

METODOLOGÍA

MODELO DE COLITIS EXPERIMENTAL

Existe un gran número de modelos experimentales de colitis. La mayoría de estos modelos han sido desarrollados en rata o en ratón y presentan características clínicas, morfológicas y analíticas similares, hasta cierto punto, a las propias de los pacientes con colitis ulcerosa o con enfermedad de Crohn. En la actualidad no existe un consenso sobre cuál es, globalmente, el mejor modelo de colitis experimental. Así, un modelo de colitis será más o menos apropiado en función del aspecto concreto de la EII que se quiera estudiar¹⁴².

En los estudios que componen esta tesis se ha utilizado un modelo de colitis basado en la administración de DSS en ratones, que comparte muchas características con la colitis ulcerosa en humanos¹⁴³. El DSS se administra al 5% en el agua de bebida durante 4 días, siendo posteriormente retirado. Como otros agentes químicos, este tóxico altera la función protectora de la barrera mucosa antes de que se desencadene la colitis, incrementando la exposición de los macrófagos a la microflora de la mucosa¹⁴⁴, lo que termina por producir su activación y conduce a la liberación de citocinas proinflamatorias y a la inflamación. Los animales presentan diarrea, sangre en las heces y pérdida de peso, que es máxima 7-8 días después del inicio de la administración de DSS. El colon de estos animales se acorta y sus paredes se engrosan, apareciendo úlceras mucosas que no se suelen ver a simple vista. En el estudio histológico se aprecia una afectación difusa y casi siempre superficial de la mucosa del colon, con un infiltrado leucocitario compuesto de neutrófilos y macrófagos y alteración de la arquitectura glandular^{143,145,146}. De manera progresiva se va produciendo un incremento de linfocitos T activados en los segmentos dañados, mostrando un paralelismo con lo que ocurre en la colitis ulcerosa humana.

