

## **JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**



## JUSTIFICACIÓN GENERAL

Como se ha comentado en la introducción, la EII es una enfermedad relativamente frecuente en nuestro medio, que afecta sobre todo a pacientes jóvenes, condicionando de manera importante su calidad de vida. Para desarrollar tratamientos más eficaces y seguros que los fármacos actuales es indispensable mejorar el conocimiento de la fisiopatología de la EII y, por tanto, de los mecanismos moleculares que tienen lugar en la respuesta inflamatoria. La clave podría estar en la modulación específica de algún determinante fundamental de la inflamación. Este planteamiento general nos ha conducido a realizar la presente tesis doctoral.

En el conjunto de la respuesta inflamatoria, las MAC son las últimas responsables de que los leucocitos se fijen a la superficie endotelial y puedan emigrar hacia el foco inflamatorio. Su bloqueo farmacológico impediría, por tanto, la llegada de nuevos leucocitos al área inflamada, con lo que la cascada inflamatoria quedaría interrumpida y el daño histológico no progresaría. Estos conceptos están comenzando a ser transferidos desde el laboratorio al paciente afecto de EII con la utilización de AcM que bloquean las diferentes MAC de manera específica.

Los pacientes que padecen esta enfermedad suelen presentar úlceras y erosiones en la pared intestinal que, dependiendo de la gravedad del brote, serán más o menos evidentes. Otra aproximación teórica que se está analizando en la EII es la utilidad de sustancias que promuevan el rápido restablecimiento de la integridad de la barrera mucosa, con lo que el sistema inmune del paciente dejaría de estar expuesto a los microorganismos de la luz intestinal y los mecanismos inflamatorios dejarían de retroalimentarse. Los péptidos trébol podrían jugar un papel importante en este punto, al aumentar la viscosidad del moco intestinal y promover la migración de células desde el fondo y la periferia de la úlcera hacia el área denudada. En la actualidad se desconoce si estos péptidos pueden ejercer parte de su acción terapéutica a través de las MAC.

A diferencia de los AcM antimoléculas de adhesión y los péptidos trébol, la CsA forma parte del arsenal terapéutico clásico de la EII, siendo un inmunosupresor de importancia capital en las formas más graves de colitis ulcerosa. A pesar de su amplia utilización en la práctica clínica, sus mecanismos de acción, en especial su relación con las MAC, no son bien conocidos. Una comprensión más profunda de cómo actúa

este inmunosupresor resulta esencial si queremos disminuir los efectos adversos que su administración provoca en los pacientes.

Si nos centramos en los aspectos metodológicos de esta tesis doctoral, la colitis inducida por DSS en el ratón es uno de los modelos de colitis experimental mejor caracterizado y más utilizado en los últimos años. Este modelo de colitis induce lesiones del colon que tienen una notable semejanza con las que presentan los pacientes con colitis ulcerosa. La microscopía intravital de fluorescencia, la técnica del doble anticuerpo marcado y la utilización de los cultivos primarios de células HUVEC nos han permitido evaluar tanto las interacciones leucocito-endotelio como cuantificar la expresión de las principales MAC en la colitis por DSS.

## JUSTIFICACIÓN ESTUDIO 1

Soriano A, Salas A, Salas Az, Sans M, Gironella M, Elena M, Anderson DC, Piqué JM, Panés J. VCAM-1, but not ICAM-1 or MAdCAM-1, immunoblockade ameliorates DSS-induced colitis in mice. **Laboratory Investigation** 2000; 80: 1541-51.

Las MAC endoteliales más relevantes son ICAM-1, VCAM-1 y MAdCAM-1. Estas moléculas juegan un papel fundamental en la adhesión del leucocito al endotelio en una amplia variedad de enfermedades inflamatorias agudas y crónicas, entre las que se incluye la EII<sup>162</sup>. Hasta ahora, para estudiar la expresión de estas moléculas en tejido intestinal de enfermos con colitis ulcerosa o con enfermedad de Crohn se ha recurrido a técnicas de inmunohistoquímica, que han mostrado resultados contradictorios<sup>86</sup>. Además de este problema, el significado funcional de los cambios de expresión de las MAC endoteliales en las vénulas cólicas, donde se producen los fenómenos de interacción entre el leucocito y el endotelio, se ha comenzado a estudiar sólo en fechas recientes<sup>29</sup>. Dado que la inmunoneutralización de las MAC se está comenzando a vislumbrar como una nueva estrategia para el tratamiento de la EII, es crucial elucidar la relevancia funcional y el potencial beneficio terapéutico de la inmunoneutralización selectiva de las diferentes MAC implicadas en los procesos de reclutamiento leucocitario en la EII. Así, este objetivo global se concreta en los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar el patrón de expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1, VCAM-1 y MAdCAM-1 en la colitis inducida por DSS en el ratón.
- Analizar la importancia funcional de las moléculas de adhesión ICAM-1, VCAM-1 y MAdCAM-1 en las interacciones leucocito-endotelio.
- Estudiar la utilidad de su bloqueo selectivo, agudo y crónico, en el tratamiento de la colitis experimental, y comparar su eficacia relativa.

