatment with TURBO DNase I (Ambion, Austin, TX, USA) and reverse transcribed using Affinity Script (Stratagene, La Jolla, CA, USA). PCR amplifications were carried out using Paq 5000 DNA polymerase (Stratagene, La Jolla, CA, USA) and 250 nM of each specific primer for human TLR2 (fwd: 5'-AACCGGAGAGACTTGCTCA-3'; rev: 5'-GGGAGGCATCTGGTAGAGTC-3') and human ribosomal RNA 18S (fwd: 5'-GTGGAGCGATTGTCTGGTT-3'; rev: 5'-CGCTGAGCCAGTCAGTGTAG-3') in a total volume of 25 µL. Each PCR amplification was performed in a Swift Maxi Thermal Cycler (ESCO Technologies, Hatboro, CA, USA) using the following conditions: initial denaturation at 95 °C for 10 min; 35 cycles at 94 °C for 30 s, 59 °C for 45 s and 72 °C for 45 s; and a final elongation step at 72 °C for 10 min. TLR2 amplified products were resolved in agarose gels and digitalized images were analyzed by optic densitometry analysis using Gel-Pro Analyzer 4.5 software (Media Cybernetics, Inc., USA). The values were normalized to 18S and expressed as relative arbitrary units.

Quantification of TLR2, FKN, sTLR2 and cytokines levels by intestinal mucosa and LPMC

Levels of TLR2 and FKN were determined using commercial enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA) kits (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). The sensitivity and specificity of the TLR2 ELISA was calculated, and the detection limit was 66 pg/ml. We also determined the minor dilution of the standard curve in the linear range, and this value was 62.5 pg/ml. Levels of TNF-α and IL-10 were also determined by ELISA (eBioscience, San Diego, CA, USA).

For biopsy analysis, protein extracts were obtained by homogenization using a low-detergent lysis buffer (LDB: 20 mM Tris HCl pH 7.5, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100) supplemented with a protease inhibitor cocktail (Complete mini, Roche Applied Sciences, Indianapolis, IN, USA) and subsequent disruption by sonication. Content of total intestinal TLR2 and FKN, as well as sTLR2 and cytokines, was adjusted to the total protein concentration in the mucosa sample or organ culture biopsy, determined by Bradford assay (Biorad, Hercules, CA, USA) and expressed as ng/mg of total protein.

For conditioned media analysis, supernatant from organ culture biopsies and LPMCs obtained after centrifugation was filtered by 0.22 µm pore to eliminate cellular debris and concentrated about 20 times using a 10 kDa exclusion column (Amicon ultra-4, Millipore, Billerica, MA, USA). The final concentration of sTLR2 was calculated, adjusting the concentration factor.

Immunoblotting

For TLR2 detection by immunoblot, small pieces of frozen colonic surgery samples were pulverized on dry ice and solubilized on ice-cold LDB supplemented with Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail tablets (Roche[®] Applied Science, Indianapolis, IN, USA). Mechanical breakdown of samples was performed by 5 freeze-thaw cycles (dry ice-room temperature). Protein concentration was determined by Bradford assay (BioRad, Hercules, CA, USA). Colonic mucosa proteins were separated onto 10% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis and electrotransferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Non-specific binding was blocked with a solution containing filtered white egg and 5% non-fat milk in TBS (2 mM Tris-HCl, pH 7.6, 13.7 mM NaCl). Detection of TLR2 was determined using a goat polyclonal antibody biotin-conjugated human raised against TLR2 extracellular domain (R&D Systems, Inc., USA) followed by horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (Strep.) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Actin content was also detected with a specific antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Immuno-reactive bands were visualized with the enhanced chemiluminescence (ECL) Western Blotting System (Amersham, Little Chalfont, UK). Densitometry analysis of specific bands from scanned-ray films were performed using Gel-Pro Analyzer 4.5 software (Media Cybernetics, Inc., USA). TLR2 intensity were normalized to actin and expressed as relative arbitrary units.

Specificity of TLR2 detection was performed by a competition assay with recombinant protein of the extracellular domain of TLR2 (rh-TLR2; R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA).

Tissue detection of TLR2 and macrophage marker

Immuno-histochemical analyses were performed on formalin-fixed paraffin-embedded tissue of colon biopsies from IBD patients and controls. Serial sections (3 µm) of paraffin-embedded tissue were mounted on positively charged glass slides, deparaffinized, rehydrated and stained following the immuno-peroxidase method of Ultravision-LP Large Volume Detection System HRP polymer

(Thermo scientific, Waltham, MA, USA). Briefly, sections were incubated with Ultra V Block solution (Thermo scientific, Waltham, MA, USA) and were then incubated with the specific primary antibodies: mouse anti-human CD68 (PG-M1; IgG3; Dako, Glostrup, Denmark), mouse anti-human TLR2 (TLR 2.1; IgG fraction; Abcam, Cambridge, UK) or isotype control (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO). The samples were then treated with Primary Antibody Enhancer (Thermo scientific, Waltham, MA, USA), washed and incubated with Ultra-vision ONE HRP Polymer (Thermo scientific, Waltham, MA, USA). Diaminobenzidine (DAB)-chromogen was added to the samples, and counterstained with hematoxylin Harris (Thermo scientific, Waltham, MA, USA) before mounted with Eukitt (EMS, PA, USA) for further examination under a light microscope.

Images were digitalized (Cool Snap-Pro CF, Half Cybernetic, USA) and analyzed morphometrically (Image Pro-Plus, Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA). Macrophage marker expression was evaluated in two different mucosal locations: the upper and lower part of the lamina propria. The immuno-reactivity was based on color detection and expressed in μm^2 , as previously described (Gonzalez et al. 2007).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5 software (La Jolla, CA, USA). The Kruskal–Wallis non-parametric test was applied to define differences in TLR2, FKN, cytokines and sTLR2 levels among the three groups included in the study. Further comparisons of all pairs of groups were performed using Bonferroni–Dunn's test. Comparison of two groups was performed using the Mann Whitney test. Association analysis was conducted using Spearman's correlation coefficient (r). For each statistical test, P values ≤ 0.05 were considered significant.

