



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Facultad de Medicina y Odontología
Departamento de Farmacología

Doctorado en Biomedicina y Farmacia

ESTUDIO DE MECANISMOS ETIOPATOGÉNICOS MODULADORES DE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL EN LA ENFERMEDAD DE CROHN

Tesis doctoral

SANDRA COLL PUIG

Directora

F^ª Sara Calatayud Romero

València, Julio 2025

Dña. Sara Fca. Calatayud Romero, Catedrática de la Universitat de València,

CERTIFICA:

Que el trabajo presentado por **SANDRA COLL PUIG**, titulado **“Estudio de mecanismos etiopatogénicos moduladores de la función endotelial en la enfermedad de Crohn”** para obtener el grado de Doctor por la Universitat de València dentro del Doctorado en Biomedicina y Farmacia, ha sido realizado bajo mi dirección y asesoramiento.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizo la presentación de la Tesis, para que sea juzgado por el tribunal correspondiente.

Lo que firmo en Valencia a junio 2025

FRANCISCA SARA
CALATAYUD
ROMERO

Firmado digitalmente
por FRANCISCA SARA
CALATAYUD|ROMERO
Fecha: 2025.06.11
13:29:44 +02'00'

Esta Tesis Doctoral ha sido financiada por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (MCIN)/Agencia Estatal de Investigación (AEI)/10.13039/501100011033 y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) (PID2019-108996RB-I00), por el MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y “FEDER, A way of making Europe” (PID2022-141011OB-I00), por el CIBERehd (EHD19PI05), y por la Generalitat Valenciana (CIPROM2021/044). He sido beneficiaria de una ayuda predoctoral financiada por la Conselleria de Innovación, Universidades, Ciencia y Sociedad Digital de la Generalitat Valenciana y el Fondo Social Europeo+ (ACIF/2019/178).

A Itziar, el meu solet



ÍNDICE

Listado de figuras	1
Listado de tablas	11
Resumen.....	15
Resum.....	27
Abstract	39
INTRODUCCIÓN.....	51
1. Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII)	53
1.1. Epidemiología.....	55
1.2. Diagnóstico.....	57
1.3. Tratamiento.....	58
2. Etiopatogénesis.....	59
2.1. Factores genéticos y epigenéticos.....	59
2.2. Factores ambientales	62
2.3. Disrupción de la barrera epitelial intestinal.....	63
2.4. Microbiota intestinal	65
2.5. Respuesta inmunitaria.....	66
3. Cambios estructurales de la pared intestinal en la enfermedad de Crohn.....	71
3.1. Alteraciones vasculares	71
3.2. Fibrosis.....	72
4. Procesos celulares con potencial patogénico en la enfermedad de Crohn.....	81
4.1. Interacciones leucocito-endotelio.....	81
4.2. Procesos de transición celular: EMT, EndoMT	84
5. Vías de señalización con potencial patogénico en la EC.....	87
5.1. Ruta Notch.....	87
5.2. Matriz extracelular	89
5.3. Vía succinato - SUCNR1	97

OBJETIVOS	103
MATERIAL Y MÉTODOS.....	107
1. Muestras humanas	109
1.1. Resecciones intestinales de pacientes con EC.....	109
1.2. Leucocitos mononucleares de sangre periférica (PBMCs)	110
1.3. Células endoteliales de vena del cordón umbilical humano (HUVEC)	112
1.4. Líneas celulares humanas.....	113
1.5. Tratamientos <i>in vitro</i>	114
2. Modelos murinos.....	116
2.1. Animales	116
2.2. Modelo murino de fibrosis intestinal: Trasplante Heterotópico... ..	117
2.3. Modelo murino de colitis crónica inducida por DSS	118
2.4. Modelo murino de inflamación aguda: Microscopía Intravital.....	118
3. Estudio transcriptómico en resecciones ileales de pacientes de Crohn.....	121
4. Análisis de la expresión génica.....	124
4.1. Aislamiento de ARN de tejido humano y murino.....	124
4.2. Aislamiento de ARN de células cultivadas.....	124
4.3. Síntesis de ADN complementario (ADNc) mediante transcripción reversa.....	125
4.4. PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).....	125
5. Análisis de la expresión de micro-ARNs.....	129
5.1. Aislamiento de ARN con protección de micro-ARNs.....	129
5.2. Selección de las sondas/cebadores TaqMan (miARNs).....	129
5.3. Síntesis de ADNc mediante RT	130
5.4. RT-qPCR-TaqMan.....	130

6.	Análisis de la expresión proteica.....	131
6.1.	Extracción de proteína total de tejido humano y murino	131
6.2.	Extracción de proteína total de células cultivadas.....	131
6.3.	Cuantificación de proteína total mediante el ensayo de BCA.....	132
6.4.	Western blotting (WB)	133
6.5.	Análisis histológico: Inmunohistoquímica	136
6.6.	Inmunocitoquímica (ITGA11)	139
7.	Adhesión dinámica en cámara de flujo paralelo	140
8.	Ensayo de cicatrización de heridas.....	143
9.	Ensayo de formación de tubos	144
10.	Citometría de flujo.....	146
11.	Análisis estadístico.....	147
12.	Reactivos	148
13.	Comités éticos.....	153
	RESULTADOS.....	155
1.	Estudio de secuenciación de ARNm en muestras de pacientes con EC.....	157
2.	Las muestras ileales de pacientes con EC muestran cambios en la expresión de componentes de la vía Notch.....	162
3.	Las muestras ileales de pacientes con EC muestran expansión de los compartimentos mesenquimal y vascular y pérdida del compartimento epitelial.....	166
3.1.	Matriz extracelular	166
3.2.	Compartimento vascular	169
3.3.	Compartimento epitelial	171
4.	Las muestras ileales de pacientes con EC muestran sobreexpresión de integrina $\alpha 11$.....	172
5.	La expresión de la integrina $\alpha 11$ y de Notch3 correlaciona con los indicadores de expansión de los compartimentos vascular y mesenquimal y con la reducción epitelial	175

6. La expresión de integrina $\alpha 11$ correlaciona con los indicadores de expansión de los compartimentos vascular y mesenquimal en modelos murinos de fibrosis intestinal.....	179
7. Influencia de la ruta Notch y de la integrina $\alpha 11$ en la función endotelial	182
7.1. El TGF- $\beta 2$ aumenta la expresión de Notch3 y de la integrina $\alpha 11$ en HUVEC e induce la transición endotelio-mesenquimal	183
7.2. El DLL4 aumenta la expresión de la integrina $\alpha 11$ y promueve la migración celular y la formación de tubos en HUVEC.....	186
7.3. La integrina $\alpha 11$ media la migración celular inducida por DLL4 en HUVEC.....	192
8. Efecto del DLL4 en otros tipos celulares implicados en la fibrosis intestinal	195
8.1. El DLL4 no afecta la expresión de receptores de colágeno o citocinas en células epiteliales intestinales.....	195
8.2. El DLL4 no afecta a la actividad fibrogénica de los fibroblastos intestinales	197
9. Estudio de secuenciación de miARN en muestras de pacientes con EC.....	198
9.1. El TGF- $\beta 2$ disminuye la expresión del miR-378a-3p en HUVEC.....	201
9.2. El miR-378a-3p disminuye la expresión de Notch1 en HUVEC tratadas con TGF- $\beta 2$	202
10. Papel del receptor SUCNR1 en la inflamación	204
10.1. SUCNR1 se expresa en las células endoteliales del tejido ileal de pacientes con EC.....	204
10.2. El receptor SUCNR1 media las interacciones leucocito-endotelio inducidas por TNF α <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	205
10.3. La ausencia de SUCNR1 reduce la activación de la vía de señalización NF- κ B inducida por TNF α	209
10.4. El succinato exógeno modifica la expresión de E-selectina en HUVEC.	214

DISCUSIÓN	219
1. Notch - integrinas	222
2. miARN	225
3. SUCNR1	226
CONCLUSIONES	231
BIBLIOGRAFÍA	235
PRODUCCIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	267



Listado de figuras

- Figura 1. Medición de la progresión de la enfermedad (inflamación y daño) en un paciente con EC mediante el índice de Lémann.
- Figura 2. Prevalencia mundial de la EII.
- Figura 3. Resumen de los microARN (miARN) desregulados en la enfermedad de Crohn (EC).
- Figura 4. Principales componentes que constituyen la barrera epitelial intestinal.
- Figura 5. Evolución de la respuesta inflamatoria / inmunitaria durante la progresión de la EII.
- Figura 6. Origen y mecanismos que conducen a la formación de miofibroblastos.
- Figura 7. Efectos de múltiples factores de crecimiento y citocinas sobre los miofibroblastos de carácter pro o antifibrogénico.
- Figura 8. Descripción general de la vía de señalización canónica de TGF- β /Smad.
- Figura 9. Señalización del complejo I del TNFR.
- Figura 10. Etapas de la cascada de adhesión leucocitaria en el endotelio vascular.
- Figura 11. Características celulares y estados intermedios en la transición epitelial-mesenquimal (EMT).
- Figura 12. Proceso de transición endotelial-mesenquimal (EndoMT).
- Figura 13. La vía de señalización de Notch.
- Figura 14. Mecanotransducción celular en respuesta a la rigidez de la MEC.
- Figura 15. Clasificación, distribución y ligandos de las integrinas.
- Figura 16. Representación esquemática simplificada de la señalización bidireccional mediada por integrinas.

- Figura 17. Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y la cadena de transporte de electrones mitocondrial.
- Figura 18. Vías de señalización activadas tras la unión del succinato a GPR91.
- Figura 19. Representación de los tipos de metabolismo en macrófagos M1 (fenotipo proinflamatorio) y en macrófagos M2 (fenotipo antiinflamatorio).
- Figura 20. Aislamiento de PBMCs después de la centrifugación con Ficoll-Paque™ Plus.
- Figura 21. Cordón umbilical humano lleno de collagenasa para la posterior extracción de células endoteliales (HUVEC).
- Figura 22. Protocolo para la generación del modelo *in vivo* de trasplante heterotópico (inducción de fibrosis intestinal murina).
- Figura 23. Músculo cremastérico de ratón extendido y expuesto sobre pedestal transparente para el estudio de la interacción leucocito-endotelio.
- Figura 24. Sistema de montaje para la técnica de microscopía intravital.
- Figura 25. Esquema de la dinámica de trabajo para la evaluación de las interacciones leucocito - endotelio en los ratones del modelo de inflamación aguda.
- Figura 26. Partes de la cámara de flujo paralelo.
- Figura 27. Sistema de montaje de la cámara de flujo paralelo.
- Figura 28. Sistema de montaje de la cámara de flujo paralelo sobre microscopio invertido.
- Figura 29. Imágenes representativas de la interacción leucocito-endotelio.
- Figura 30. Proceso de cuantificación de la formación de capilares en HUVEC mediante el macro *Angiogenesis Analyzer* (Image J).

- Figura 31. Existe una expresión diferencial en las muestras ileales de la parte afecta y la parte no afecta de pacientes con EC.
- Figura 32. Diagrama de puntos que muestra los resultados más significativos del análisis de enriquecimiento.
- Figura 33. 72 de los primeros 200 términos GO sobrerrepresentados en muestras ileales afectas de pacientes con EC (ordenados según la significatividad estadística), están relacionados con la vía de señalización Notch.
- Figura 34. Las muestras ileales afectas de pacientes con EC muestran mayor expresión génica de los receptores NOTCH3 y NOTCH4.
- Figura 35. Las muestras ileales afectas de pacientes con EC muestran mayor expresión proteica del receptor Notch 3.
- Figura 36. Inmunotinción de los receptores Notch 3 y Notch 4 en el tejido ileal de pacientes control y tejido ileal afecto y no afecto de pacientes con EC.
- Figura 37. El tejido ileal afecto de pacientes con EC muestra un aumento en la expresión de componentes y moduladores de la matriz extracelular.
- Figura 38. Las muestras ileales afectas de pacientes con EC muestran un incremento en la expresión génica de componentes y enzimas reguladoras de la MEC.
- Figura 39. El tejido ileal afecto de pacientes con EC muestra un aumento en la expresión de genes relacionados con el compartimento vascular/endotelial.
- Figura 40. Las muestras ileales afectas de pacientes con EC muestran un incremento en la expresión génica de marcadores endoteliales y de mediadores de la función endotelial y la angiogénesis.
- Figura 41. Las muestras ileales afectas de pacientes con EC muestran una reducción en la expresión génica del marcador epitelial CDH1.