EVALUACIÓN DE LAS INTERACCIONES LEUCOCITO-ENDOTELIO CON MICROSCOPIA INTRAVITAL

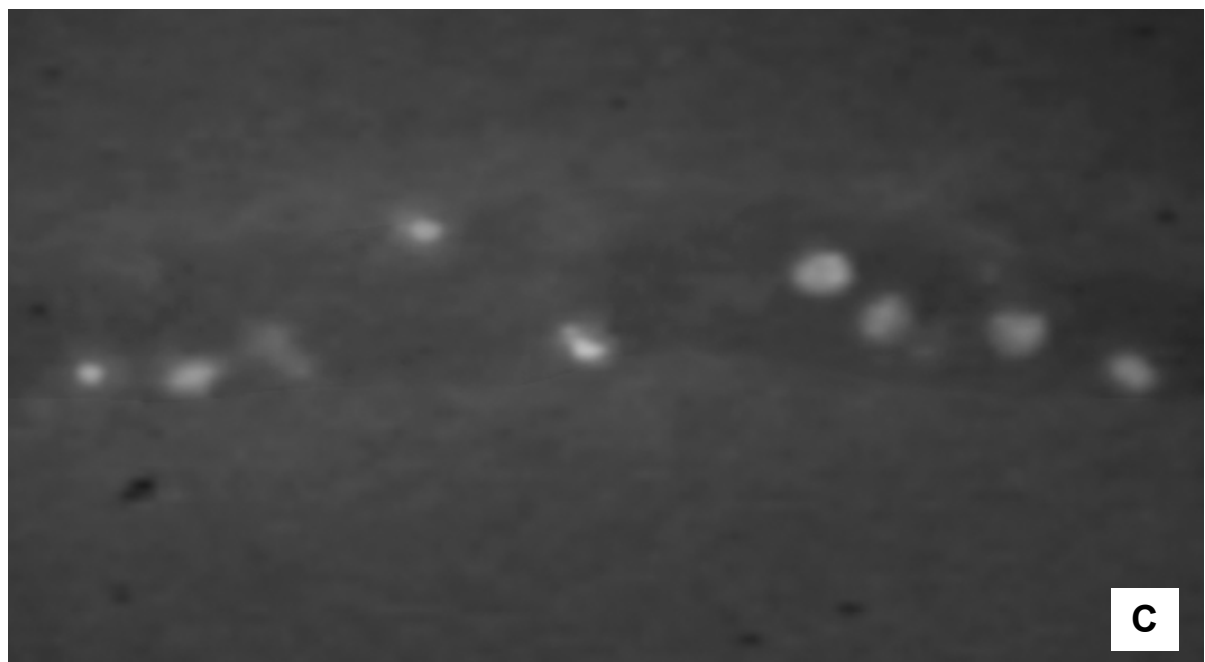
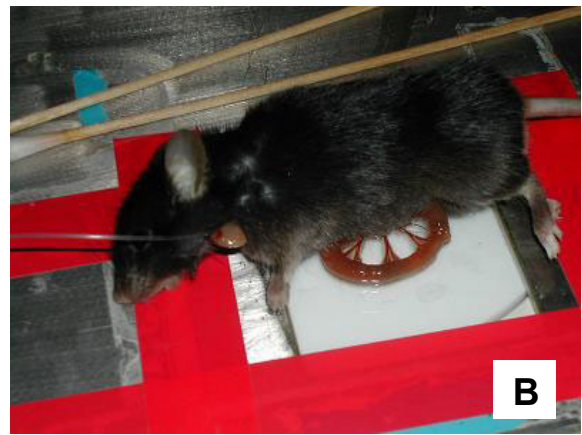
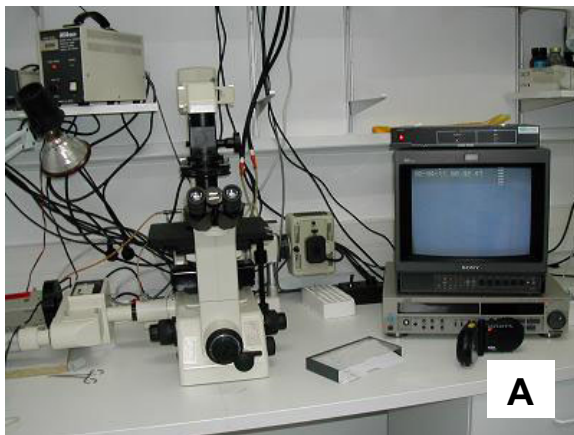
Para estudiar las interacciones leucocito-endotelio que se producen *in vivo* (fundamentalmente los fenómenos de rodamiento y de adhesión leucocitaria) en la microcirculación cólica de los animales con colitis, así como para evaluar la contribución individual de cada una de las MAC a estas interacciones, hemos recurrido a la microscopía intravital de fluorescencia.

Las técnicas de microscopía intravital permiten el estudio de las interacciones que los leucocitos establecen con el endotelio en un segmento venular (Figura 4). Los leucocitos que interactúan con la superficie endotelial pueden visualizarse directamente, ya que ven reducida su velocidad de forma marcada, con relación a la velocidad media del flujo sanguíneo en la vénula. Para realizar un estudio preciso de las interacciones leucocito-endotelio, primero efectuamos un registro de la vénula durante un minuto mediante una videocámara y, en un segundo tiempo, efectuamos el análisis detallado. Los parámetros de mayor interés son el *número de leucocitos adheridos* al endotelio (número de leucocitos inmóviles durante más de 30 segundos, en una porción de 100 μm de vénula), el *flujo de leucocitos con interacciones de rodamiento* (número de leucocitos que exhiben fenómenos de rodamiento, atravesando un punto determinado de la vénula, por minuto), la *velocidad venular media* y el *shear rate* (o fuerzas de dispersión, concepto que indica la oposición que efectúa el flujo sanguíneo a las interacciones leucocito-endotelio, y que está relacionado con el diámetro del vaso y la velocidad venular).