Results

TLR2 variants in intestinal mucosa from IBD patients

Soluble TLR2 is released by placental tissue (Dulay et al. 2009). To evaluate the production of sTLR2 by intestinal mucosa, organ culture biopsies from IBD and control patients were incubated for 24 h in culture media and detected by ELISA in the supernatant. The median values of sTLR2 accumulation in conditioned media were 0.48, 1.44 and 0.36 ng/mg for control, UC and CD, respectively (Fig. 1A). The mucosal explants from UC patients produced significantly higher levels of sTLR2 than CD and control patients ($P < 0.05$) (Fig. 1A).

To contrast the levels of sTLR2 released into the culture media with the initial content of TLR2 in the intestine of IBD patients, biopsies taken from patients were analyzed by ELISA. Median values of total mucosal TLR2 levels were 0.37, 0.92 and 0.71 ng/mg for controls, UC and CD, respectively. Comparison of median values of total intestinal mucosa TLR2 levels showed a significant difference between UC and controls ($P < 0.05$) (Fig. 1B).

We next evaluated the protein levels of TLR2 in colonic mucosa of patients with IBD and controls by immunoblot and optical density (Fig. 1C, left panel). Median values of full-length TLR2 variant (97 kDa) were 0.31, 0.60, and 0.24 arbitrary units (a.u.) for controls, UC and CD, respectively. The band intensity in mucosal tissues was significantly higher in UC compared to controls and CD ($P < 0.05$) (Fig. 1C), although a high dispersion of TLR2 content was observed in UC patients as reflected in the representative immunoblot. The detection specificity of TLR2 was confirmed by incubation of the transferred intestinal proteins with streptavidin–HRP alone or anti-TLR2 in combination with recombinant human extracellular domain of TLR2 (rhTLR2). We consistently detected a specific

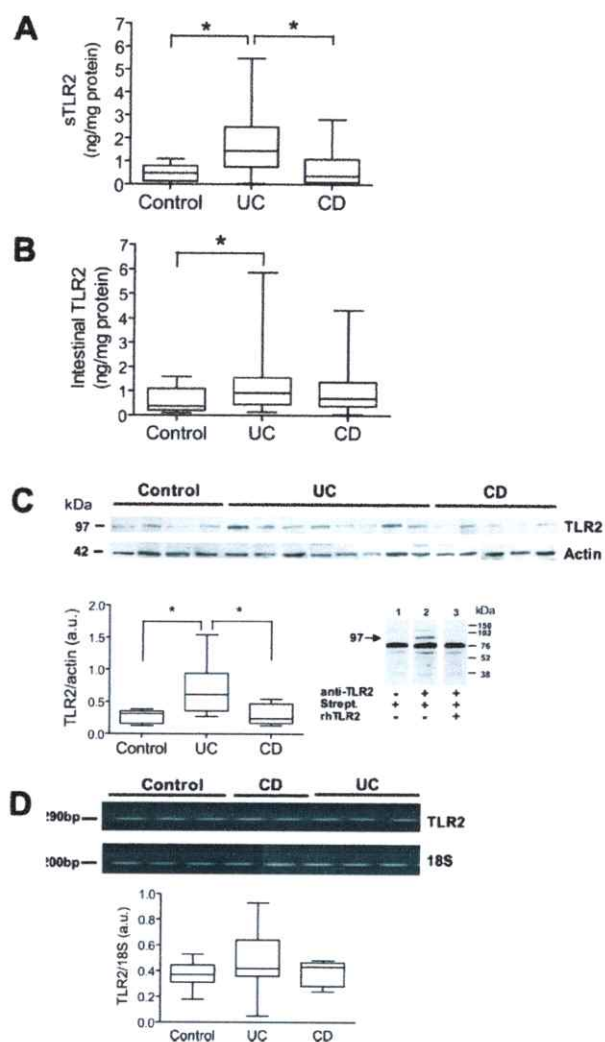


Fig. 1. Intestinal mucosa from UC patients produce high levels of sTLR2. (A) Release of sTLR2, determined by ELISA in conditioned media of organ culture biopsies from IBD and control patients cultured *ex vivo* for 24 h. sTLR2 release, normalized to total protein content of each explant, was significantly higher in UC patients compared to control and CD patients groups ($*P < 0.05$). (B) Total TLR2 level in intestinal biopsies was determined by ELISA in protein extracts from control, UC and CD biopsies and normalized to total protein content. UC patients show higher TLR2 levels in comparison with control subjects ($*P < 0.05$). (C) TLR2 detection, by immunoblot, in colonic mucosa from control, UC and CD patients. A representative figure shows the expression of full-length TLR2 (97 kDa) and actin (42 kDa), as a loading control (Upper panel). The lower plot shows optical densitometric analysis of TLR2 relative to actin (TLR2/actin). Relative TLR2 expression was significantly higher in UC compared with control and CD patients ($*P < 0.05$). The lower right figure shows the specificity of the immuno-blot assay. Unspecific binding of the detection system (Strept.) is observed in lane 1. A recombinant protein of the TLR2 (rhTLR2) was used for a competition assay (lane 3). The arrow shows the specific band of TLR2 (97 kDa, lane 2). (D) The expression of TLR2 mRNA (97 kDa) was detected by RT-PCR in intestinal mucosa from IBD patients. A representative figure shows the amplified products for TLR2 and rRNA 18S (290 bp and 200 bp, respectively). Relative expression of TLR2 was measured by optical densitometry and normalized to rRNA 18S (TLR2/18S). No significant difference was found among groups. a.u., arbitrary units.

97 kDa immunoreactive band that may be the TLR2 full-length variant according to the theoretical molecular weight (Fig. 1C, lower right gel).