- Figura 42. Las muestras ileales afectas de pacientes con EC muestran un incremento en la expresión génica del receptor de colágeno ITGA11.
- Figura 43. Las muestras ileales afectas de pacientes con EC muestran mayor expresión proteica de la integrina $\alpha 11$.
- Figura 44. Inmunotinción de la integrina $\alpha 11$ en el tejido ileal de pacientes control y tejido ileal afecto y no afecto de pacientes con EC.
- Figura 45. La expresión génica de la integrina $\alpha 11$ muestra una correlación positiva y significativa con la vía de señalización Notch, con los marcadores endoteliales/vasculares y con componentes de la matriz extracelular, y negativa con el marcador epitelial.
- Figura 46. Las muestras ileales afectas de pacientes con EC muestran un incremento en la expresión génica de marcadores endoteliales y mediadores de la función endotelial y la angiogénesis.
- Figura 47. La expresión génica de la integrina $\alpha 11$ muestra una correlación positiva y significativa con la expresión de marcadores endoteliales en las muestras ileales de la segunda cohorte de pacientes con EC.
- Figura 48. Las muestras ileales afectas de pacientes con EC muestran un incremento en la expresión proteica de la integrina $\alpha 11$ y una reducción en la del receptor con dominio discoidina 1.
- Figura 49. El tejido colónico fibrótico de ratón (modelo de trasplante heterotópico) muestra un incremento en la expresión génica de integrina $\alpha 11$, de marcadores endoteliales y de marcadores mesenquimales.
- Figura 50. La expresión génica de la integrina $\alpha 11$ muestra una correlación significativa y positiva, con la expresión de marcadores endoteliales y mesenquimales, en muestras intestinales provenientes del modelo murino de fibrosis por trasplante heterotópico.

- Figura 51. La expresión génica de *Itga11* y de *Cdh5* muestran una correlación positiva y significativa en el modelo murino de colitis crónica inducida por DSS.
- Figura 52. El TGF- β 2 provoca una activación de la vía de señalización Notch asociada a un aumento en la expresión de ITGA11 y de marcadores mesenquimales (CDH2 y FN1) en HUVEC.
- Figura 53. El TGF- β 2 aumenta la expresión proteica de Notch 3 y de la integrina α 11 en HUVEC.
- Figura 54. El DLL4 aumenta la expresión proteica de la integrina α 11 en HUVEC.
- Figura 55. A nivel de expresión génica, el ligando DLL4 no induce EndoMT en HUVEC.
- Figura 56. Fotografías del ensayo de migración en HUVEC.
- Figura 57. El DLL4 aumenta la migración celular sin modificar la distribución de la integrina en HUVEC.
- Figura 58. El DLL4 provoca un aumento en la formación de estructuras tubulares en HUVEC.
- Figura 59. El silenciamiento de ITGA11 se acompaña de una disminución en la expresión del ligando DLL4 y del receptor NOTCH3 en HUVEC.
- Figura 60. El silenciamiento de ITGA11 se acompaña de una disminución en la expresión del receptor NOTCH3 en HUVEC tratadas con DLL4.
- Figura 61. El ligando DLL4 aumenta la migración celular a través de la integrina α 11.
- Figura 62. El DLL4 no modifica la expresión de receptores de colágeno o de citocinas en células epiteliales HCoEpiC.
- Figura 63. El DLL4 no modifica la expresión de receptores de colágeno o de citocinas en células epiteliales HT29.

- Figura 64. El DLL4 no afecta la expresión de marcadores relacionados con la fibrosis en fibroblastos intestinales.
- Figura 65. Existe una expresión diferencial de miARN en las muestras ileales de la parte afecta de pacientes con EC respecto a las muestras ileales de la parte no afecta emparejada del mismo paciente.
- Figura 66. miARN cuya expresión en el tejido afecto se reduce de forma más significativa.
- Figura 67. Los miARN miR-378a-3p, miR-7-5p y miR-3529-3p mostraron una correlación negativa y significativa con muchos de los genes incluidos en los términos GO relacionados con la regulación vascular/endotelial.
- Figura 68. El miR-378a-3p se encuentra reducido en muestras ileales de la parte afecta de pacientes con EC.
- Figura 69. El TGF- β 2 reduce la expresión del miR-378a-3p en HUVEC.
- Figura 70. El miR-378a-3p reduce la expresión de NOTCH1 y NOTCH4 en HUVEC tratadas con TGF- β 2.
- Figura 71. SUCNR1 se encuentra sobreexpresado en muestras afectas de pacientes con EC respecto los ileon control.
- Figura 72. Inmunotinción de SUCNR1 en el tejido ileal afecto de pacientes con EC.
- Figura 73. SUCNR1 media las interacciones leucocito-endotelio inducidas por TNF α *in vivo*.
- Figura 74. La ausencia de SUNCN1 limita el aumento de expresión de citocinas proinflamatorias inducido por TNF α en el tejido cremastérico de ratón.
- Figura 75. El bloqueo de SUCNR1 inhibe las interacciones leucocito-endotelio inducidas por TNF α *in vitro*.
- Figura 76. El succinato exógeno provoca un aumento del rodamiento en HUVEC y PBMCs de donantes sanos.

- Figura 77. La ausencia de SUCNR1 reduce la activación de la vía de señalización NF- κ B inducida por TNF α en muestras de cremáster de ratón.
- Figura 78. La ausencia de SUCNR1 provoca una atenuación de otras vías de señalización mediadas por el TNF α en el tejido cremastérico de ratón.
- Figura 79. El bloqueo del receptor SUCNR1 reduce la expresión proteica de NF- κ B inducida por TNF α en HUVEC.
- Figura 80. Efectos del tratamiento con TNF α , succinato o la combinación de ambos sobre la vía NF- κ B en HUVEC.
- Figura 81. El succinato modifica la expresión de E-selectina en HUVEC.
- Figura 82. El succinato no modifica la expresión de las moléculas de adhesión en leucocitos de donantes sanos.
- Figura 83. La combinación de succinato y TNF α no modifica la expresión de las moléculas de adhesión en leucocitos de donantes sanos.



Listado de tablas

Tabla 1.	Clasificación de Montreal para la CU.
Tabla 2.	Clasificación de Montreal para la EC.
Tabla 3.	Principales moléculas de adhesión implicadas en la interacción leucocito-endotelio.
Tabla 4.	Principales características de las integrinas receptoras de colágeno.
Tabla 5.	Características de los pacientes.
Tabla 6.	Suplementos añadidos al medio EBM-2 para el cultivo de HUVEC.
Tabla 7.	Tratamientos <i>in vitro</i> utilizados.
Tabla 8.	Moléculas transfectadas en HUVEC.
Tabla 9.	Secuencias de los cebadores humanos empleados.
Tabla 10.	Secuencias de los cebadores murinos empleados.
Tabla 11.	Cebadores utilizados para la RT-qPCR Taqman en HUVEC.
Tabla 12.	Anticuerpos empleados para WB.
Tabla 13.	Combinación de anticuerpos empleados para IHQ.
Tabla 14.	Anticuerpos empleados para la ICQ.
Tabla 15.	Anticuerpos frente a humano utilizados en la citometría de flujo.
Tabla 16.	Reactivos empleados.
Tabla 17.	Términos GO relacionados con la modulación y organización del compartimento mesenquimal que se encuentran sobrerrepresentados en las lesiones EC.
Tabla 18.	Términos GO relacionados con la modulación del compartimento endotelial que se encuentran sobrerrepresentados en las lesiones EC.



Resumen

INTRODUCCIÓN

1. ENFERMEDAD DE CROHN

La enfermedad de Crohn (EC) es un trastorno crónico que provoca una inflamación segmentaria y transmural en cualquier área del tracto gastrointestinal, aunque el íleon es su localización más común. Los pacientes experimentan brotes de actividad alternados con periodos de remisión y, con el tiempo, suelen acumular cambios estructurales de la pared intestinal que derivan en la formación de estenosis (engrosamiento de la pared intestinal que constriñe la luz) y/o fístulas (conexiones anormales entre el intestino y otras estructuras epitelializadas). La terapia actual utiliza fármacos antiinflamatorios e inmunomoduladores que, si bien suelen reducir la actividad inflamatoria, se muestran ineficaces en la prevención de complicaciones, por lo que una proporción significativa de pacientes requiere una o varias intervenciones quirúrgicas que no son curativas.

La etiología de la EI no está bien definida y, en el presente, se interpreta como el resultado de la interacción de varios elementos. Se entiende que la enfermedad resulta de la exposición a la microbiota intestinal a través de una barrera epitelial comprometida y de la consecuente respuesta inmunitaria anormal en pacientes especialmente sensibles por su dotación genética y por modificaciones epigenéticas asociadas al exposoma. Son también desconocidos los factores que determinan la aparición de complicaciones estenóticas y/o fistulizantes en una proporción de pacientes mientras otros mantienen un fenotipo meramente inflamatorio durante toda su vida.

2. CAMBIOS ESTRUCTURALES DE LA PARED INTESTINAL EN LA ENFERMEDAD DE CROHN

El análisis tisular de los tejidos estenóticos o fistulizados muestra un aumento en el número de vasos y una significativa acumulación de matriz extracelular, lo que indicaría que las complicaciones de la EC se asocian a una

desregulación de la angiogénesis y a la activación de procesos fibrogénicos. Junto a ello, se observa pérdida de la capa epitelial.

Estas alteraciones son consecuencia del daño tisular repetido y la desregulación del proceso de curación de la herida. La acumulación leucocitaria libera múltiples citocinas y factores de crecimiento que modifican la función de las células locales. Numerosos tipos celulares (fibroblastos, células epiteliales o endoteliales, pericitos, células del musculo liso,...) pueden devenir miofibroblastos activos y ser así responsables de la excesiva deposición de matriz extracelular. Por otro lado, las células endoteliales pueden responder a este ambiente activando mecanismos angiogénicos, si bien los vasos resultantes están hipoperfundidos, son inmaduros y más propensos a interactuar con plaquetas y leucocitos. Todo ello favorece la progresión de la enfermedad.

3. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN CON POTENCIAL PATOGENICO EN LA EC

- Ruta Notch

La vía de señalización Notch regula las interacciones entre células físicamente adyacentes. Existen cinco ligandos (DLL1, DLL3, DLL4, JAG1 y JAG2) para los cuatro receptores Notch (Notch-1, Notch-2, Notch-3 y Notch-4) que, una vez activados, liberan el dominio intracelular (NICD) regulador de la transcripción génica.

La señalización de Notch es esencial para la diferenciación, desarrollo y homeostasis del epitelio intestinal e interviene en la génesis y remodelación de los vasos sanguíneos (vasculogénesis y angiogénesis). Existen antecedentes sobre la intervención de la ruta Notch en alteraciones de la barrera intestinal y la reacción inflamatoria / inmunitaria asociadas a la enfermedad inflamatoria intestinal. Por otro lado, esta vía señalizadora se ha implicado en la fibrosis y alteraciones vasculares de otros órganos. Sin embargo, no existen estudios que analicen el papel de la vía Notch en las alteraciones vasculares y fibróticas asociadas a la EC.

- Matriz extracelular - integrinas

La matriz extracelular (MEC) proporciona un soporte mecánico y regula la función de las células que envuelve a través del proceso de mecanotransducción, que se define como el proceso por el cual las células detectan estímulos mecánicos y los traducen en señales bioquímicas. La MEC del tejido fibrótico presenta mayor rigidez, y los mecanosensores de las células locales responden a esta fuerza activando mecanismos fibrogénicos. De esta forma, las características mecánicas de los microambientes fibróticos son a la vez resultado y causa de la progresión de la fibrosis. Ello puede afectar a todas las células del entorno y, en el caso concreto de las endoteliales, puede alterar la función de barrera, generar estrés hemodinámico y favorecer la inflamación y la angiogénesis.