## JUSTIFICACIÓN ESTUDIO 2

Soriano-Izquierdo A, Gironella M, Massaguer A, May FEB, Salas A, Sans M, Poulsom R, Thim L, Piqué JM, Panés J. Trefoil peptide TFF2 treatment reduces VCAM-1 expression and leukocyte recruitment in experimental intestinal inflammation. **Journal of Leukocyte Biology** 2004; 75: 214-223.

Los péptidos trébol desempeñan un papel importante en la defensa y reparación de la mucosa, manteniendo la integridad del epitelio. Su capacidad de interaccionar con las glicoproteínas mucinas, aumentando la viscosidad del moco<sup>163</sup>, y su capacidad motogéna, estimulando la migración de las células epiteliales hacia las zonas lesionadas<sup>164,165</sup>, sugieren que pueden ser de utilidad como agentes terapéuticos en las enfermedades que cursan con lesiones ulcerosas, como la EII. Las propiedades reparativas de los factores trébol se han demostrado en estudios con animales transgénicos<sup>25,166,167</sup> y en un modelo de colitis por DNBS<sup>129</sup>, aunque no se conocen sus potenciales efectos preventivos ni el valor relativo de las diferentes vías de administración de estos péptidos.

Atendiendo a su estructura, las MAC endoteliales también podrían clasificarse como mucinas<sup>168</sup>, pero las interacciones potenciales entre los péptidos trébol y las MAC no han sido estudiadas nunca. Es posible que los péptidos trébol puedan influir en la migración de células inflamatorias modulando la función o la expresión de las MAC en las células endoteliales. Esta hipótesis se sustenta en los resultados de un estudio reciente que ha demostrado que TFF2 y TFF3 se expresan en el tejido linfoide de la rata y que participan en la respuesta inmune inducida por el lipopolisacárido bacteriano estimulando la migración de leucocitos<sup>169</sup>. Por tanto, el objetivo fundamental de este estudio es analizar la posible relación entre los péptidos trébol y las MAC. Este objetivo global se concreta en los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar y comparar la eficacia preventiva y terapéutica de TFF2 en la colitis experimental por DSS.
- Comparar la eficacia de las vías de administración sistémica y tópica de TFF2.
- Examinar la posible relación entre los efectos terapéuticos de la administración de TFF2 con la expresión de las MAC endoteliales y el reclutamiento leucocitario, en el contexto de la respuesta inflamatoria intestinal.

### JUSTIFICACIÓN ESTUDIO 3

Soriano-Izquierdo A, Gironella M, Massaguer A, Salas A, Gil F, Piqué JM, Panés J. Effect of cyclosporin A on cell adhesion molecules and leukocyte-endothelial cell interactions in experimental colitis. **Inflammatory Bowel Diseases** 2004;10: 789-800.

La CsA es el único tratamiento que ha demostrado eficacia en el tratamiento de la colitis ulcerosa grave que no responde a los esteroides, evitando una colectomía urgente, al menos a corto plazo<sup>134</sup>. Este inmunosupresor actúa inhibiendo la producción de IL-2 por los linfocitos T helper<sup>137</sup>, aunque avances recientes en el estudio de la base molecular de la inflamación sugieren que las interacciones célula-célula mediadas por MAC específicas podrían ser nuevas dianas de los agentes inmunosupresores. Los estudios *in vitro* indican que la CsA puede afectar directamente la expresión de las moléculas de adhesión en células endoteliales estimuladas, aunque esta conclusión no ha sido comprobada en modelos animales de EII<sup>138</sup>. De confirmarse este nuevo mecanismo de acción de la CsA, se podrían diseñar asociaciones terapéuticas sinérgicas para disminuir la grave, e incluso fatal, toxicidad de la CsA, consiguiendo optimizar así el tratamiento de la colitis ulcerosa grave. Por tanto, el objetivo fundamental de este estudio es la comprobación de la hipótesis de que el tratamiento con CsA puede afectar la adherencia celular disminuyendo la expresión de las MAC, lo que se concreta en los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar la eficacia terapéutica de la administración de CsA en un modelo de colitis experimental semejante a la colitis ulcerosa en humanos.
- Analizar la relación entre los efectos terapéuticos de la ciclosporina A con la modulación del reclutamiento leucocitario y la expresión de las moléculas de adhesión endotelial.
- Determinar si los cambios en la expresión de las MAC que siguen al tratamiento con CsA son un efecto primario de este inmunosupresor.