To assess whether the high content of TLR2 in UC patients was related to elevated gene expression, TLR2 transcripts were analyzed by RT-PCR in colonoscopic biopsies of intestinal mucosa (Fig. 1D). Although there were no statistically significant differences in TLR2 mRNA content among groups, there was a

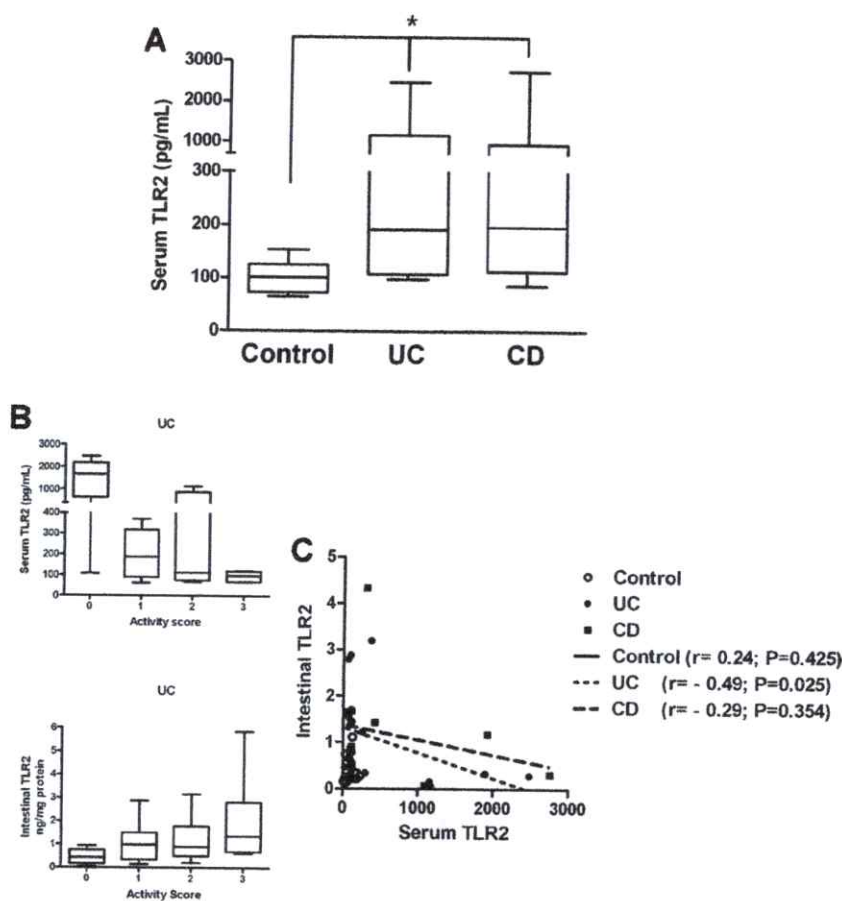


Fig. 2. Serum sTLR2 levels are increased in IBD patients. (A) Serum sTLR2 content was quantified by ELISA in samples from UC and CD patients as well as control individuals. Significant differences were found in serum sTLR2 content from CD patients compared to controls ($*P < 0.05$). (B) Analysis of serum sTLR2 and total intestinal TLR2 levels in UC patients according to activity scores. Distribution of serum sTLR2 and total intestinal TLR2 levels in UC patients according to the 4-rank Endoscopic Mayo Activity Score (A and C) (activity: 0 = inactive; 1 = mild; 2 = moderate; 3 = severe). Data are represented as median and percentiles (25th–75th). Serum sTLR2 levels among UC patient sub-groups tend to be inversely related to activity scores. Total intestinal TLR2 levels are directly associated with activity scores. (C) Correlation analysis of total intestinal TLR2 and serum sTLR2 levels for control, UC and CD patients. Trend lines, Spearman's rank correlation coefficient (r) and significantly different values (P) for each group are shown. A significantly negative correlation was found for UC patients ($*P = 0.029$).

trend toward higher levels in the UC patients (Fig. 1D, lower graph).

Detection of sTLR2 in serum of patients with IBD

Soluble TLR2 has been previously identified in human plasma, breast milk, saliva as well as amniotic fluid (Dulay et al. 2009; Kuroishi et al. 2007; LeBouder et al. 2003; Srinivasan et al. 2008). To assess whether changes in total TLR2 content in intestinal mucosa were reflected in the periphery, serum TLR2 levels were measured by ELISA in IBD and control patients. We found that median values of serum sTLR2 were 101.3, 192.6 and 197.4 pg/mL for control, UC and CD patients, respectively. The comparison of the sTLR2 levels in serum in IBD patients were significantly higher than those of controls ($P < 0.05$) (Fig. 2A). When the serum and intestinal TLR2 levels were analyzed according to the endoscopic activity indexes in UC patients, there were no statistically significant differences between those in an active or inactive state (Fig. 2B). However, a trend toward a decrease in serum sTLR2 levels and increase in mucosa total TLR2 content was seen in relation to the activity scores. Moreover, when a correlation analysis was performed for intestinal total TLR2 and serum sTLR2 content, we observed that only the UC group presented a significant inverse relationship between the variables ($r = -0.49$, $P = 0.025$) (Fig. 2C).

TLR2 and CD68 distribution in colonic mucosa tissue from IBD patients

Due to the high TLR2 levels observed LPMC in IBD (Cario 2008; Hausmann et al. 2002; Tanaka 2008) and the finding that the CD14⁺/CD33⁺ macrophage population increases in these diseases (Kamada et al. 2008), we investigated the macrophage distribution and expression of TLR2 in intestinal mucosa of IBD and controls patients by immuno-histochemistry. Representative images of tissue sections show the immuno-detection of CD68, an intracellular macrophage marker (Supplementary Fig. 1A–C) and TLR2 (Supplementary Fig. 1D–F). Morphometric analysis of CD68 distribution in the upper and lower part of the lamina propria showed a significantly higher immuno-reactivity in colonic sections of UC and CD in comparison to controls (Supplementary Fig. 1G). Moreover, TLR2 immuno-reactivity was increased in both regions of the intestinal lamina propria of UC and CD patients in comparison to controls (Supplementary Fig. 1H). TLR2 reactivity was significantly increased in UC and CD compared to controls (Supplementary Fig. 2H) ($P < 0.05$). Finally, the histopathological aspect of UC (Supplementary Fig. 1B and E) and CD (Supplementary Fig. 1C and F) samples showed edematous mucosa, numerous inflammatory cells in the lamina propria, deep ulceration of the mucosa and loss of normal integrity of