Un grupo importante de mecanosensores lo constituyen las integrinas, proteínas transmembrana que transmiten señales entre la MEC y las células o entre células adyacentes. En el ambiente fibrótico parecen especialmente relevantes las integrinas que actúan como receptores del colágeno, principal componente de la MEC. Se reconocen como tales las integrinas $\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha10\beta1$ y $\alpha11\beta1$. Las dos primeras se involucran en múltiples funciones en tipos celulares diversos y la tercera parece relevante en el tejido esquelético. La integrina $\alpha11\beta1$ es la última incorporación a esta familia y se ha involucrado en la migración celular, la proliferación celular y la reorganización del colágeno. En condiciones fisiológicas, su expresión se restringe a las células madre mesenquimales y a subconjuntos particulares de fibroblastos. En el contexto patológico, evidencias recientes sugieren su implicación en la fibrosis de algunos tejidos y tumores. Sin embargo, no existen antecedentes relativos a las manifestaciones patológicas de la enfermedad inflamatoria intestinal.

- Vía succinato - SUCNR1

El succinato es un ácido dicarboxílico que interviene en el ciclo de Krebs y en la cadena de transporte de electrones. Este metabolito se acumula en situaciones de hipoxia e inflamación diversas, incluyendo la enfermedad inflamatoria intestinal, en las que puede ejercer efectos proinflamatorios por tres mecanismos distintos: a) la inhibición de la prolinhidroxilasa, que estabiliza HIF-1 α e induce la expresión de IL-1 β ; b) la inducción de ROS mitocondrial por acción de la succinato deshidrogenasa; c) la activación del que se ha descrito como su receptor (GPR91 o SUCNR1).

SUCNR1 es un receptor acoplado a proteína G que puede activar varias rutas de señalización con marcado carácter inflamatorio (MAPK, PI3K, PLC) si bien, en contextos concretos, la vía succinato-SUCNR1 se ha asociado a efectos antiinflamatorios. Esta dualidad parece asociarse al tipo de proteína G que se active en cada caso.

OBJETIVOS

El **objetivo general** de esta Tesis Doctoral es identificar mecanismos etiopatogénicos contribuyentes a las alteraciones estructurales asociadas a las complicaciones intestinales de la enfermedad de Crohn.

Los **objetivos específicos** son:

1. Detectar elementos moleculares que puedan estar implicados en el desarrollo de alteraciones vasculares y fibróticas en el intestino de pacientes con EC complicada partiendo del perfil transcriptómico del tejido lesionado.
2. Analizar la relación entre la vía de señalización Notch, los receptores de colágeno y los cambios en los compartimentos mesenquimal, endotelial y epitelial en muestras de resección intestinal de pacientes con EC complicada y en modelos murinos de fibrosis intestinal.

3. Estudiar el papel de la ruta Notch y de la integrina $\alpha 11$ sobre funciones de la célula endotelial que pueden contribuir a la fibrogénesis y la expansión vascular en las lesiones intestinales asociadas a la enfermedad de Crohn.
4. Analizar el patrón de expresión de miARN en muestras de resección intestinal de pacientes con EC complicada y evaluar su asociación con las alteraciones del compartimento vascular.
5. Estudiar la posible interacción entre el miARN miR-378a-3p, la ruta Notch y los receptores de colágeno en células endoteliales humanas.
6. Analizar la expresión de GPR91 en el compartimento vascular del tejido ileal de pacientes con EC complicada y determinar su papel en el proceso inflamatorio inducido por $\text{TNF}\alpha$.

RESULTADOS

1. ESTUDIO DE MUESTRAS DE PACIENTES CON EC

Analizamos inicialmente el patrón de expresión génica de las muestras de tejido ileal afecto y no afecto de pacientes con EC mediante secuenciación de ARNm (RNA-seq). Detectamos 4932 genes diferencialmente expresados en ambos tipos de muestra (2283 incrementados, 2649 reducidos) que, según el análisis de sobrerrepresentación (ORA), se asociaban a 998 términos de ontología genética (GO) regulados al alza y 513 términos GO inhibidos. Examinamos los 200 términos más significativamente sobrerrepresentados y detectamos que el 36% de los mismos incluían elementos pertenecientes a la ruta de señalización Notch. La mayoría se incluía en alguna de las siguientes categorías: (i) modulación de la MEC, (ii) modulación de la respuesta inmunitaria, (iii) modulación del compartimento vascular / endotelial, (iv) regulación del compartimento epitelial, y (v) procesos asociados a la interacción física de las células con su entorno y el movimiento celular. Este análisis sugería que la ruta

Notch podría estar influyendo en las alteraciones estructurales que se observan en las complicaciones de la EC y procedimos por tanto a testar esta hipótesis.

Analizamos la expresión de los receptores y ligandos Notch y observamos que la parte afecta sobreexpresa el receptor Notch3, y los estudios inmunohistoquímicos lo ubicaron en el tejido muscular liso, células de la lámina propia y, de forma muy intensa, en el endotelio vascular.

Por otro lado, y dada la relevancia que parecían tener las interacciones celulares con la MEC, analizamos en nuestras muestras la expresión de todos los receptores conocidos del colágeno como proteína más abundante en este medio. Los resultados nos mostraron un aumento en la expresión de la integrina $\alpha 11$ (ITGA11) en las muestras afectas y los estudios de IHQ la detectaron especialmente en el endotelio vascular.

Con la finalidad de estudiar si existía una asociación entre los cambios observados en la expresión de las moléculas señalizadoras, ruta Notch e ITGA11, y las modificaciones estructurales propias de la EC complicada, realizamos un análisis de correlación con los genes representativos de cada compartimento y que indicaban aumento de MEC y vasculatura y reducción del epitelio. Observamos que la expresión de ITGA11 mostraba una correlación significativa con la del receptor NOTCH3 y del ligando DLL4, y estos tres genes correlacionaron positivamente con la de marcadores del compartimento endotelial y de componentes de la matriz extracelular, y negativamente con el nivel del marcador epitelial CDH1. Todos estos resultados, y datos análogos obtenidos en los modelos murinos, apuntaban a que Notch3 e integrina $\alpha 11$ podían participar en la progresivo deterioro de la arquitectura tisular, especialmente en las alteraciones vasculares.

2. INFLUENCIA DE LA RUTA NOTCH Y DE LA INTEGRINA $\alpha 11$ EN LA FUNCIÓN ENDOTELIAL

Nuestros primeros resultados de este apartado nos indicaron que la expresión de Notch3 y de integrina $\alpha 11$ en células endoteliales (HUVEC) es sensible a la principal citocina fibrogénica, el TGF β , que las incrementa al tiempo que induce transición endotelio-mesenquimal.

Para estudiar la relación entre ambas vías de señalización tratamos las células endoteliales con DLL4, y observamos también un aumento en la expresión de integrina $\alpha 11$ que se acompañó de mayor migración celular (cierre de herida en monocapa celular) y de formación de tubos endoteliales en una matriz tridimensional (índice de capacidad angiogénica).

Por último, el silenciamiento del gen ITGA11 nos permitió deducir que la integrina $\alpha 11$ media la migración endotelial inducida por este ligando Notch.

3. ESTUDIO DE SECUENCIACIÓN DE miARN EN MUESTRAS DE PACIENTES CON EC

Paralelamente al análisis de ARNm, realizamos un estudio de secuenciación de miARN en el que encontramos 929 miARN diferencialmente expresados en muestras afectas de pacientes con EC en comparación con las muestras no afectas (862 inhibidos, 67 incrementados). Seleccionamos los 60 miARN que mostraban una inhibición más significativa y vimos que muchos de ellos se correlacionaban negativamente con un número variable de genes asociados al compartimento vascular / endotelial. Centramos nuestra atención en el que parecía tener el perfil más interesante (miR-378a-3p) y vimos que su expresión en HUVEC se reducía en respuesta al TGF- β y que, en estas condiciones, la adición de miR-378a-3p exógeno disminuía la expresión de NOTCH1 y NOTCH4, sugiriendo así que ambos genes podrían ser dianas del mismo.

4. PAPEL DEL RECEPTOR SUCNR1 EN LA INFLAMACIÓN

Estudios previos evidenciaron concentraciones elevadas de succinato y una mayor expresión de su receptor (SUCNR1) en el tejido intestinal de pacientes con EC. Analizamos el patrón de expresión de SUCNR1 por inmunohistoquímica y observamos su presencia en las células endoteliales de los vasos intestinales, lo que sugería que los efectos proinflamatorios observados anteriormente podían deberse a la regulación de la función endotelial. Realizamos experimentos de microscopía intravital en cremaster de ratón y observamos que la carencia de *Sucnr1* (ratones *Sucnr1*^{-/-}) reducía significativamente el rodamiento y la adhesión leucocitarias, así como la expresión de citocinas proinflamatorias, en respuesta al tratamiento con TNF α . De forma análoga, el tratamiento con un antagonista del receptor SUCNR1 (NF-56-EJ40) inhibió las interacciones entre células leucocitarias y endoteliales humanas en condiciones que simulan *in vitro* el flujo sanguíneo venular.

Dado que la acción proinflamatoria del TNF α depende en parte de la activación de la ruta del NF- κ B, analizamos la expresión de los componentes de esta vía en nuestros modelos de inflamación viendo en ambos casos resultados indicativos de una menor actividad de esta ruta cuando se inhibía la señalización a través de SUCNR1.

Por último, analizamos por citometría de flujo la expresión de las principales moléculas de adhesión endoteliales y leucocitarias y vimos que el succinato exógeno muestra efectos complejos sobre la expresión de E-selectina en HUVEC, aumentándola en condiciones control y reduciéndola en células tratadas con TNF α .

CONCLUSIONES

1. El tejido ileal afecto por la enfermedad de Crohn muestra un transcriptoma diferencial indicativo de acumulación de matriz extracelular e incremento

del compartimento vascular, de reducción epitelial, de acumulación de células inflamatorias, y de alteraciones en las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular.

2. El tejido ileal de los pacientes de Crohn presenta un aumento en la expresión de Notch3 y de integrina $\alpha 11$ que se correlaciona con indicadores de expansión endotelial, de fibrosis y de pérdida epitelial.
3. Las proteínas Notch3 e integrina $\alpha 11$ se detectan en el endotelio de los vasos del tejido ileal de pacientes de Crohn y su expresión en células endoteliales aumenta en respuesta al TGF- β .
4. La integrina $\alpha 11$ media la migración de las células endoteliales inducida por DLL4.
5. El tejido ileal afecto por la enfermedad de Crohn presenta un patrón de expresión diferencial de micro-ARN en el que destaca miR-378a-3p por mostrar una reducción muy significativa y un elevado grado de correlación negativa con indicadores de expansión endotelial.
6. La expresión de miR-378a-3p en células endoteliales se reduce en respuesta al TGF- β y su restitución reduce la expresión de NOTCH1 y NOTCH4.
7. El tejido ileal afecto por la enfermedad de Crohn expresa SUCNR1 en el endotelio vascular.
8. La ausencia o bloqueo de SUCNR1 reduce significativamente las interacciones leucocito-endotelio y la activación de la vía NF- κ B inducidas por TNF α , si bien la exposición de las células endoteliales a concentraciones elevadas de succinato exógeno muestra un patrón complejo de efectos que incluye acciones de carácter antiinflamatorio.
9. La sobreexpresión de Notch3, integrina $\alpha 11$ y SUCNR1 y la reducción de miR-378a-3p detectadas en las lesiones intestinales de los enfermos de Crohn,

junto con la influencia que estas moléculas parecen tener sobre la función endotelial, sugieren su contribución a las alteraciones estructurales del tejido intestinal que ocurren con la progresión de la enfermedad y las postulan como nuevas dianas terapéuticas.



Resum

INTRODUCCIÓ

1. MALALTIA DE CROHN

La malaltia de Crohn (MC) és un trastorn crònic que provoca una inflamació segmentària i transmural en qualsevol àrea del tracte gastrointestinal, encara que l'ili és la localització més comuna. Els pacients experimenten brots d'activitat alternats amb períodes de remissió i, amb el pas del temps, es solen acumular canvis estructurals de la paret intestinal que deriven en la formació d'estenosi (engrossiment de la paret intestinal que constreny la llum) i/o fistules (connexions anormals entre l'intestí i altres estructures epiteliitzades). La teràpia actual utilitza fàrmacs antiinflamatoris i immunomoduladors que, solen reduir l'activitat inflamatòria, però es mostren ineficaços davant la prevenció de complicacions, per la qual cosa una proporció significativa de pacient requereix una o diverses intervencions quirúrgiques que no són curatives.