Las técnicas de microscopía intravital fueron desarrolladas, en un primer momento, para el estudio del mesenterio, ya que la microcirculación de este tejido puede ser visualizada fácilmente mediante transiluminación^{147,148}. Así, para el estudio del mesenterio se utiliza un microscopio convencional, no siendo necesaria la tinción de los leucocitos con un fluorocromo, ya que los leucocitos adheridos, en rodamiento o migrados al intersticio pueden ser fácilmente identificados. De igual forma, esta técnica permite también el estudio de la permeabilidad vascular, administrando a un animal albúmina marcada con fluoresceína por vía intravenosa. Además de en el mesenterio, las técnicas de microscopía intravital han sido también aplicadas al estudio de la microcirculación de otros órganos, como el cerebro¹⁴⁹, hígado¹⁵⁰, músculo¹⁵¹, piel¹⁵¹, estómago¹⁵² y placas de Peyer del intestino delgado^{153,154}. No

obstante, la microcirculación cólica no ha sido estudiada hasta hace pocos años, utilizando modelos animales de rata^{29,71}. Para adaptar las técnicas de microscopía intravital al estudio de la microcirculación cólica se tuvieron que realizar algunas modificaciones. Dado que el grosor de la pared del colon no permite el estudio de la microcirculación cólica por transiluminación, se utilizó un microscopio invertido de fluorescencia y se marcaron los leucocitos administrando el fluorocromo rodamina 6G por vía intravenosa. A pesar de ello, la microscopía intravital del colon no permite visualizar los leucocitos que han emigrado al intersticio. Además, la exteriorización *in vivo* del colon debe de hacerse con mucho cuidado por el peligro de provocar una tracción excesiva del mesocolon y colapsar la microcirculación. Comparada con el modelo en rata, la microscopía intravital aplicada al ratón plantea dificultades relacionadas con su pequeño tamaño, ya que es difícil disponer de una gran área de colon para explorar los vasos y conseguir la estabilidad de la preparación, intentando que la transmisión de los movimientos respiratorios no afecte al registro de las imágenes.

Figura 4. Evaluación de las interacciones leucocito-endotelio con microscopía intravital de fluorescencia. A, fotografía que muestra el microscopio invertido de fluorescencia, la cámara y el monitor. B, ratón anestesiado, con el intestino delgado exteriorizado y preparado para estudiar el mesenterio (en el estudio de la microcirculación del colon sólo puede externalizarse una porción muy pequeña de intestino sin provocar isquemia intestinal). Se puede apreciar, a la izquierda, la pequeña cánula que permite la inyección del fluorocromo en la vena yugular interna. C, imagen que muestra la luz de una vénula postcapilar de la pared del colon con leucocitos en rodamiento y adheridos (puntos blancos).



CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN ENDOTELIAL

Para cuantificar la expresión de ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1 y MAdCAM-1 hemos recurrido a dos técnicas diferentes: a la técnica radiactiva del doble anticuerpo marcado, que permite mediciones *in vivo* en modelos de colitis, y a técnicas de radioinmunoanálisis (ELISA) en cultivos primarios de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), para mediciones *in vitro*. La primera de ellas es, con mucho, la más importante en los trabajos que componen esta tesis doctoral.

Técnica del doble anticuerpo marcado

La determinación del grado de expresión de las moléculas de adhesión en la superficie endotelial se ha basado, hasta hace pocos años, en la realización de estudios de inmunohistoquímica^{30,85,86}. No obstante, esta metodología tiene diversas desventajas. En primer lugar, no permite realizar una cuantificación precisa del grado de expresión de las moléculas y, en segundo lugar, puede resultar poco útil para apreciar las variaciones en la expresión de aquellas moléculas que ya están presentes en el endotelio en condiciones basales (expresión constitutiva), o bien de moléculas cuya expresión es pequeña. En este último caso, un incremento porcentual importante en la expresión de estas moléculas puede comportar una expresión todavía escasa en valor absoluto, lo que se traducirá en una tinción tenue del endotelio al hacer el estudio de inmunohistoquímica.