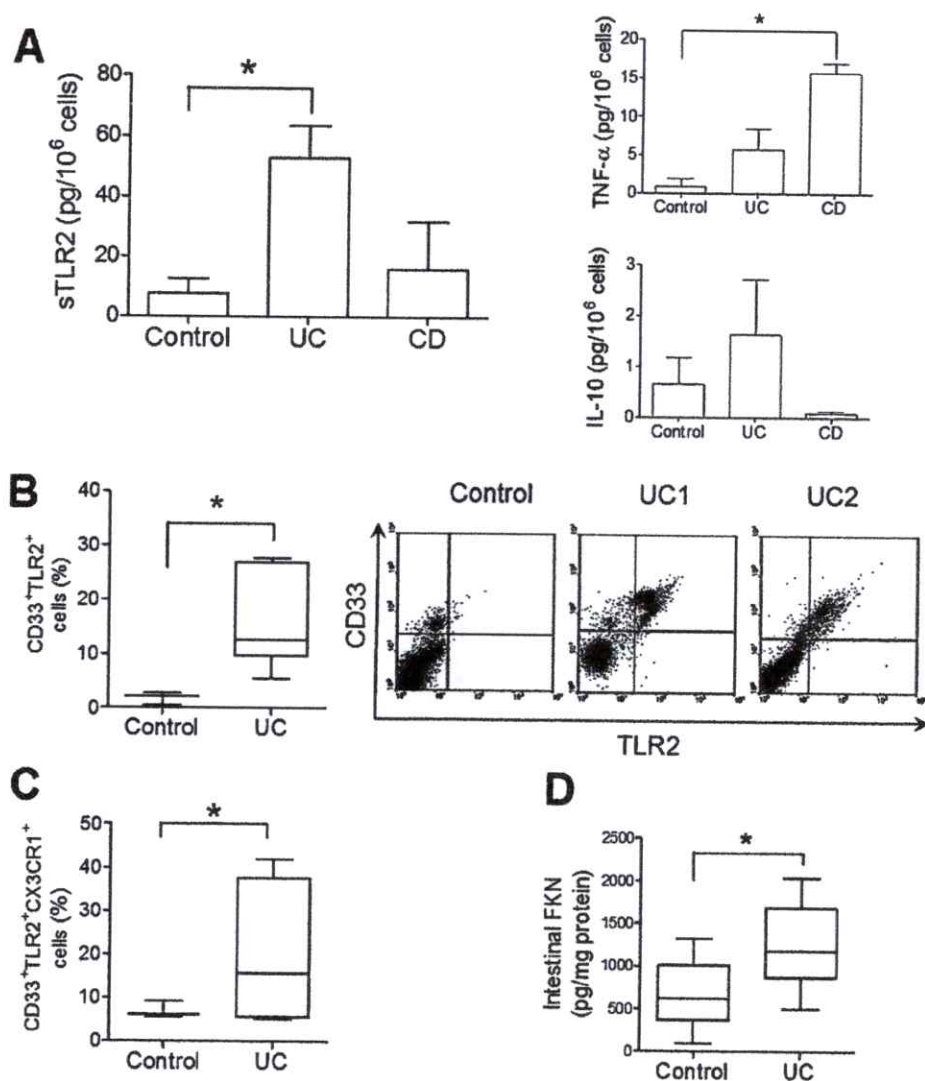


Fig. 3. CD33⁺/TLR2⁺ population is increased in LPMCs from UC patients. (A) LPMCs purified from IBD patients and control individuals were cultured *ex vivo* for 24 h. The release of sTLR2 (left), TNF- α and IL-10 (right) into the culture supernatant was assayed by ELISA. The sTLR2 production was significantly higher in UC compared with controls ($P < 0.05$). For TNF- α , a significantly increased production was observed in CD compared to controls ($P < 0.05$). No differences were determined for IL-10 levels. All concentrations are shown as means \pm SE. (B) Characterization of the purified LPMCs was carried out by FACS. The percentage of CD33⁺/TLR2⁺ cells present in controls and UC-purified LPMCs are shown in the left panel. This cell population is augmented in UC compared to controls ($P < 0.05$). Representative dot-plots for two UC patients (UC1 and UC2) and a control subject are shown in right panel. (C) The expression of FKN receptor, CX3CR1, was analyzed in the CD33⁺/TLR2⁺ population by FACS. The percentage of CD33⁺/TLR2⁺/CX3CR1⁺ cells is increased in UC compared to controls, ($P < 0.05$). (D) FKN level in intestinal mucosal biopsies from control and UC patients were assayed by ELISA. FKN concentration is significantly higher in UC compared to controls ($P < 0.05$).

intestinal tissue. A loss of goblet cell content and focal superficial erosion was mainly observed in UC patients (Supplementary Fig. 1B and E).

Production of sTLR2 by mononuclear cells of intestinal mucosa is increased in UC patients

We have observed that mucosa explants from UC patients release higher amounts of sTLR2 (Fig. 1A), TLR2 content is increased in lamina propria (Supplementary Fig. 1H), and LPMCs express high levels of TLR2 in IBD (Hausmann et al. 2002). Given the preceding, we aimed to characterize whether LPMCs are a principal source of the soluble receptor variant. We determined the accumulation of sTLR2 in the conditioned media of LPMCs cultured *ex vivo*. Mean values of sTLR2 levels in LPMCs conditioned media were 7.7, 52.7 and 16.0 pg/10⁶ cells for control, UC and CD patients, respectively (Fig. 3A, left panel). In addition, we found significant differences

between UC and control patients ($P < 0.05$) but not between CD and the control group. Moreover, when evaluating the release of an inflammatory cytokine into the culture media of LPMCs, we found that mean values of TNF- α content in the conditioned media were 1.0, 5.7 and 15.6 pg/10⁶ cells for control, UC and CD groups, respectively, with a statistically significant difference between CD and control LPMCs ($P < 0.05$) (Fig. 3A, upper right). When evaluating the content of IL-10 in the conditioned media of LPMCs, no difference among the groups was seen in the anti-inflammatory cytokine production (Fig. 3A, lower right).