L'etiologia de la malaltia inflamatòria intestinal (MII) no està ben definida i, actualment, s'interpreta com el resultat de la interacció de diversos elements. S'entén que la malaltia resulta de l'exposició a la microbiota intestinal mitjançant una barrera epitelial compromesa i de la conseqüent resposta immunitària anormal en pacients especialment sensibles per la seua dotació genètica i per modificacions epigenètiques associades al exposoma. Són també desconeguts els factors que determinen l'aparició de complicacions estenòtiques i/o fistulitzants en una proporció de pacients mentre altres mantenen un fenotip merament inflamatori durant tota la seua vida.

2. CANVIS ESTRUCTURALS DE LA PARET INTESTINAL A LA MALALTIA DE CROHN

L'anàlisi tissular dels teixits estenòtics o amb fistules mostra un augment en el nombre de vasos i una significativa acumulació de matriu extracel·lular, el que indicaria que les complicacions de la MC s'associen a una desregulació de

l'angiogènesi i a l'activació de processos fibrogènics. Juntament amb això, s'observava una pèrdua de la capa epitelial.

Aquestes alteracions són conseqüència del dany tissular repetit i la disregulació del procés de curació de la ferida. L'acumulació leucocitària allibera múltiples citocines i factors de creixement que modifiquen la funció de les cèl·lules locals. Nombrosos tipus cel·lulars (fibroblasts, cèl·lules epitelials o endotelials, pericits, cèl·lules del múscul llis, entre altres) poden esdevenir miofibroblasts actius i ser d'aquesta forma responsables de l'excessiva deposició de matriu extracel·lular. D'altra banda, les cèl·lules endotelials poden respondre a aquest ambient activant mecanismes angiogènics, si bé els vasos resultants estan hipoperfosos, són immadurs i més propensos a interaccionar amb plaquetes i leucòcits. Tot això afavoreix la progressió de la malaltia.

3. VIES DE SENYALITZACIÓ AMB POTENCIAL PATOGENIC EN LA MC

- Ruta Notch

La via de senyalització Notch regula les interaccions entre cèl·lules físicament adjacents. Existeixen cinc lligands (DLL1, DLL3, DLL4, JAG1 i JAG2) per als quatre receptors Notch (Notch-1, Notch-2, Notch-3 i Notch-4) que, una vegada activats, alliberen el domini intracel·lular (NICD) regulador de la transcripció gènica.

La senyalització de Notch és essencial per a la diferenciació, desenvolupament i homeòstasi de l'epiteli intestinal i intervé en la gènesi i remodelació dels vasos sanguinis (vasculogènesi i angiogènesi). Existeixen antecedents sobre la intervenció de la ruta Notch en alteracions de la barrera intestinal i la reacció inflamatòria / immunitària associades a la MII. D'altra banda, aquesta via de senyalització s'ha implicat en la fibrosi i alteracions vasculars d'altres òrgans. No obstant això, no existeixen estudis que analitzen el paper de la via Notch en les alteracions vasculars i fibròtiques associades a la MC.

- Matriu extracel·lular - integrines

La matriu extracel·lular (MEC) proporciona un suport mecànic i regula la funció de les cèl·lules que envolta a través del procés de mecanotransducció, que es defineix com el procés pel qual les cèl·lules detecten estímuls mecànics i els tradueixen en senyals bioquímics. La MEC del teixit fibròtic presenta una major rigidesa, i els mecanosensors de les cèl·lules locals responen a aquesta força activant mecanismes fibrogènics. D'aquesta forma, les característiques mecàniques dels microambients fibròtics són alhora resultat i causa de la progressió de la fibrosi. Això pot afectar a totes les cèl·lules de l'entorn i, en el cas concret de les endotelials, pot alterar la funció de barrera, generar estrès hemodinàmic i afavorir la inflamació i l'angiogènesi.

Un grup important de mecanosensors el componen les integrines, proteïnes transmembrana que transmeten senyals entre la MEC i les cèl·lules o entre cèl·lules adjacents. En l'ambient fibròtic pareixen especialment rellevants les integrines que actuen com a receptors de col·lagen, principal component de la MEC. Es reconeixen com a tal les integrines $\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha10\beta1$ i $\alpha11\beta1$. Les dues primeres estan involucrades en múltiples funcions en diversos tipus cel·lulars i la tercera pareix rellevant en el teixit esquelètic. La integrina $\alpha11\beta1$ és l'última incorporació a aquesta família i s'ha involucrat en la migració cel·lular, la proliferació cel·lular i la reorganització del col·lagen. En condicions fisiològiques, la seua expressió es restringeix a les cèl·lules mare mesenquimals i a subconjunts particulars de fibroblasts. En el context patològic, evidències recents suggereixen la seua implicació en la fibrosi d'alguns teixits i tumors. Tanmateix, no existeixen antecedents relatius a les manifestacions patològiques de la malaltia inflamatòria intestinal.

- Via succinat - SUCNR1

El succinat és un àcid dicarboxílic que intervé al cicle de Krebs i en la cadena de transport d'electrons. Aquest metabòlit s'acumula en situacions

d'hipòxia i inflamació diverses, incloent-hi la malaltia inflamatòria intestinal, en la que pot exercir efectes proinflamatoris per tres mecanismes distints: a) la inhibició de la prolilhidroxilasa, que estabilitza HIF-1 α i indueix l'expressió d' IL-1 β ; b) la inducció de ROS mitocondrial per acció de la succinat deshidrogenasa; c) l'activació del que s'ha descrit com el seu receptor (GPR91 o SUCNR1).

SUCNR1 és un receptor acoblat a proteïna G que pot activar varies rutes de senyalització amb un marcat caràcter inflamatori (MAPK, PI3K, PLC) si bé, en contextos concrets la via succinat-SUCNR1 s'ha associat amb efectes antiinflamatoris. Aquesta dualitat pareix associar-se al tipus de proteïna G que s'active en cada cas.

OBJECTIUS

L'**objectiu general** d'aquesta Tesi Doctoral és identificar mecanismes etiopatogènics contribuents a les alteracions estructurals associades a les complicacions intestinals de la malaltia de Crohn.

Els **objectius específics** són:

1. Detectar elements moleculars que puguin estar implicats en el desenvolupament d'alteracions vasculars i fibròtiques en l'intestí de pacients amb MC complicada partint del perfil transcriptòmic del teixit lesionat.
2. Analitzar la relació entre la via de senyalització Notch, els receptors de col·lagen i els canvis en els compartiments mesenquimal, endotelial i epitelial en mostres de resecció intestinal de pacients amb MC complicada i en models murins de fibrosi intestinal.

3. Estudiar el paper de la ruta Notch i de la integrina $\alpha 11$ sobre funcions de la cèl·lula endotelial que poden contribuir a la fibrogènesi i l'expansió vascular en les lesions intestinals associades a la malaltia de Crohn.
4. Analitzar el patró d'expressió de miARN en mostres de resecció intestinal de pacients amb MC complicada i avaluar la seva associació amb les alteracions del compartiment vascular.
5. Estudiar la possible interacció entre el miARN miR-378a-3p, la ruta Notch i els receptors de col·lagen en cèl·lules endotelials humanes.
6. Analitzar l'expressió de GPR91 en el compartiment vascular del teixit ileal de pacients amb MC complicada i determinar el seu paper en el procés inflamatori induït per TNF α .

RESULTATS

1. ESTUDI DE MOSTRES DE PACIENTS AMB MC

Analitzarem inicialment el patró d'expressió gènica de les mostres de teixit ileal afecte i no afecte de pacients amb MC mitjançant seqüenciació d'ARNm (RNA-seq). Detectarem 4932 gens diferencialment expressats en ambdós tipus de mostra (2283 incrementats, 2649 reduïts) que, segons l'anàlisi de sobrerrepresentació (ORA), s'associen a 998 termes d'ontologia genètica (GO) regulats a l'alça i 513 termes GO inhibits. Examinarem els 200 termes més significativament sobrerrepresentats i detectarem que el 36% dels mateixos incloïen elements que pertanyien a la ruta de senyalització Notch. La major part s'incloïa en alguna de les següents categories: (i) modulació de la MEC, (ii) modulació de la resposta immunitària, (iii) modulació del compartiment vascular / endotelial, (iv) regulació del compartiment epitelial, i (v) processos associats a la interacció física de les cèl·lules amb el seu entorn i el moviment cel·lular. Aquesta anàlisi suggeria que la ruta Notch podria estar influïnt en les alteracions estructurals que s'observen en les complicacions de la MC i procedirem, per tant, a testar aquesta hipòtesi.

Analitzarem l'expressió dels receptors i lligands Notch i observarem que la part afecta sobreexpressa el receptor NOTCH3, i els estudis immunohistoquímics l'ubicaren al teixit muscular llis, les cèl·lules de la làmina pròpia i, de forma molt intensa, a l'endoteli vascular.

D'altra banda, i donada la rellevància que pareixien tindre les interaccions cel·lulars amb la MEC, analitzarem a les nostres mostres l'expressió de tots els receptors coneguts del col·lagen com a proteïna més abundant en aquest medi. Els resultats ens mostraren un augment en l'expressió de la integrina $\alpha 11$ (ITGA11) a les mostres afectes i els estudis d'IHQ la detectaren especialment a l'endoteli vascular.

Amb la finalitat d'estudiar si existia una associació entre els canvis observats en l'expressió de les molècules senyalitzadores, ruta Notch i ITGA11, i les modificacions estructurals pròpies de la MC complicada, durem a terme una anàlisi de correlació amb els gens representatius de cada compartiment i que indicaven un augment de MEC i vasculatura i una reducció de l'epiteli. Observarem que l'expressió d'ITGA11 mostrava una correlació significativa amb la del receptor NOTCH3 i del lligand DLL4, i aquests tres gens correlacionaren positivament amb la de marcadors del compartiment endotelial i de components de la MEC, i negativament amb el nivell del marcador epitelial CDH1. Tots aquests resultats, i les dades anàlogues obtingudes als models murins, apuntaven al fet que Notch3 i la integrina $\alpha 11$ podien participar en el progressiu deteriorament de l'arquitectura tissular, especialment en les alteracions vasculars.

2. INFLUÈNCIA DE LA RUTA NOTCH I DE LA INTEGRINA $\alpha 11$ EN LA FUNCIÓ ENDOTELIAL

Els nostres primers resultats d'aquest apartat ens indicaren que l'expressió de Notch3 i de la integrina $\alpha 11$ en cèl·lules endotelials (HUVEC) és sensible a la

principal citocina fibrogènica, el TGF- β , que les incrementa al mateix temps que indueix transició endotelial-mesenquimal.

Per tal d'estudiar la relació entre ambdues vies de senyalització tractarem les cèl·lules endotelials amb DLL4, i observarem també un augment en l'expressió de la integrina $\alpha 11$, el qual es va acompanyar d'una major migració cel·lular (tancament de la ferida en monocapa cel·lular) i de formació de tubs endotelials en una matriu tridimensional (índex de capacitat angiogènica).

Per acabar, el silenciament del gen ITGA11 ens va permetre deduir que la integrina $\alpha 11$ intervenia en la migració endotelial induïda per aquest lligand Notch.

3. ESTUDI DE SECUENCIACIÓ DE miARN EN MOSTRES DE PACIENTS AMB MC

Paral·lelament a l'anàlisi d'ARNm, realitzarem un estudi de seqüenciació de miARN en el qual trobarem 929 miARN diferencialment expressats en mostres afectes de pacients amb MC en comparació amb les mostres no afectes (862 inhibits, 67 incrementats). Seleccionarem els 60 miARN que mostraven una inhibició més significativa i vam veure que molts d'ells es correlacionaven negativament amb un nombre variable de gens associats al compartiment vascular / endotelial. Centrarem la nostra atenció en el qual semblava tindre el perfil més interessant (miR-378a-3p) i vam veure que la seua expressió en HUVEC es reduïa en resposta al TGF- β i que, en aquestes condicions, l'addició de miR-378a-3p exogen disminuïa l'expressió de NOTCH1 i NOTCH4, suggerint així que tots dos gens podrien ser dianes d'aquest.

