

DISCUSIÓN

Los estudios que integran esta tesis doctoral evalúan el potencial terapéutico del bloqueo funcional de las moléculas de adhesión endotelial ICAM-1, VCAM-1 y MAdCAM-1 en el contexto de la colitis experimental inducida por DSS, que se asemeja a la colitis ulcerosa en humanos. En el primer trabajo analizamos su expresión y su importancia funcional, además de comparar la efectividad terapéutica del bloqueo selectivo de estas moléculas, lo que podría tener claras implicaciones en la práctica clínica. El objetivo fundamental de los dos siguientes trabajos ha sido evaluar la posible modulación de las moléculas de adhesión endotelial que pueden ejercer, de forma directa o indirecta, los péptidos trébol, factores muy novedosos que aún no se han utilizado en la EII en humanos, y la CsA, inmunosupresor, por el contrario, muy empleado en esta enfermedad en situaciones específicas.

En los trabajos presentados confirmamos que la colitis inducida por DSS provoca un marcado incremento en la expresión endotelial de ICAM-1, VCAM-1 y MAdCAM-1 en el colon de estos animales con respecto a los ratones control. Además, la colitis induce un aumento de las interacciones leucocito-endotelio en las vénulas cólicas postcapilares, reflejado, sobre todo, en el aumento del flujo de leucocitos en rodamiento y del número de leucocitos adheridos al endotelio venular.

Aunque la expresión de las tres MAC analizadas aumenta de manera significativa en la colitis, la exactitud en la cuantificación de estas moléculas conseguida con la técnica del doble anticuerpo marcado permite establecer ciertas diferencias en este incremento. Así, la magnitud del incremento de ICAM-1 es mucho menor que la observada con VCAM-1 y MAdCAM-1 (1,5 frente a 3). Este hallazgo puede deberse a que ICAM-1 tiene una expresión basal o constitutiva 8 y 3 veces mayor que la de VCAM-1 o MAdCAM-1, respectivamente, por lo que su incremento no es tan marcado en situaciones de inflamación. Los anteriores resultados están en consonancia con los datos aportados por otros estudios experimentales^{29,75,162} y en humanos⁸⁷. Como hallazgo secundario descubrimos que la gravedad clínica de la colitis se correlaciona de manera positiva y consistente con la expresión de VCAM-1 y MAdCAM-1 en las vénulas del colon. Esto podría ser la base racional que nos permitiera, en un futuro, monitorizar la gravedad del brote de los pacientes con EII con la medida de la expresión de estas CAM. Aunque el DSS afecta al colon y, sobre todo, a su zona más distal¹⁴³, el hallazgo de un aumento en la expresión de VCAM-1 y MAdCAM-1 en el mesenterio y en el ciego hace pensar que el tóxico también daña la mucosa intestinal en tramos más proximales, o que la liberación de sustancias

proinflamatorias en el intestino inflamado activa células endoteliales en las proximidades del foco inflamatorio.

A pesar de todo lo anterior, debe de tenerse en cuenta que la observación de un incremento en la producción/expresión de determinadas sustancias proinflamatorias o de MAC no implica necesariamente que jueguen un papel en la fisiopatología del proceso inflamatorio o que puedan ser dianas terapéuticas. Por ello, otro de los aspectos novedosos de estos trabajos es la aplicación de las técnicas de microscopía intravital para el estudio de las interacciones leucocito-endotelio y para definir la relevancia funcional de las alteraciones en la expresión de ICAM-1, VCAM-1 y MAdCAM-1 mediante la inmunoneutralización de estas MAC. Los resultados del primer estudio demuestran un papel funcional clave de estas MAC como mediadores de la adhesión leucocitaria. El bloqueo agudo de ICAM-1 con un AcM no modifica la adhesión leucocitaria, mientras que el bloqueo de VCAM-1 o de MAdCAM-1 revierte el aumento de leucocitos adheridos, característico de los animales colíticos, a niveles similares a los encontrados en los ratones control. El bloqueo de VCAM-1 también consiguió disminuir el flujo de leucocitos en rodamiento a los 5 días del inicio de la colitis, aunque estos resultados no se repitieron a los diez días, es decir, al final de estudio. Estos datos concuerdan con los ya publicados de que las interacciones VCAM-1/ $\alpha_4\beta_1$ pueden mediar el rodamiento leucocitario¹⁷⁰. De manera global, estas observaciones sugieren que VCAM-1 y MAdCAM-1 actúan como mediadores en la adhesión leucocitaria en las vénulas cólicas de los ratones colíticos, mientras que ICAM-1 no parece ser un determinante de la adhesión leucocitaria en este modelo experimental de colitis.