As we determined that the higher production of sTLR2 was related to LPMCs obtained from UC patients, we then characterized the CD33⁺ cells present in the intestinal-purified LPMCs co-expressing TLR2. Given their potential role as a prevalent cellular source of sTLR2, we determined the TLR2 expression in this cell population by FACS analysis. CD33 was evaluated as a marker for intestinal monocytic cells, as previously done in several routine

isolation protocols from the colon (Junker et al. 2009; Kobayashi et al. 2007; Rogler et al. 1998). It would not have been convenient to use another macrophage marker, such as CD68, in flow cytometric analysis as the permeabilization steps performed for intracellular labeling lead to loss of cells and increase in cellular debris (Rogler et al. 1998). Although the CD33 protein is also expressed in granulocytes, the different gradient procedures performed for LPMCs isolation might allow us to obtain a highly pure cell population (Bull and Bookman 1977; Rogler et al. 1998). CD33⁺ cells were found in UC and control patients, as shown in the representative figure (Fig. 3B, right panel). The highest percentage of TLR2⁺/CD33⁺ cells was seen in the LPMCs from UC patients compared to the other groups ($P < 0.05$) (Fig. 3B). Median values of TLR2⁺/CD33⁺ cells were 2.10 and 12.55% for control and UC patients, respectively. Moreover, TLR2 expression is mainly restricted to CD33⁺ cells, as shown in the representative dot-plots (we included two UC patients to demonstrate the distribution of the data shown in the bar graph) (Fig. 3B). Thus, we found that 92.6% of the TLR2⁺ cells in LPMCs obtained from UC patients were CD33⁺ suggesting that a high proportion of the mononuclear cells expressed TLR2.

Expression of CX3CR1⁺ in the CD33⁺/TLR2⁺ cells from UC patients

Due to the increased content of the chemokine FKN in the inflamed mucosa from patients with IBD (Kobayashi et al. 2007) and the crucial role of its receptor, CX3CR1, in macrophage recruitment into the intestine (Kostadinova et al. 2010), we determined whether the CD33⁺/TLR2⁺ LPMCs population purified from UC patients expressing CX3CR1. CD33⁺/TLR2⁺/CX3CR1⁺ cells was significantly higher in UC compared to the control group ($P < 0.05$). We found that 15.6% of the CD33⁺/TLR2⁺ cells were CX3CR1⁺, meaning that CD33⁺/TLR2⁺/CX3CR1⁺ cells from UC patients increased 2.5-fold as compared to controls (Fig. 3C). Moreover, total FKN protein content in intestinal mucosa biopsy extracts was also higher in UC than controls, with median values of 1176.0 and 616.3 pg/mg, respectively ($P < 0.05$) (Fig. 3D). These data are related to the higher percentage of CX3CR1⁺/TLR2⁺/CD33⁺ macrophages found in UC patients.

Discussion

In this work, we showed for the first time elevated production of sTLR2 by LPMCs from UC patients and an increase of a specific CD33⁺/TLR2⁺ cell population in the lamina propria in comparison to controls.

TLR2 has been previously associated with IBD pathogenesis (Pierik et al. 2006) and has been shown to be increased in a cell population present in the lamina propria (Cario 2008; Cario and Podolsky 2000; Hausmann et al. 2002; Szebeni et al. 2008; Tanaka 2008). We found that expression of total TLR2 was significantly increased in intestinal mucosa from UC patients in comparison to CD and controls, although the expression of TLR2 mRNA was not significantly different among groups. While this finding may appear contradictory, similar observations were reported in Sjögren Syndrome for BP230 protein levels (Gonzalez et al. 2011). According to these studies, in *Saccharomyces*, a difference between relative transcription and translation efficiency has been documented (Tuller et al. 2007), suggesting that the cell preserves a global equilibrium between the processes. The translation efficiency can be modulated by several factors which contribute to the translation process as seen in medulloblastoma cells (Vogel et al. 2010).

We next demonstrated a significant increase in constitutive production of sTLR2 in conditioned media of organ culture biopsies from UC patients. Different cellular sources of the sTLR2 variant might contribute to the accumulation in cultured media of

organ culture biopsies, such as resident cells and immune cells that infiltrate the mucosa: macrophages, dendritic cells, mast cells and lymphocytes (Kamada et al. 2008; Nishida et al. 2002); nevertheless, sTLR2 production has been directly associated with monocytic cells (LeBouder et al. 2003). The molecular mechanism that generates this TLR2 regulatory protein may not involve alternative splicing (LeBouder et al. 2003). Our results suggest that the molecular origin of the high accumulation of sTLR2 found in conditioned media of mucosa explants from UC patients is a consequence of a post-translational modification of the surface TLR2 present in high levels in LPMCs isolated from these patients.

The increase in circulating sTLR2 might reflect a defective regulation of the innate immune response in IBD patients. Increased levels of sTLR2 in serum are inversely associated with the production of sTLR2 by mucosa explants of CD patients, suggesting that the source of circulating sTLR2 might be associated with cells from the periphery expressing high levels of surface receptor (Campos et al. 2011). On the other hand, for UC patients, increased levels of sTLR2 in serum are inversely associated with the activity of the disease: patients with a higher activity score have the lowest sTLR2 levels. Similar observations were reported for the soluble receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) that is decreased in the serum of patients with juvenile idiopathic arthritis and inversely correlates with disease activity and S100A12 levels (Viswanath et al. 2011). However, the activity of UC is directly associated with a higher content of total TLR2 in intestinal mucosa that is also reflected in an increased production of sTLR2 by organ culture biopsies. This trend in TLR2 levels in intestine and serum explains the inverse correlation that we have seen and indicates that the sTLR2 variant might be a regulator of local inflammation in UC patients.