4. PAPER DEL RECEPTOR SUCNR1 EN LA INFLAMACIÓ

Estudis previs evidenciaren concentracions elevades de succinat i d'una major expressió del seu receptor (SUCNR1) al teixit intestinal de pacients amb MC. Analitzarem el patró d'expressió de SUCNR1 per immunohistoquímica i

observarem la seua presència a les cèl·lules endotelials dels vasos intestinals, el que suggeria que els efectes proinflamatoris observats anteriorment podien deure's a la regulació de la funció endotelial. Durem a terme experiments de microscòpia intravital en cremàster de ratolí i observarem que la carència de *Sucnr1* (amb ratolins *Sucnr1*^{-/-}) reduïa significativament el rodament i l'adhesió leucocitàries, així com l'expressió de citocines proinflamatòries, en resposta al tractament amb TNF α . De forma anàloga, el tractament amb un antagonista del receptor SUCNR1 (NF-56-EJ40) va inhibir les interaccions entre cèl·lules leucocitàries i endotelials humanes en condicions que simulen *in vitro* el flux sanguini venular.

Atès que l'acció proinflamatòria del TNF α depèn en part de l'activació de la ruta NF- κ B, analitzarem l'expressió dels components d'aquesta via als nostres models d'inflamació, veient en els dos casos, que els resultats eren indicatius d'una menor activitat d'aquesta ruta quan s'inhibia la senyalització a través de SUCNR1.

Finalment, analitzarem mitjançant citometria de flux l'expressió de les principals molècules d'adhesió endotelials i leucocitàries i vam veure que el succinat exogen mostra efectes complexos sobre l'expressió d'E-selectina en HUVEC, augmentant-la en condicions control i reduint-la en cèl·lules tractades amb TNF α .

CONCLUSIONS

1. El teixit ileal afecte per la malaltia de Crohn mostra un transcriptoma diferencial indicatiu d'acumulació de matriu extracel·lular i increment del compartiment vascular, de reducció epitelial, d'acumulació de cèl·lules inflamatòries, i d'alteracions en les interaccions cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-matriu extracel·lular.

2. El teixit ileal dels pacients de Crohn presenta un augment en l'expressió de Notch3 i d'integrina $\alpha 11$ que es correlaciona amb indicadors d'expansió endotelial, de fibrosi i de pèrdua epitelial.
3. Les proteïnes Notch3 i integrina $\alpha 11$ es detecten en l'endoteli dels vasos del teixit ileal de pacients de Crohn i la seva expressió en cèl·lules endotelials augmenta en resposta al TGF- β .
4. La integrina $\alpha 11$ media la migració de les cèl·lules endotelials induïda per DLL4.
5. El teixit ileal afecte per la malaltia de Crohn presenta un patró d'expressió diferencial de micro-ARN on destaca miR-378a-3p per mostrar una reducció molt significativa i un elevat grau de correlació negativa amb indicadors d'expansió endotelial.
6. L'expressió de miR-378a-3p en cèl·lules endotelials es redueix en resposta al TGF- β i la seua restitució redueix l'expressió de NOTCH1 i NOTCH4.
7. El teixit ileal afecte per la malaltia de Crohn expressa SUCNR1 en l'endoteli vascular.
8. L'absència o bloqueig de SUCNR1 redueix significativament les interaccions leucòcit-endoteli i l'activació de la via NF- κ B induïdes per TNF α , si bé l'exposició de les cèl·lules endotelials a concentracions elevades de succinat exogen mostra un patró complex d'efectes que inclou accions de caràcter antiinflamatori.
9. La sobreexpressió de Notch3, integrina $\alpha 11$ i SUCNR1 i la reducció de miR-378a-3p detectades en les lesions intestinals dels malalts de Crohn, juntament amb la influència que aquestes molècules semblen tenir sobre la funció endotelial, suggereixen la seva contribució a les alteracions estructurals del teixit intestinal que ocorren amb la progressió de la malaltia i les postulen com a noves dianes terapèutiques.



Abstract

INTRODUCTION

1. CROHN'S DISEASE

Crohn's disease (CD) is a chronic disorder which causes a segmental and transmural inflammation in any part of the gastrointestinal tract, although the ileum is its most common location. Patients experience periods of activity alternating with periods of remission. Additionally, and over the time, they often develop structural changes in the intestinal wall that lead to the formation of strictures (thickening of the intestinal wall that constricts the lumen) and/or fistulas (abnormal connections between the intestine and other epithelialized structures). Current therapy uses anti-inflammatory and immunomodulatory drugs which are ineffective in preventing complications despite of its ability to reduce the inflammatory activity. As a result, a significant proportion of patients require one or more surgical interventions that are not curative.

The aetiology of the inflammatory bowel disease (IBD) is not well defined and is currently interpreted as the result of the interaction of multiple factors. This disease is thought to arise from exposure to the intestinal microbiota through a compromised epithelial barrier, which triggers an abnormal immune response in individuals who are particularly susceptible due to their genetic inheritance and epigenetic modifications associated with the exposome. The factors determining why some patients develop stricturing and/or fistulizing complications, while others maintain a purely inflammatory phenotype throughout their lives, still remain unknown.

2. CHANGES IN THE INTESTINAL WALL STRUCTURE IN CD

Tissue analysis of strictured or fistulized areas shows an increase in the number of blood vessels and a significant accumulation of extracellular matrix, suggesting that Crohn's disease complications are associated with a dysregulated angiogenesis and the activation of fibrogenic processes. Along with this, loss of the epithelial layer is observed.

These alterations result from repeated tissue damage and dysregulation of the wound healing process. The accumulation of leukocytes releases multiple cytokines and growth factors that alter the function of local cells. Various cell types (fibroblasts, epithelial or endothelial cells, pericytes, and smooth muscle cells among others), can differentiate into active myofibroblasts and contribute to excessive extracellular matrix deposition. Additionally, endothelial cells may respond to this environment by activating angiogenic mechanisms, although the resulting vessels are hypoperfused, immature, and more susceptible to interact with platelets and leukocytes. All these factors promote disease progression.

3. SIGNALLING PATHWAYS WITH PATHOGENIC POTENTIAL IN CD

- Notch signalling

The Notch signalling pathway regulates interactions between physically adjacent cells. There are five ligands (DLL1, DLL3, DLL4, JAG1, and JAG2) for the four Notch receptors (Notch-1, Notch-2, Notch-3, and Notch-4), which, once activated, release the intracellular domain (NICD) that regulates gene transcription.

This signalling pathway is essential for the differentiation, development, and homeostasis of the intestinal epithelium and plays a role in the formation and remodelling of blood vessels (vasculogenesis and angiogenesis). Previous studies have shown that the Notch pathway is involved in intestinal barrier dysfunction and the inflammatory/immune response associated with IBD. Additionally, this signalling pathway has been implicated in fibrosis and vascular alterations in other organs. However, and to date, no studies have specifically analysed the role of the Notch pathway in the vascular and fibrotic changes associated with CD.

- Extracellular matrix - integrins

The extracellular matrix (ECM) provides mechanical support and regulates the function of the surrounding cells through the process of

mechanotransduction. This mechanism allows the cells to detect mechanical stimuli and translates them into biochemical signals. In fibrotic tissue, the ECM becomes stiffer, prompting the mechanosensors in local cells to activate fibrogenic mechanisms in response to this increased rigidity. Therefore, the mechanical properties of fibrotic microenvironments are both a result and a cause of fibrosis progression. This can affect all surrounding cells and, specifically in the case of endothelial cells, can impair barrier function, induce hemodynamic stress, and promote inflammation and angiogenesis.

An important group of mechanosensors is formed by integrins, transmembrane proteins that transmit signals between ECM and cells, or between adjacent cells. In fibrotic environments, integrins that act as collagen receptors (the main component of the ECM), appear to be particularly relevant. These include integrins $\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha10\beta1$, and $\alpha11\beta1$. The first two are involved in multiple functions across various cell types, while the third seems to be relevant in skeletal tissue. Integrin $\alpha11\beta1$ is the most recently identified member of this family and has been implicated in cell migration, cell proliferation, and collagen reorganization. Under physiological conditions, its expression is restricted to mesenchymal stem cells and specific subsets of fibroblasts. In pathological contexts, recent evidence suggests its involvement in fibrosis of some tissues and tumors. However, there are no reports of its role in the pathological manifestations of IBD.

- [Succinate - SUCNR1 pathway](#)

Succinate is a dicarboxylic acid involved in the Krebs cycle and the electron transport chain. This metabolite accumulates under conditions of hypoxia and inflammation, including inflammatory bowel disease, where it can exert pro-inflammatory effects through three distinct mechanisms: a) inhibition of prolyl hydroxylase, leading to stabilization of HIF-1 α and induction of IL-1 β expression;

b) induction of mitochondrial ROS production by succinate dehydrogenase activity; c) activation of its described receptor, GPR91 (also known as SUCNR1).

SUCNR1 is a G protein-coupled receptor capable of activating several signalling pathways with strong inflammatory profiles (such as MAPK, PI3K, and PLC). However, in specific contexts, the succinate-SUCNR1 pathway has also been associated with anti-inflammatory effects. This duality appears to depend on the specific G protein activated in each case.

AIMS

The **overall aim** of this Doctoral Thesis is to identify aetiopathogenic mechanisms contributing to the structural alterations associated with intestinal complications in Crohn's disease.

The **specific objectives** are:

1. To identify molecular elements potentially involved in the development of vascular and fibrotic alterations in the intestine of patients with complicated CD, based on the transcriptomic profile of injured tissue.
2. To analyse the relationship between the Notch signalling pathway, the collagen receptors and the changes in the mesenchymal, endothelial, and epithelial compartments in intestinal resections from complicated CD patients and in murine models of intestinal fibrosis.
3. To study the role of the Notch pathway and of integrin $\alpha 11$ in endothelial cell functions that can contribute to fibrogenesis and vascular expansion in intestinal lesions associated with Crohn's disease.
4. To analyse the pattern of expression of microRNA in intestinal resections from complicated CD patients and to evaluate its association with alterations in the vascular compartment.

5. To investigate the potential interaction between miR-378a-3p, the Notch pathway, and collagen receptors in human endothelial cells.
6. To analyse the expression of GPR91 in the vascular compartment of ileal tissue from patients with complicated CD and to determine its role in the TNF α -induced inflammatory process.

RESULTS

1. STUDY OF SAMPLES FROM CD PATIENTS

We initially analysed the gene expression profile of affected and unaffected ileal tissue samples from CD patients by mRNA sequencing (RNA-seq). 4,932 differentially expressed genes were identified between the two types of tissue (2,283 upregulated and 2,649 downregulated). According to the overrepresentation analysis (ORA), these genes were associated with 998 upregulated and 513 downregulated Gene Ontology (GO) terms. We examined the 200 most significantly overrepresented terms and found that 36% of them included elements related to the Notch signalling pathway. Most of these terms fell into one of the following categories: (i) ECM modulation, (ii) modulation of the immune response, (iii) modulation of the vascular/endothelial compartment, (iv) regulation of the epithelial compartment, and (v) processes associated with the physical interactions of cells with their environment and cell motility. This analysis suggested that the Notch pathway may be involved in the structural alterations observed in CD complications, and we therefore proceeded to test this hypothesis.

The expression of Notch receptors and ligands was examined, and an overexpression of the Notch3 receptor was detected in the affected tissue. Immunohistochemical analyses localised Notch3 to smooth muscle tissue and lamina propria cells, with the strongest staining observed in the vascular endothelium.

On the other hand, given the apparent relevance of cell-ECM interactions, we analysed in our samples the expression of all known collagen receptors, since collagen is the most abundant ECM component. We found increased expression of integrin $\alpha 11$ (ITGA11) in affected samples, with immunohistochemistry revealing a particularly strong expression in the vascular endothelium.

To investigate whether there was an association between the changes detected in the expression of these signalling molecules, Notch pathway and ITGA11, and the structural alterations characteristic of complicated CD, we conducted a correlation analysis with the representative genes of each tissue compartment. These genes reflected increased ECM and vasculature and decreased epithelial layer. We found that ITGA11 expression significantly correlated with those of the receptor NOTCH3 and the ligand DLL4, and all three genes showed positive correlations with endothelial compartment markers and ECM components, and a negative correlation with the epithelial marker CDH1. These results suggested that Notch3 and integrin $\alpha 11$ may be contributing to the progressive disruption of tissue architecture, particularly to vascular alterations.

2. INFLUENCE OF THE NOTCH PATHWAY AND INTEGRIN $\alpha 11$ ON ENDOTHELIAL FUNCTION

Our initial results in this section indicated that the expression of Notch3 and integrin $\alpha 11$ in endothelial cells (HUVECs) respond to the main fibrogenic cytokine, TGF- β , which upregulated both receptors in parallel to the induction of endothelial-to-mesenchymal transition.