En la actualidad existen algunos estudios que han analizado el potencial de las MAC como dianas terapéuticas, aunque la información sobre el valor relativo de un bloqueo selectivo de las diferentes MAC es muy escasa. Podolsky y cols.⁷⁹, como ya hemos comentado, demostraron un potente efecto terapéutico con el bloqueo de la integrina α_4 en el modelo de colitis en el tití de cabeza de algodón, mientras que el bloqueo de la E-selectina no produjo ninguna mejoría en la inflamación intestinal. En el presente estudio, la comparación del valor terapéutico de la inmunoneutralización selectiva de ICAM-1, VCAM-1 o MAdCAM-1 demuestra claramente que el bloqueo crónico de VCAM-1 consigue mejorar el curso de la colitis, siendo superior al bloqueo de ICAM-1 o de MAdCAM-1. Estas observaciones concuerdan con los primeros estudios realizados en humanos, en los que el tratamiento mediante un antisentido

anti-ICAM-1 no mejora el curso de la enfermedad de Crohn, mientras que el bloqueo de α_4 (receptor de VCAM-1 y de MAdCAM-1), aporta un beneficio terapéutico.

En el segundo artículo hemos demostrado el efecto protector del péptido trébol TFF2 en la colitis inducida por DSS. Este efecto parece ser mayor cuando el péptido se administra de manera tópica, en comparación con la administración sistémica. Por el contrario, la administración intracolónica de TFF2 no tiene un efecto curativo en la colitis establecida. El efecto protector de TFF2 en el colitis experimental se acompañó de una dramática reducción de la expresión de VCAM-1 en el endotelio del colon, probablemente un efecto indirecto de la modulación de otros factores implicados en la cascada inflamatoria.

Hasta la fecha se han publicado sólo dos estudios terapéuticos que utilizan los péptidos trébol en la colitis experimental. Mashimo y cols.²⁵ indujeron una colitis a ratones con deficiencia genética del péptido trébol TFF3 con la administración de ácido acético. La colitis desarrollada fue más grave que la obtenida en ratones normales. Además, el tratamiento con enemas de TFF3 consiguió mejorar la evolución clínica. En un estudio reciente en el que se utilizaba un modelo de colitis inducida en rata con DNBS/etanol, que remeda a la enfermedad de Crohn, la administración intracolónica de TFF2 mejoró la reparación epitelial del colon¹²⁹. En el presente estudio hemos demostrado que la administración intracolónica de TFF2 mejora la colitis inducida por DSS cuando se administra de manera preventiva, es decir, cuando se inicia el tratamiento con el péptido a la vez que el tóxico. A diferencia de Tran y cols.¹²⁹, no hemos observado ningún efecto beneficio cuando el TFF2 fue administrado después de la inducción de la colitis. Estos resultados indican que el efecto terapéutico de TFF2 en el modelo experimental estudiado es débil, y en todo caso, preventivo. Por consiguiente, de plantearse estudios en la colitis ulcerosa humana con este péptido, debería ensayarse, inicialmente, su valor en la prevención de las recurrencias de la enfermedad.

Los trabajos que han evaluado la eficacia de diferentes vías de administración de los péptidos trébol, en modelos de prevención del daño mucoso gástrico inducido por etanol, han obtenido resultados contradictorios. Algunos autores encontraron más protección con la administración tópica¹⁷¹, otros con la sistémica¹⁶⁵ y un tercer grupo publicó que ambas vías de administración eran igual de efectivas^{172,173}. Los resultados obtenidos en nuestro estudio muestran que la administración tópica o luminal es superior a la sistémica o peritoneal.

La microscopía intravital de fluorescencia mostró que el pretratamiento con TFF2 intracolónico, que mejora el curso clínico de la colitis, disminuye la adhesión leucocitaria hasta los niveles observados en los animales control. La administración de TFF2 después del desarrollo de la colitis, que fue inefectivo desde el punto de vista clínico, no modificó la adhesión leucocitaria en las vénulas intestinales.

El pretratamiento con TFF2 disminuyó la expresión endotelial de VCAM-1 en el colon, lo que se asocia a una mejoría de la colitis y a una disminución de la adhesión leucocitaria. Para nuestra sorpresa, la expresión de MAdCAM-1 se incrementó en el colon, yeyuno e íleon. La explicación de este resultado paradójico puede estar en que TFF2 podría estabilizar las moléculas de MAdCAM-1 en la superficie de las células endoteliales a través de interaccionar con sus regiones mucínicas. Para evaluar si el efecto que la administración de TFF2 tiene sobre la expresión de VCAM-1 es directo o bien resultante de la modulación de otros factores implicados en la cascada inflamatoria, recurrimos a los cultivos primarios con células HUVEC. Dado que la incubación de estas células en ausencia o en presencia de diferentes concentraciones de TFF2 no modificó el incremento de VCAM-1 inducido por TNF- α , concluimos que el efecto era indirecto, posiblemente a través de la disminución de la producción de citocinas, ya que observamos concentraciones reducidas de TNF- α y de IL-6 en el tejido cólico de los animales tratados con TFF2.