TLR2 has been attributed with non-immune functions such as maintenance of intestinal homeostasis and protection from direct epithelial injury, likely by production of several factors (heat-shock proteins, TNF, IL-6 and KC-1) (Rakoff-Nahoum et al. 2004) involved in cytoprotection and tissue repair as KGF-1 (Putnins et al. 2002), KGF-2 (Sanale et al. 2002), TGFβ1 (van Tol et al. 1999) and VEGF (Li et al. 2001; Zheng et al. 2002). Many of these factors are important in protection from gut injury (Podolsky 1999). In a deficient-TLR2 mouse model, major damage in the mucosa was observed after chemically-induced colitis, suggesting that the TLR2 signaling pathway might promote mucosa healing and protection (Rakoff-Nahoum et al. 2004). As there is an excess of sTLR2 in UC, the receptor signaling pathway might be partially abolished, impairing mucosal healing and tolerance, processes that are absent in UC.

In an attempt to dissect the system and to make a closer approximation of the possible cellular source of sTLR2, we found that the LPMCs obtained from UC patients produced elevated levels of the soluble receptor. A high percentage of TLR2⁺ mononuclear cells present in the lamina propria cells were also CD33⁺, suggesting that this cell population likely corresponds to the same described in CD patients by other authors (Kamada et al. 2008). A consistent increase in TLR2 associated with monocyte/macrophages might be related to the change in intestinal tolerance and/or loss of mucosa integrity that occurs in IBD. In line with this, we observed an increased production of TNF-α by LPMCs cultures in CD in comparison with control patients, as has been previously reported (Kamada et al. 2008). In relation to IL-10, this cytokine has a tendency to increase in UC, and the resulting ratio between these cytokines might reflect a differential inflammatory environment between the diseases. Monocytic cells present in UC have a distinctive inflammatory profile due to production of soluble factors that might add a new characteristic differentiating both diseases. These cells are involved in increased production of sTLR2 in UC, an observation that strengthens the disparity between the diseases, in particular the source of soluble pro- as well anti-inflammatory molecules that

might contribute to a more superficial or deeper injury in UC and CD, respectively. This concept is reinforced by the observation that additional soluble molecules, such as sST2, have been differentially detected in the pathologies (Beltran et al. 2010).

IBD is characterized by intestinal infiltration by pro-inflammatory cells. Evidence suggests that resident differentiated macrophages have a lower proliferative capacity (van Furth et al. 1979) and the increase in CD68⁺ cells might be a consequence of their influx from the periphery (Rugtveit et al. 1994). In the present study, we demonstrated that the percentage of CD33⁺/TLR2⁺ cells expressing CX3CR1 is increased in LPMCs of patients with UC that most likely correspond to the cells reported previously in CD (Kamada et al. 2008). Moreover, the total FKN content in intestinal mucosa is also increased in UC, suggesting that this chemokine-receptor interaction might be involved in the increased recruitment of mononuclear cells into the mucosa. Participation of the FKN/CX3CR1 axis in the intestinal infiltration by macrophages was documented in mice subjected to colitis and further treated with a neutralizing antibody raised against FKN and in CX3CR1 deficient mice subjected to colitis. The severity of the colitis was alleviated in both animal models (Kostadinova et al. 2010; Nishimura et al. 2009), indicating a relevant role of the FKN/CX3CR1 pathway in intestinal inflammation leading to a colitis phenotype.

In conclusion, we postulate that the inflammatory response that characterizes the UC disease favors the increased production of the sTLR2 that has been shown to be a negative regulatory factor of the innate immune system. Even though more experiments need to be done to elucidate the role and the mechanism involved in sTLR2 production from intestinal macrophages as well as the contribution of soluble variants of other TLRs to immune surveillance of the intestinal mucosa, our results suggest that there is a differential regulation of the mucosal immune response in UC and CD.

Acknowledgments

This work was funded by the Science and Technology Foundation of Chile (FONDECYT) grant 1080290 and by the Academic Direction of Las Condes Clinic (DA-CLC) grant PI200909. The authors wish to thank all patients and control subjects for their participation in this study. Finally, we want to thank A. Calixto and A. Ferreira for critically revising the manuscript and to C. Muñoz and I. Contreras for their constructive support in the immuno-histochemistry studies.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.imbio.2011.10.023.