To explore the relationship between these two signalling pathways, endothelial cells were treated with DLL4. This was followed by an increase in integrin $\alpha 11$ expression, accompanied by enhanced cell migration (as measured by closure of a wound in a cellular monolayer) and endothelial tube formation in a three-dimensional matrix (as an indicator of angiogenic capacity).

Finally, ITGA11 gene silencing revealed that integrin $\alpha 11$ mediates the DLL4-induced endothelial cell migration.

3. miRNA SEQUENCING STUDY IN SAMAPLES FROM CD PATIENTS

In parallel with the mRNA analysis, we conducted a miRNA sequencing study in which we identified 929 differentially expressed miRNAs in affected tissue samples from CD patients compared to unaffected samples (862 downregulated, 67 upregulated). Of these, the 60 most significantly downregulated miRNAs were selected and we found that many of them correlated negatively with a variable number of genes associated with the vascular/endothelial compartment. We focused on the one with the most promising profile (miR-378a-3p) and observed that its expression in HUVECs was reduced in response to TGF- β . Under these conditions, exogenous addition of miR-378a-3p led to decreased expression of NOTCH1 and NOTCH4, suggesting that both genes could be targets of this miRNA.

4. ROLE OF SUCNR1 RECEPTOR IN INFLAMMATION

Previous studies demonstrated elevated succinate concentrations and increased expression of its receptor (SUCNR1) in the intestinal tissue of CD patients. The expression pattern of SUCNR1 was analysed by immunohistochemistry and we detected its presence in the endothelial cells of intestinal vessels. This suggested that the previously observed pro-inflammatory effects may be related to the regulation of endothelial function. Intravital microscopy experiments were performed in the mouse cremasteric muscle and revealed that *Sucnr1* deficiency (*Sucnr1*^{-/-} mice) significantly reduced leukocyte rolling and adhesion, as well as pro-inflammatory cytokine expression in response to TNF α treatment. Similarly, treatment with the SUCNR1 receptor antagonist (NF-56-EJ40) inhibited the interactions between human leukocytes and endothelial cells *in vitro* under conditions simulating venular blood flow.

Considering that the pro-inflammatory action of TNF α depends in part on the activation of the NF- κ B pathway, we analysed the expression of key components of this signalling pathway in our inflammation models. In both cases, the results indicated reduced activity of this pathway when the signalling through SUCNR1 was prevented.

Finally, the expression of the main endothelial and leukocyte adhesion molecules was analysed using flow cytometry. We observed that exogenous succinate exerts a complex effect on E-selectin expression in HUVECs by increasing its expression under control conditions while imposing a reduction in cells under TNF α stimulation.

CONCLUSIONS

1. Crohn's disease affected ileal tissue shows a differential transcriptomic profile indicative of extracellular matrix accumulation, expansion of the vascular compartment, epithelial depletion, inflammatory cell infiltration, and alterations in cell-cell and cell-ECM interactions.
2. Ileal tissue from Crohn's disease patients shows an increased expression of Notch3 and integrin α 11 which correlates with markers of endothelial expansion, fibrosis, and epithelial loss.
3. Notch3 and integrin α 11 proteins are detected in the endothelium of ileal blood vessels in Crohn's disease patients, and their expression in endothelial cells increases in response to TGF- β .
4. Integrin α 11 mediates endothelial cell migration induced by DLL4.
5. Crohn's disease affected ileal tissue exhibits a differential microRNA expression profile, with miR-378a-3p standing out due to its marked downregulation and strong negative correlation with indicators of endothelial expansion.
6. miR-378a-3p expression in endothelial cells is reduced in response to TGF- β , and its restoration decreases the expression of NOTCH1 and NOTCH4.

7. Crohn's disease affected ileal tissue expresses SUCNR1 in the vascular endothelium.
8. The absence or the pharmacological blockade of SUCNR1 significantly reduces TNF α -induced leukocyte-endothelium interactions and NF- κ B pathway activation, although exposure of endothelial cells to high concentrations of exogenous succinate shows a complex pattern of effects that includes anti-inflammatory actions.
9. The overexpression of Notch3, integrin α 11 and SUCNR1 and the reduction of miR-378a-3p detected in the intestinal lesions of Crohn's patients, together with the influence that these molecules seem to have on endothelial function, suggest their contribution to the structural alterations of the intestinal tissue that occur with the progression of the disease and propose them as new therapeutic targets.



INTRODUCCIÓN

1. Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII)

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es un trastorno inflamatorio crónico y progresivo del tracto gastrointestinal. Se clasifica principalmente en dos subtipos, la colitis ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn (EC), que, aunque presentan manifestaciones clínicas distintas, comparten características patológicas. Se define un tercer subtipo, la EII-indeterminada, cuando las manifestaciones clínicas no permiten su clasificación en las dos anteriores (1).

La CU se caracteriza por una inflamación que comienza generalmente en el recto y se puede extender hasta el colon proximal, afectando las capas mucosa y submucosa. Los síntomas incluyen diarrea con sangre, dolor abdominal, fiebre y, en casos graves, pueden aparecer complicaciones como megacolon tóxico o cáncer de colon (2). Según la extensión y ubicación, la clasificación de Montreal (**Tabla 1**) divide la CU en pancolitis (afecta todo el colon y ocurre en el 20-30% de los casos), colitis izquierda (localizada desde la porción colorrectal distal a la flexión esplénica y está presente en el 20-30% de los casos) y proctitis (afecta al recto y al colon sigmoide y es la forma más común, presente en el 50-60% de los pacientes) (3, 4).

Tabla 1. Clasificación de Montreal para la CU.

Extensión	Gravedad
E1 - Proctitis (recto)	S0 - Remisión clínica
E2 - CU izquierda (CU distal)	S1 - Leve
E3 - CU extensiva (pancolitis)	S2 - Moderada
	S3 - Severa

A diferencia de la CU, la EC puede afectar cualquier área del tracto gastrointestinal, aunque el íleon es su localización más común. En este caso, la inflamación es segmentaria, asimétrica y transmural, pudiendo afectar a cualquier capa de la pared intestinal (mucosa, submucosa, muscular o serosa), con áreas sanas que pueden coexistir junto a las lesionadas. Los síntomas clínicos

más comunes incluyen diarrea crónica, pérdida de peso, fatiga y dolor abdominal, pudiendo presentar algunos pacientes diarrea con sangre. Inicialmente, los pacientes con EC suelen presentar un fenotipo inflamatorio pero, con el tiempo, entre el 30-50% presentan complicaciones como el desarrollo de estenosis o fístulas (5, 6). Las estenosis se deben a un engrosamiento de la pared intestinal que constriñe la luz, lo que dificulta o incluso bloquea el tránsito digestivo. Las fístulas son conexiones anormales entre diferentes partes del tracto intestinal, o entre el intestino y otras estructuras epitelializadas (p.e. vejiga, vesícula biliar, la pared abdominal, etc.), que pueden provocar infecciones, abscesos y fugas de contenido intestinal. Ambas complicaciones suelen requerir una intervención quirúrgica que no es curativa, observándose un 50% de recurrencia clínica y un 30% de recurrencia quirúrgica (7). Además, un tercio de los pacientes presenta afectación perianal y aproximadamente el 50% también experimentan manifestaciones extraintestinales en articulaciones, piel u ojos (8). De acuerdo con todo ello, la clasificación de Montreal define tres subtipos de EC según la edad de diagnóstico, ubicación y comportamiento (B1: inflamatoria, B2: estenosante y B3: fistulizante/penetrante) (3, 8, 9) (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de Montreal para la EC.

Edad del diagnóstico
A1 - Menor o igual a 16 años
A2 - Entre 17 y 40 años
A3 - Mayor de 40 años
Localización
L1 - Íleon terminal
L2 - Colon
L3 - Ileocolónica
L4 - Tracto digestivo superior (se añade a L1-L3 cuando es concomitante)
Comportamiento
B1 - Inflamatorio
B2 - Estenosante
B3 - Fistulizante
P - Enfermedad perianal (se añade a B1-B3 cuando es concomitante)

Esta clasificación se complementa con el índice de Lémann (o *Crohn's Disease Digestive Damage Score*, **Figura 1**), que establece un sistema de puntuación diseñado para la evaluación integral del daño estructural intestinal, incluidas las lesiones estenosantes, las lesiones penetrantes y la resección quirúrgica, para medir la progresión de la enfermedad y la eficacia del tratamiento (10, 11).

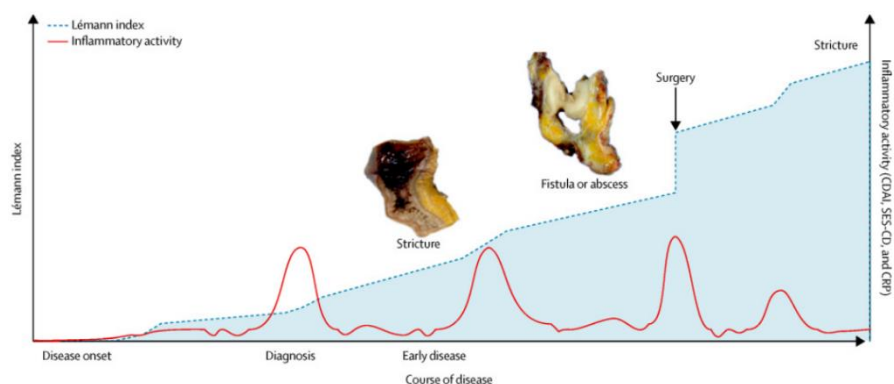


Figura 1. Medición de la progresión de la enfermedad (inflamación y daño) en un paciente con EC mediante el índice de Lémann (8). El gráfico representa la evolución de la actividad inflamatoria (línea roja, eje derecho) y la acumulación de daño estructural (índice de Lémann, área azul, eje izquierdo) en función del tiempo.

1.1. Epidemiología

La EII es un problema de salud pública a nivel mundial, siendo la segunda enfermedad inflamatoria crónica más común solo por detrás de la artritis reumatoide (12).

Su epidemiología presenta gran variabilidad geográfica (**Figura 2**). Estados Unidos lidera en prevalencia global, concentrando cerca de una cuarta parte de los casos mundiales. En Europa, el Reino Unido presenta la mayor prevalencia, con 373 casos por cada 100.000 habitantes (13). Y en España, se estima que el 0.78% de la población (alrededor de 300.000 personas) tiene EII (14). La

incidencia también es más alta en el mundo occidental, donde oscila entre 20 y 30 casos por cada 100.000 habitantes (15). Además, desde mediados del siglo XX, la incidencia y prevalencia de la EII han ido aumentando de forma progresiva en Europa, América del Norte, Australia y Nueva Zelanda (12, 16). Sin embargo, en las últimas décadas, el aumento de la incidencia ha sido más importante en países de Asia, África, América del Sur y Europa del Este (17), lo que se interpreta como consecuencia de la asunción de hábitos tradicionalmente asociados al mundo occidental en estas áreas (18). No existe una conclusión evidente sobre diferencias en la incidencia de EII en relación al género. Sí que parece influir el origen étnico, ya que el riesgo de padecer EII es mayor en la población judía, especialmente en la que reside en Europa y Estados Unidos en comparación con la que reside en Israel, seguida de la población caucásica. No obstante, la EII afecta a personas de todos los grupos étnicos cuyas familias han vivido en el mundo occidental durante muchas generaciones (19, 20).

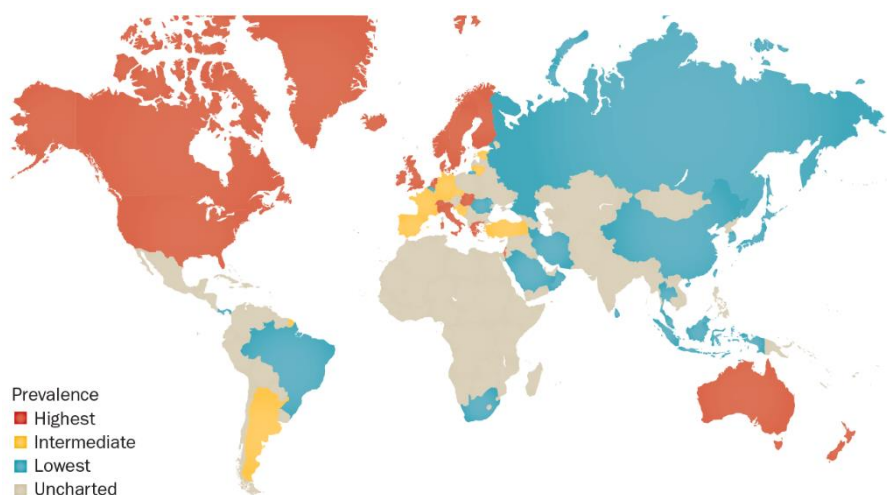


Figura 2. Prevalencia mundial de la EII (16).