Los resultados del tercer estudio demuestran que el tratamiento con CsA disminuye de manera marcada el incremento en la expresión de las MAC y el reclutamiento leucocitario que se asocia a la presencia de inflamación intestinal, y mejora el curso clínico de la colitis inducida por DSS. Los estudios dosis-respuesta permitieron conocer que la dosis más efectiva era la de 4 mg/kg de peso/día, idéntica a la utilizada en la práctica clínica. Estas observaciones de los efectos clínicos de la CsA están en consonancia con las evidencias publicadas de que este inmunosupresor atenúa la gravedad de la colitis en diferentes modelos experimentales, incluyendo la colitis por DSS¹⁷⁴, por peptidoglicano/polisacárido¹⁷⁵, oxazolona¹⁷⁶ o DNBS¹⁷⁷.

En contraste con los efectos supresores bien conocidos de la CsA en la transcripción del gen de la IL-2 en las células T, otros efectos inmunosupresores de este agente no han recibido la suficiente atención. Un posible mecanismo de acción de la CsA podría ser la modulación de la expresión de las MAC implicadas en los procesos de reclutamiento leucocitario. Los estudios realizados para investigar los efectos de la CsA en las funciones del endotelio vascular han aportado tanto efectos

protectores¹⁷⁸ como lesivos^{179,180}. Algunos estudios clínicos han demostrado que la CsA reduce la expresión de ICAM-1 en la dermis de pacientes con dermatosis actínica¹³⁹ y en el riñón trasplantado. En estudios experimentales se ha constatado que la CsA disminuye la expresión de ICAM-1 en las vénulas postcapilares de ratas expuestas al factor activador de plaquetas¹⁴⁰ y en el riñón de ratas con enfermedad del suero¹⁸¹, y de ICAM-1 y VCAM-1 en el rechazo miocárdico en conejos¹⁴¹. En este estudio demostramos que el tratamiento con CsA disminuye marcadamente la expresión endotelial de ICAM-1 y VCAM-1 en el colon de animales colícticos y no tiene efecto en el incremento que se produce en MAdCAM-1. Esta disminución puede ser debida, al menos en parte, a un efecto directo de la CsA en la expresión de las CAM, como confirman los estudios realizados en los cultivos primarios de células HUVEC. También disminuye la infiltración por neutrófilos (cuantificada por la actividad de mieloperoxidasa) y la concentración de TNF- α y de IL-6 en el tejido cólico, y la IL-6 circulante, lo que indica que la activación de las células inmunes y la consiguiente producción de citocinas pueden verse afectados, entre otros factores, por el tratamiento con CsA.

Las técnicas de microscopía intravital mostraron que la disminución de ICAM-1 y de VCAM-1 que sigue al tratamiento con CsA se acompaña de una marcada reducción del reclutamiento leucocitario en el intestino inflamado.

En conclusión, de los resultados obtenidos se desprende que VCAM-1 es una molécula de adhesión con un papel clave en la fisiopatología de la colitis inducida por DSS. El bloqueo de VCAM-1 por medio de AcM representa una nueva aproximación para el tratamiento de las enfermedades que cursan con inflamación intestinal, como la colitis ulcerosa. La inhibición de VCAM-1 podría tener la ventaja de preservar el tráfico leucocitario fisiológico, ya que esta MAC sólo se incrementa por estímulos inflamatorios. También queda claramente demostrado el efecto protector de TFF2 contra el daño inflamatorio cólico, especialmente tras su administración tópica, aunque no mostró eficacia en el tratamiento de la colitis ya establecida. Estas observaciones sugieren que la aplicación intraluminal de TFF2 podría ser útil en la prevención de los brotes de enfermedad en la colitis ulcerosa, en formas leves de colitis o como tratamiento adyuvante. Por último, el tratamiento con CsA inhibe la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 en la colitis experimental, lo que se acompaña de una disminución en las interacciones leucocito-endotelio. Estos hallazgos aportan luz sobre los mecanismos que pueden contribuir al efecto

beneficioso de la CsA en la colitis ulcerosa y subrayan la importancia de los factores que gobiernan el reclutamiento leucocitario en la patogénesis de este modelo experimental. La diana de la acción de la CsA es el sistema inmune más que el endotelio, aunque las interacciones adhesivas leucocito-endotelio pueden representar un nuevo mecanismo de acción para este inmunosupresor. Este aspecto debería ser tenido en cuenta para optimizar el tratamiento de la colitis ulcerosa grave y, especialmente, para diseñar asociaciones terapéuticas sinérgicas adecuadas.