References

- Arancibia, S., Benitez, D., Nuñez, L.E., Jewell, C.M., Langjhar, P., et al., 2011. Phosphatidylinositol 3-kinase interacts with the glucocorticoid receptor upon TLR2 activation. *J. Cell. Mol. Med.* 15, 339–349.
- Baumgart, D.C., Carding, S.R., 2007. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 369, 1627–1640.
- Beltran, C.J., Nuñez, L.E., Diaz-Jimenez, D., Farfan, N., Candia, E., et al., 2010. Characterization of the novel ST2/IL-33 system in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 16, 1097–1107.
- Berglund, M., Melgar, S., Kobayashi, K.S., Flavell, R.A., Hornquist, E.H., Hultgren, O.H., 2010. IL-1 receptor-associated kinase M downregulates DSS-induced colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 16, 1778–1786.
- Bull, D.M., Bookman, M.A., 1977. Isolation and functional characterization of human intestinal mucosal lymphoid cells. *J. Clin. Invest.* 59, 966–974.
- Burns, K., Janssens, S., Brissoni, B., Olivos, N., Beyaert, R., Tschopp, J., 2003. Inhibition of interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4. *J. Exp. Med.* 197, 263–268.
- Campos, N., Magro, F., Castro, A.R., Cabral, J., Rodrigues, P., et al., 2011. Macrophages from IBD patients exhibit defective tumour necrosis factor- α secretion but otherwise normal or augmented pro-inflammatory responses to infection. *Immunobiology* 216, 961–970.
- Cario, E., 2008. Barrier-protective function of intestinal epithelial Toll-like receptor 2. *Mucosal Immunol.* 1 (Suppl. 1), S62–S66.
- Cario, E., Brown, D., McKee, M., Lynch-Devaney, K., Gerken, G., Podolsky, D.K., 2002. Commensal-associated molecular patterns induce selective toll-like receptor-traffic from apical membrane to cytoplasmic compartments in polarized intestinal epithelium. *Am. J. Pathol.* 160, 165–173.
- Cario, E., Podolsky, D.K., 2000. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect. Immun.* 68, 7010–7017.
- Daperno, M., D'Haens, G., Van Assche, G., Baert, F., Bulois, P., et al., 2004. Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD. *Gastrointest. Endosc.* 60, 505–512.
- Díaz-Jiménez, D., Núñez, L.E., Beltrán, C.J., Candia, E., Suazo, C., et al., 2011. Soluble ST2: a new and promising activity marker in ulcerative colitis. *World J. Gastroenterol.* 17, 2181–2190.
- Dulay, A.T., Buhimschi, C.S., Zhao, G., Oliver, E.A., Mbele, A., et al., 2009. Soluble TLR2 is present in human amniotic fluid and modulates the intraamniotic inflammatory response to infection. *J. Immunol.* 182, 7244–7253.
- Figuerola, C., Peralta, A., Herrera, L., Castro, P., Gutierrez, A., et al., 2006. NOD2/CARD15 and Toll-like 4 receptor gene polymorphism in Chilean patients with inflammatory bowel disease. *Eur. Cytokine Netw.* 17, 125–130.
- Franchimont, D., Vermeire, S., El Housni, H., Pierik, M., Van Steen, K., et al., 2004. Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 53, 987–992.
- Gomes, P., du Boulay, C., Smith, C.L., Holdstock, G., 1986. Relationship between disease activity indices and colonoscopic findings in patients with colonic inflammatory bowel disease. *Gut* 27, 92–95.
- Gonzalez, C., Abello, P., Cepeda, R., Salazar, L., Aravena, O., et al., 2007. Inflammation, synovial angiogenesis and chondroid apoptosis in the evolution of type II collagen-induced arthritis. *Eur. Cytokine Netw.* 18, 127–135.
- Gonzalez, S., Aguilera, S., Alliende, C., Urzua, U., Quest, A.F., et al., 2011. Alterations in type I hemidesmosome components suggestive of epigenetic control in the salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 63, 1106–1115.
- Hausmann, M., Kiessling, S., Mestermann, S., Webb, G., Spottl, T., et al., 2002. Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology* 122, 1987–2000.
- Henckaerts, L., Pierik, M., Joossens, M., Ferrante, M., Rutgeerts, P., Vermeire, S., 2007. Mutations in pattern recognition receptor genes modulate seroreactivity to microbial antigens in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 56, 1536–1542.
- Junker, Y., Bode, H., Wahnschaffe, U., Kroesen, A., Lodenkemper, C., et al., 2009. Comparative analysis of mononuclear cells isolated from mucosal lymphoid follicles of the human ileum and colon. *Clin. Exp. Immunol.* 156, 232–237.
- Kamada, N., Hisamatsu, T., Okamoto, S., Chinen, H., Kobayashi, T., et al., 2008. Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN- γ axis. *J. Clin. Invest.* 118, 2269–2280.
- Kobayashi, K., Hernandez, L.D., Galan, J.E., Janeway Jr., C.A., Medzhitov, R., Flavell, R.A., 2002. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* 110, 191–202.
- Kobayashi, T., Okamoto, S., Iwakami, Y., Nakazawa, A., Hisamatsu, T., et al., 2007. Exclusive increase of CX3CR1+CD28-CD4+ T cells in inflammatory bowel disease and their recruitment as intraepithelial lymphocytes. *Inflamm. Bowel Dis.* 13, 837–846.
- Kostadinova, F.I., Baba, T., Ishida, Y., Kondo, T., Popivanova, B.K., Mukaida, N., 2010. Crucial involvement of the CX3CR1-CX3CL1 axis in dextran sulfate sodium-mediated acute colitis in mice. *J. Leukoc. Biol.* 88, 133–143.
- Kuroishi, T., Tanaka, Y., Sakai, A., Sugawara, Y., Komine, K., Sugawara, S., 2007. Human parotid saliva contains soluble toll-like receptor (TLR) 2 and modulates TLR2-mediated interleukin-8 production by monocytic cells. *Mol. Immunol.* 44, 1969–1976.
- LeBouder, E., Rey-Nores, J.E., Rushmere, N.K., Grigorov, M., Lawn, S.D., et al., 2003. Soluble forms of Toll-like receptor (TLR)2 capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and breast milk. *J. Immunol.* 171, 6680–6689.
- Lewis, J.D., Chuai, S., Nessel, L., Lichtenstein, G.R., Aberra, F.N., Ellenberg, J.H., 2008. Use of the noninvasive components of the Mayo score to assess clinical response in ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 14, 1660–1666.
- Li, M., Carpio, D.F., Zheng, Y., Bruzzo, P., Singh, V., et al., 2001. An essential role of the NF- κ B/Toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue-repair gene expression by necrotic cells. *J. Immunol.* 166, 7128–7135.
- Nishida, Y., Murase, K., Isomoto, H., Furusu, H., Mizuta, Y., et al., 2002. Different distribution of mast cells and macrophages in colonic mucosa of patients with collagenous colitis and inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology* 49, 678–682.
- Nishimura, M., Kuboi, Y., Muramoto, K., Kawano, T., Imai, T., 2009. Chemokines as novel therapeutic targets for inflammatory bowel disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1173, 350–356.
- Pierik, M., Joossens, S., Van Steen, K., Van Schuerbeek, N., Vlietinck, R., et al., 2006. Toll-like receptor-1, -2, and -6 polymorphisms influence disease extension in inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* 12, 1–8.