Atendiendo a la edad del debut, la EII es predominantemente una enfermedad de adultos jóvenes, siendo la CU mayoritariamente diagnosticada alrededor de los 30-40 años de edad y la EC en sujetos de entre 20 y 30 años

(18), aunque puede aparecer a cualquier edad. Aproximadamente el 25% de los pacientes con EII debuta antes de los 20 años y la incidencia máxima en este periodo se produce durante la adolescencia. Aun así, cerca del 20 % de los niños con EII la presentarán antes de los 10 años de edad (21). De hecho, en los últimos 25 años, se ha observado a nivel mundial un enorme aumento en la incidencia y prevalencia de la EII en la población pediátrica, predominando el número de casos de EC frente a la CU (22).

1.2. Diagnóstico

El diagnóstico de la EII implica una combinación de evaluaciones clínicas, análisis bioquímicos, estudios radiológicos, procedimientos endoscópicos y exámenes histopatológicos. El objetivo es distinguir la EII de otras afecciones gastrointestinales y diferenciar entre la EC y la CU.

Como indicadores de inflamación se utilizan la sedimentación globular y los hemogramas, además de biomarcadores serológicos como los anticuerpos perinucleares anti-citoplasma de neutrófilos (pANCA) (23). También se utiliza el nivel de calprotectina, que es una proteína liberada principalmente por los neutrófilos y que se detecta tanto en heces como en suero (24, 25). Otros biomarcadores utilizados son la proteína C reactiva (CRP), el factor de trébol 3 (TFF3), ARN circulantes no codificantes (miARNs y lncARNs) (24), así como citocinas (23) o metaloproteinasas de matriz (MMPs) y sus inhibidores (TIMP, *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases*) (26). También se plantea el análisis de distintos componentes de la matriz extracelular (MEC) como indicadores de fibrogénesis (27). El estudio de biomarcadores se complementa con el diagnóstico histológico y por imagen. En la mayoría de los casos, se utiliza la sigmoidoscopia o la colonoscopia para visualizar el daño típico de la EII (12) o, si es posible, la tomografía computarizada abdominal (28). También se puede utilizar la ecografía del intestino delgado para medir el espesor de la pared intestinal y detectar complicaciones (29). Finalmente, el estudio patológico de

biopsias de la pared intestinal ayuda en la determinación del tipo de EII, la evaluación de alteraciones estructurales y posibles complicaciones, y la detección de displasias (30, 31).

1.3. Tratamiento

El tratamiento de la EII pretende reducir la inflamación, mantener los periodos de remisión y evitar cambios estructurales de la pared intestinal que predispongan al desarrollo de complicaciones. A este respecto, se ha observado que la evolución clínica es más favorable y la necesidad de cirugía menos frecuente si con el tratamiento se consigue una curación transmural y no sólo curación mucosa (32).

La terapia actual se basa en la adaptación nutricional (33), los fármacos antiinflamatorios e inmunomoduladores clásicos (corticoides y tiopurinas) y los tratamientos biológicos. El manejo médico es complejo y la decisión sobre el uso secuencial o combinado de los tratamientos disponibles requiere la consideración de múltiples factores (34, 35, 36). La terapia biológica principal consiste en el bloqueo del factor de necrosis tumoral (TNF, *Tumor Necrosis Factor*) (p.e. infliximab, adalimumab o certolizumab) (37), las citocinas IL-12 e IL-23 (ustekinumab, risankizumab), o las integrinas mediadoras del reclutamiento leucocitario (integrinas $\alpha 4$ - vedolizumab, natalizumab) (38). Por otro lado, se han desarrollado nuevas moléculas pequeñas, como los inhibidores orales de JAK (tofacitinib, upadacitinib o filgotinib), que, frente a la terapia biológica, presentan como ventajas la vía de administración, el coste y la ausencia de inmunogenicidad. Por contra, han mostrado efectos secundarios graves, como infecciones y problemas cardiovasculares (33, 39). Por último, en casos de difícil manejo, se considera el uso de los moduladores del receptor S1PR (*Sphingosine 1-phosphate receptor*) como el ozanimod (40).

Cabe decir que el uso de productos biológicos ha aumentado las tasas de curación transmural y reducido la necesidad de procedimientos quirúrgicos para

la EC, pero la frecuencia con que la cirugía se hace necesaria sigue siendo significativa (32, 41). Además, muchos pacientes presentan EII de difícil tratamiento, es decir, que presentan síntomas persistentes y actividad de la enfermedad tras recurrir a los tratamientos médicos o quirúrgicos disponibles (42). Por todo ello, sigue siendo necesario el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

2. Etiopatogénesis

La etiología de la EII no está bien definida y, en el presente, se interpreta como el resultado de la interacción de varios elementos. Se consideran factores contribuyentes la predisposición genética, las modificaciones epigenéticas, las alteraciones en la composición de la microbiota intestinal, la desregulación del sistema inmunológico innato y adaptativo y los factores ambientales, como la dieta, el estrés o el tabaquismo. Se entiende así que la enfermedad resulta de la exposición a la microbiota intestinal a través de una barrera epitelial comprometida y de la consecuente respuesta inmunitaria anormal en pacientes especialmente sensibles por su dotación genética y por modificaciones epigenéticas asociadas al exposoma. Comprender estas interacciones es esencial para desarrollar terapias dirigidas y enfoques de tratamiento personalizados frente a la EII.

2.1. Factores genéticos y epigenéticos

Desde hace años, numerosos estudios han informado sobre la agrupación familiar de la enfermedad. Se estima que entre el 5-23% de las personas con EII tienen un familiar de primer grado con EII (13) y tiende a haber similitud clínica entre parientes afectos (21). Por ello, el componente genético en la etiología de la EII ha sido ampliamente estudiado.

Los estudios de asociación del genoma completo (GWAS) han identificado hasta el día de hoy 320 loci de riesgo que predisponen a la EII (43). El objetivo de

estos estudios es la evaluación de las variantes genéticas más comunes en diferentes individuos para ver si alguna de ellas está asociada a un rasgo específico de la enfermedad. En general, la mayoría de las mutaciones genéticas ligadas a la EII están relacionadas con genes involucrados en la regulación de la respuesta inmune (NOD2, CARD15, HLA), la autofagia (ATG16L1, IRGM), la señalización de citocinas (JAK, STAT, IL12B, IL10, IL-23R) y la disrupción de la barrera intestinal (ECM1, LAMB1) (44). No obstante, los factores genéticos solamente pueden explicar aproximadamente una cuarta parte de la heredabilidad en la EII, por lo que se deduce que los cambios epigenéticos influenciados por factores ambientales deben desempeñar un papel crucial en la aparición y progresión de la enfermedad. Además, el aumento de la incidencia y su extensión geográfica en los últimos 50 años se ha producido demasiado rápido para explicarlo solamente por cambios en nuestra composición genética (45, 46).

La epigenética estudia los cambios en la expresión génica que, siendo hereditarios, no implican cambios en la secuencia de ADN y suelen estar influenciados por factores ambientales. Los mecanismos epigenéticos clásicos incluyen la metilación del ADN, la modificación de histonas, los ARN no codificantes y el posicionamiento de los nucleosomas. La metilación del ADN es el mecanismo más estudiado y ocurre cuando un grupo metilo se transfiere covalentemente a la posición C5 de la citosina, lo que suele asociarse al silenciamiento de la expresión. Las histonas intervienen en la regulación y el empaquetamiento del ADN en cromatina. Son el complejo central de una subunidad de nucleosoma, y sus modificaciones postraduccionales, que incluyen acetilación, metilación, fosforilación y ubiquitinación se correlacionan con la accesibilidad de la cromatina y la probabilidad de transcripción. Por último, los miARN son moléculas cortas de ARN monocatenario con una longitud promedio de 22 nucleótidos que actúan para regular la expresión génica. Se pueden encontrar en todo el genoma, tanto en regiones intergénicas como intrónicas,

tanto de genes codificantes de proteínas como de genes no codificantes. Los miARN se procesan a partir de una estructura en horquilla (pre-miARN) escindida de una transcripción primaria de aproximadamente 3 kb (46).

El progreso más consistente en la EII se ha logrado en relación con la comprensión de los cambios de metilación del ADN (46), si bien gran cantidad de literatura describe alteraciones de las histonas (47) y miARN en pacientes con EII (48, 49) (**Figura 3**). Estos últimos presentan el atractivo de ser susceptibles de regulación farmacológica tanto al alza, con la administración de mímicos, como a la baja, con la administración de antagonistas. Presentan, además, potencial como marcadores de enfermedad. A este respecto, es importante registrar los cambios en su expresión en el tejido afecto por la enfermedad y su correlato en muestras fácilmente accesibles como son el suero o las heces. Cabe reseñar que la mayoría de detecciones en tejido ileal se han realizado en biopsias, reflejando por tanto cambios limitados a la superficie mucosa.

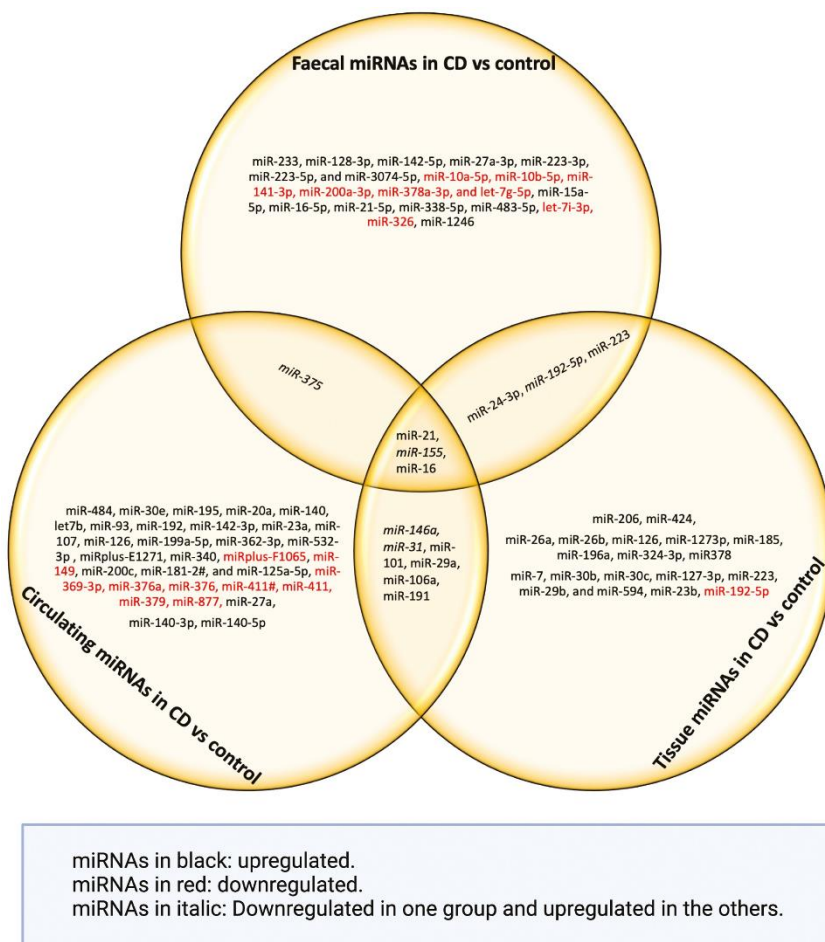


Figura 3. Resumen de los microARN (miARN) desregulados en la enfermedad de Crohn (EC) (49).