Con el objetivo de cuantificar *in vivo* y de forma precisa la expresión de las moléculas expuestas en la superficie endotelial, el grupo de investigación en el que se ha realizado esta tesis doctoral ha desarrollado una técnica conocida como doble anticuerpo marcado (Figura 5)⁵⁵. Esta técnica consiste en la administración de un AcM marcado con ¹²⁵I dirigido contra la molécula a estudio. Simultáneamente se administra un segundo anticuerpo, inerte (*non-binding*), marcado con ¹³¹I, que permitirá compensar el posible acúmulo inespecífico de anticuerpo (es decir, por otras causas que no sean la unión específica a la molécula de interés). Cinco minutos después de administrar ambos anticuerpos, el animal es exanguinado (extracción de sangre a través de un catéter colocado en la arteria carótida con reposición simultánea de volumen a través de la vena yugular interna). A continuación se recogen los diferentes órganos y se cuantifica la radioactividad acumulada (¹²⁵I y ¹³¹I) mediante una

gammacámara. Finalmente, utilizando la siguiente fórmula, se obtiene la expresión endotelial del AcM en nanogramos de anticuerpo por gramo de tejido:

$$\text{Expresión de una molécula de adhesión (en ng de anticuerpo / g tejido)} = \left[\frac{\text{cpm } ^{125}\text{I } \text{órgano / g}}{\text{cpm } ^{125}\text{I } \text{inyectado}} \times \frac{\text{cpm } ^{131}\text{I } \text{órgano / g}}{\text{cpm } ^{131}\text{I } \text{inyectado}} \times \frac{\text{cpm } ^{125}\text{I } \text{plasma}}{\text{cpm } ^{131}\text{I } \text{plasma}} \right] \times \text{ng Ac inyectado}$$

Términos de la fórmula:

- Cpm: cuentas por minuto.
- ^{125}I ó ^{131}I en órgano: actividad de ^{125}I ó ^{131}I acumulada en un determinado órgano.
- ^{125}I ó ^{131}I inyectado: actividad total de ^{125}I (que se encuentra unido al anticuerpo específico) ó de ^{131}I (que se encuentra unida al anticuerpo inespecífico o *non-binding*) que se inyecta por vía intravenosa. Ambos se calculan separando una alícuota de 5 μL de la mezcla de anticuerpos antes de que ésta sea inyectada.
- ^{125}I ó ^{131}I en plasma: actividad residual de ^{125}I y de ^{131}I en el plasma a los 5 minutos de la administración intravenosa de la mezcla de anticuerpos marcados. Se calculan obteniendo una muestra de 100 μL de plasma.
- ng Ac inyectado: nanogramos de anticuerpo específico inyectado por vía intravenosa.

Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en los últimos cinco años por nuestro grupo^{152,155-157}, así como por otros grupos de investigación¹⁵⁸⁻¹⁵⁹ para cuantificar la expresión de diversas MAC, en diferentes tejidos, tanto en condiciones basales como en condiciones experimentales de inflamación.

ELISA en cultivos primarios de células endoteliales de vena umbilical humana

Para complementar los datos obtenidos en la expresión de las MAC en los modelos animales, hemos recurrido a los cultivos primarios de células HUVEC^{160,161}. Una vez conseguida una monocapa de células endoteliales confluentes, ésta fue estimulada, o no, con TNF- α e incubada con diferentes dosis de TFF2 o CsA. Tras esto, se utilizaron técnicas de ELISA para cuantificar la expresión de las MAC por medio de AcM específicos.

La utilización de células endoteliales aisladas en cultivo nos ha permitido, sobre todo, determinar si los cambios en la expresión de las MAC son un efecto directo de TFF2 o de CsA o, si por el contrario, son la expresión indirecta de la disminución de la inflamación cólica lograda con estos agentes terapéuticos en los modelos experimentales.

Figura 5. Cuantificación de la expresión de las moléculas de adhesión endotelial con la técnica del doble anticuerpo marcado. Véase la descripción en el texto.