- Podolsky, D.K., 1999. Mucosal immunity and inflammation. V. Innate mechanisms of mucosal defense and repair: the best offense is a good defense. *Am. J. Physiol.* 277, G495–G499.
- Putnins, E.E., Sanaie, A.R., Wu, Q., Firth, J.D., 2002. Induction of keratinocyte growth factor 1. Expression by lipopolysaccharide is regulated by CD-14 and toll-like receptors 2 and 4. *Infect. Immun.* 70, 6541–6548.
- Raby, A.C., Le Boudier, E., Colmont, C., Davies, J., Richards, P., et al., 2009. Soluble TLR2 reduces inflammation without compromising bacterial clearance by disrupting TLR2 triggering. *J. Immunol.* 183, 506–517.
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., Medzhitov, R., 2004. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118, 229–241.
- Rogler, G., Hausmann, M., Vogl, D., Aschenbrenner, E., Andus, T., et al., 1998. Isolation and phenotypic characterization of colonic macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 112, 205–215.
- Rugtveit, J., Brandtzaeg, P., Halstensen, T.S., Fausa, O., Scott, H., 1994. Increased macrophage subset in inflammatory bowel disease: apparent recruitment from peripheral blood monocytes. *Gut* 35, 669–674.
- Sanale, A.R., Firth, J.D., Uitto, V.J., Putnins, E.E., 2002. Keratinocyte growth factor (KGF)-1 and -2 protein and gene expression in human gingival fibroblasts. *J. Periodontol. Res.* 37, 66–74.
- Silverberg, M.S., Satsangi, J., Ahmad, T., Arnott, I.D., Bernstein, C.N., et al., 2005. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can. J. Gastroenterol.* 19 (Suppl A), 5–36.
- Sipponen, T., Nuutinen, H., Turunen, U., Farkkila, M., 2010. Endoscopic evaluation of Crohn's disease activity: comparison of the CDEIS and the SES-CD. *Inflamm. Bowel Dis.* 16, 2131–2136.
- Smith, P.D., Smythies, L.E., Shen, R., Greenwell-Wild, T., Gliozzi, M., Wahl, S.M., 2011. Intestinal macrophages and response to microbial encroachment. *Mucosal Immunol.* 4, 31–42.
- Smythies, L.E., Sellers, M., Clements, R.H., Mosteller-Barnum, M., Meng, G., et al., 2005. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J. Clin. Invest.* 115, 66–75.
- Srinivasan, M., Kodumudi, K.N., Zunt, S.L., 2008. Soluble CD14 and toll-like receptor-2 are potential salivary biomarkers for oral lichen planus and burning mouth syndrome. *Clin. Immunol.* 126, 31–37.
- Szebeni, B., Veres, G., Dezsöfi, A., Rusai, K., Vannay, A., et al., 2008. Increased expression of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the colonic mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Clin. Exp. Immunol.* 151, 34–41.
- Tanaka, K., 2008. Expression of Toll-like receptors in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Exp. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2, 193–196.
- Tuller, T., Kupiec, M., Ruppén, E., 2007. Determinants of protein abundance and translation efficiency in *S. cerevisiae*. *PLoS Comput. Biol.* 3, e248.
- van Furth, R., Raeburn, J.A., van Zwet, T.L., 1979. Characteristics of human mononuclear phagocytes. *Blood* 54, 485–500.
- van Tol, E.A., Holt, L., Li, F.L., Kong, F.M., Rippe, R., et al., 1999. Bacterial cell wall polymers promote intestinal fibrosis by direct stimulation of myofibroblasts. *Am. J. Physiol.* 277, G245–G255.
- Viswanath, V., Myles, A., Dayal, R., Aggarwal, A., 2011. Levels of serum matrix metalloproteinase-3 correlate with disease activity in the enthesitis-related arthritis category of juvenile idiopathic arthritis. *J. Rheumatol.* 38, 2482–2487.
- Vogel, C., de Sousa Abreu, R., Ko, D., Le, S.Y., Shapiro, B.A., et al., 2010. Sequence signatures and mRNA concentration can explain two-thirds of protein abundance variation in a human cell line. *Mol. Syst. Biol.* 6, 1–9.
- Zhang, G., Ghosh, S., 2002. Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. *J. Biol. Chem.* 277, 7059–7065.
- Zheng, M., Klinman, D.M., Gierynska, M., Rouse, B.T., 2002. DNA containing CpG motifs induces angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 8944–8949.

Congresos:

1.- “Caracterización de mecanismos posibles de procesamiento de TLR2 en la enfermedad inflamatoria intestinal”

Heine C, Farfán N., Langjhar P, Candia E, Díaz-Jiménez D, Núñez L.E, López F, Quera R., Hermoso M.A.

LXXXII Congreso Chileno e Internacional de Cirugía

XLI Jornadas Chilenas de Coloproctología

VII Jornadas chilenas de Cirugía Plástica

Sociedad de Cirujanos de Chile.

La Serena- Coquimbo.

29 de Noviembre al 2 de Diciembre de 2009.

2. - “Characterization of possible mechanism of TLR2 processing in inflammatory bowel diseases”

Farfán N., Candia E., Langjhar P., Carvajal S., Díaz- Jiménez D., Núñez L.E., Heine C., López-K F., Quera R., Hermoso M.A.

IX Congreso Latinoamericano de Inmunología.

Viña del Mar.

3 al 7 de Noviembre de 2009.

3.- “Caracterización de los mecanismos posibles de procesamiento de TLR2 en la Enfermedad Inflamatoria Intestinal”

Farfán N., Candia E., Langjhar P., Carvajal S., Díaz-Jiménez D., Núñez L.E., Heine C., López-K F, Quera R., Hermoso MA.

XXXVI Congreso Chileno de Gastroenterología.

XX Congreso Chileno de Endoscopia Digestiva.

XVIII Congreso Chileno de Hepatología.

Coquimbo, Chile.

21 al 23 de Octubre de 2009.