2.2. Factores ambientales

De entre los factores ambientales que parecen contribuir al desarrollo de la EI encontramos la dieta, el tabaquismo, el estrés y el nivel de higiene (50). La dieta occidental, rica en grasas saturadas y azúcares refinados, aumenta el riesgo de padecer la enfermedad por favorecer la alteración del microbioma intestinal y la inflamación (51), mientras que una dieta alta en fibra y ácidos grasos lo reduce (52, 53). El tabaquismo eleva el riesgo de padecer EC y de su recurrencia (54), aunque, curiosamente, parece tener un efecto protector en la CU (55). El

estrés y la depresión pueden resultar en una activación de células inflamatorias y una alteración de la permeabilidad intestinal (56, 57), y algunas infecciones crónicas y persistentes pueden desencadenar respuestas inmunes anormales (57). Finalmente, una menor exposición a microorganismos causada por un aumento de los hábitos de higiene, el uso de antibióticos o la vacunación, pueden aumentar también el riesgo de desarrollar trastornos autoinmunes e inflamatorios como el que nos ocupa (58).

2.3. Disrupción de la barrera epitelial intestinal

La barrera epitelial intestinal, compuesta por el epitelio intestinal y la capa mucosa, regula el paso de sustancias (nutrientes, agua e iones) y actúa como barrera física e inmunológica actuando como defensa contra patógenos. En condiciones fisiológicas, la capa mucosa contiene principalmente mucina-2, AMP (α -defensinas, β -defensinas y catelicidinas) e inmunoglobulina A secretora, y está en contacto con la microbiota comensal intestinal. En cuanto al epitelio intestinal, está constituido por diferentes tipos de células epiteliales especializadas que se renuevan continuamente y se distribuyen formando invaginaciones (criptas) y protuberancias (vellosidades) (59) (**Figura 4**). Las células madre epiteliales (LGR5+) se localizan en la base de estas criptas y de ellas derivan toda la variedad de tipos celulares. Entre ellas se encuentran, los enterocitos (absorben nutrientes), las células caliciformes (secretan mucinas y TFFs), las células de Paneth (secretan proteínas antimicrobianas), las células enteroendocrinas (secretan hormonas gastrointestinales) y las células M (*microfold cells*) (presentan antígenos a las células inmunes subyacentes) (60), y su proliferación depende directamente de dos vías de señalización, la vía Notch ([sección 5.1.](#)) y la vía Wnt. Todas estas células están conectadas por uniones estrechas (*TJ*, *Tight Junctions*), uniones adherentes (*AJ*, *Adherent Junctions*) y desmosomas, contribuyendo a la estructura de la barrera epitelial y regulando el transporte paracelular entre ellas. Por último, en la barrera intestinal (lámina

propia) también se encuentran presentes células inmunes, como las células T y B, macrófagos y células dendríticas (60).

En la EII, la inflamación local es capaz de alterar esta barrera y comprometer las funciones reguladoras que la caracterizan (59), lo que resulta en una reducción de la capa mucosa y un aumento de la permeabilidad intestinal. Esta situación facilita la entrada de agentes inflamatorios y microorganismos patógenos, lo que aumenta la interacción entre células epiteliales y el sistema inmunológico, contribuyendo al daño de la mucosa (59, 61). Investigaciones recientes han alimentado y perpetuado el concepto de que los defectos de barrera son componentes críticos del desarrollo y comportamiento de la enfermedad y potencialmente también un área de intervención terapéutica en pacientes con EII (62). De hecho, la disfunción de la barrera intestinal precede y predice el desarrollo de la EC (63).

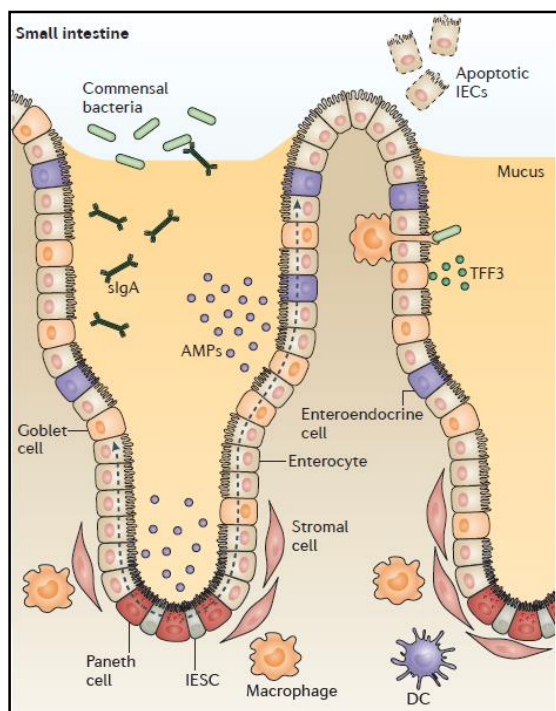


Figura 4. Principales componentes que constituyen la barrera epitelial intestinal (64). El epitelio intestinal actúa como una barrera física de defensa entre el interior del organismo y la luz intestinal. Esta barrera intestinal está constituida por una capa unicelular de diferentes tipos de células epiteliales y linfocitos intraepiteliales. En la base de las criptas intestinales se encuentran las células madre epiteliales, que proliferan y se diferencian para formar los demás tipos celulares. La capa mucosa es la capa más externa y en ella encontramos bacterias comensales, mucinas, proteínas antimicrobianas e IgA. La lamina propia se encuentra en el otro lado de la barrera intestinal y está poblada por células inmunes (macrófagos, células dendríticas y células linfoides). AMP, proteínas antimicrobianas; DC, célula dendrítica; IgA, Inmunoglobulina A; IESC, célula madre epitelial intestinal; IEC, células epiteliales intestinales; IEL, linfocitos intraepiteliales; TFF3, factor trébol 3.

2.4. Microbiota intestinal

El papel de la microbiota es importante para el equilibrio intestinal y metabólico, y también para la homeostasis inmunitaria, ya que existe una interacción continua entre los microorganismos intestinales y la inmunidad del huésped. Está formada por hasta 1.000 especies distintas y, entre ellas, se encuentran aproximadamente unas 10^{14} unidades formadoras de colonias por gramo de contenido colónico (65) clasificadas en 4 filos bacterianos (*Firmicutes*,

Bacteroidetes, *Actinobacteria* y *Proteobacteria*) (66). Las bacterias que la componen se concentran a partir del íleon y, principalmente, en el colon, debido a que la acidez gástrica y biliar dificulta la vida de éstas en el estómago, duodeno y yeyuno. Además, esta microbiota puede verse afectada por la dieta, el consumo de medicamentos o la genética del huésped (67). En personas sanas, donde se encuentra una microbiota comensal equilibrada (eubiosis), existe un mutualismo huésped-microbiota beneficioso para ambos. En cambio, los pacientes con EI a menudo presentan un desequilibrio o disbiosis, observándose una disminución de la diversidad microbiana (68-70), que supone una reducción de bacterias beneficiosas (*Firmicutes* y *Bacteroidetes*) y un aumento de bacterias potencialmente patógenas (*Proteobacteria*) (71). Estudios recientes de nuestro grupo también han evidenciado una disminución de *Enterococcus* en pacientes con EC complicada (72). Estos desequilibrios pueden contribuir a la inflamación mediante la alteración de la barrera intestinal y la activación del sistema inmunitario (21, 44, 73) si bien, hasta el momento, no se ha podido demostrar una relación causal entre disbiosis y EI (74), por lo que no está claro si dicha disbiosis es causa o consecuencia de la patología.

2.5. Respuesta inmunitaria

La patogenia de la EI está inseparablemente ligada a una activación desregulada del sistema inmunitario, que media tanto el inicio como la perpetuación de la enfermedad, que implica a la inmunidad innata y a la específica, y que es el motor principal de sus manifestaciones locales y sistémicas (75, 76) (Figura 5).

2.5.1. Inmunidad innata

El sistema inmunológico innato es la primera línea de defensa contra los organismos luminales y principal promotor de la respuesta inmune adaptativa. Este sistema de defensa no es específico, responde de forma antígeno-

independiente y sin adquirir memoria inmunológica. En él se implican neutrófilos, monocitos, macrófagos y células dendríticas (CD), cuya activación conforma la respuesta inflamatoria.

Los neutrófilos son los primeros en llegar al foco inflamatorio y se encargan de eliminar microorganismos invasores y restos tisulares. Contribuyen a la patogénesis de la EII generando daño oxidativo y proteolítico, y mediante la liberación de mediadores inflamatorios. Todo ello deteriora la función de barrera epitelial, incrementa la permeabilidad vascular y provoca daño tisular (77-79).

Los macrófagos tisulares se encargan de controlar la microbiota y mantener la homeostasis de la mucosa (80, 81), así como, de inducir la respuesta inmunitaria específica mediante la presentación de antígenos a las células T (82). Pueden adquirir una amplia variedad de fenotipos dependiendo del microambiente en el que se encuentren. En condiciones de inflamación, generan citocinas proinflamatorias, quimiocinas y radicales libres como resultado una regulación positiva de la vía de señalización NF- κ B (factor nuclear kappa B) en respuesta a mediadores como TNF α , IFN- γ o LPS (fenotipo proinflamatorio o M1) (82). Alternativamente, existe un fenotipo M2, que se caracteriza por una baja expresión de receptores inmunes innatos y citoquinas proinflamatorias (83) y que se subclasifica en M2a (implicado en la reparación de tejidos y cicatrización de heridas (84)), M2b (que ejerce una función reguladora mediante la secreción de citocinas pro y antiinflamatorias), M2c (encargado de la fagocitosis de células apoptóticas), y M2d (estimulador de la angiogénesis y la metástasis en el cáncer) (85). No obstante, cabe reseñar que esta clasificación se ha revelado simplista y poco útil ya que la estrategia inicial de reducir los macrófagos M1 y aumentar los macrófagos M2 para minimizar la inflamación y favorecer la reparación no es un enfoque terapéutico beneficioso. Se necesitaría, en cambio, restablecer la secuencia fenotípica que acontece en la reparación normal de los tejidos (86, 87).

En tercer lugar, las células dendríticas participan también en el inicio de la respuesta inmune innata y en la formación de la respuesta adaptativa. Su función principal es monitorear el microambiente circundante, tomar muestras de antígenos y establecer eventos inmunes posteriores, es decir, inducir tolerancia o incitar una respuesta proinflamatoria defensiva del huésped. Establecen para ello contacto con el epitelio intestinal, el estroma y las células T y B. En circunstancias normales, fomentan la homeostasis adquiriendo un fenotipo no inflamatorio similar a TH2. En la enfermedad de Crohn, esta regulación es deficiente y estas células muestran un estado activado que se manifiesta con niveles elevados de TLR2 y TLR4, CD40, de las citocinas IL-12 e IL-6, o del receptor de quimiocina CCR7 (88).

2.5.2. Inmunidad adaptativa

La inmunidad adaptativa o adquirida consiste en una respuesta altamente especializada y específica que se desarrolla en respuesta a la exposición a diversos patógenos y proporciona inmunidad a largo plazo (memoria). Los principales efectores de esta inmunidad son los linfocitos B, responsables de la respuesta humoral, y los linfocitos T, mediadores de la respuesta celular.

Tanto en la EC como en la CU, se observa una activación general de la respuesta inmunitaria humoral, que se manifiesta por alteraciones significativas en la producción de distintas subclases de inmunoglobulinas. Por otro lado, hasta hace menos de una década, la EC se designaba como una enfermedad TH1 basada en una producción elevada de IL-12 e IFN- γ , mientras que la CU se caracterizaba como una enfermedad TH2 atípica basada en una producción aumentada de IL-5 e IL-13, pero niveles bajos de IL-4. Este paradigma TH1/TH2 se revisó con el descubrimiento de las células TH17 productoras de IL-17 y de la interacción entre las células TH1, TH2, TH17 y células T reguladoras (TREG). Esta complejidad está presente en pacientes con EC, en quienes los linfocitos infiltrados en la mucosa producen tanto IL-17 como IFN- γ , lo que redefine esta

forma de EI como una enfermedad mixta TH1 y TH1/TH17. Además, se asume una disfunción de las TREG que son esenciales para desarrollar tolerancia a antígenos propios y ajenos. Si bien su papel está poco definido, se sugiere que la inmunopatogénesis de la EI se debe, al menos en parte, a una función supresora insuficiente en estas células. Por último, la función de todos estos linfocitos puede verse modulada por alteraciones en la población de células NK (*Natural Killer*) e ILC (célula linfóide innata) a través de la liberación de IL-17A, IL-22 o IL-13 (88).

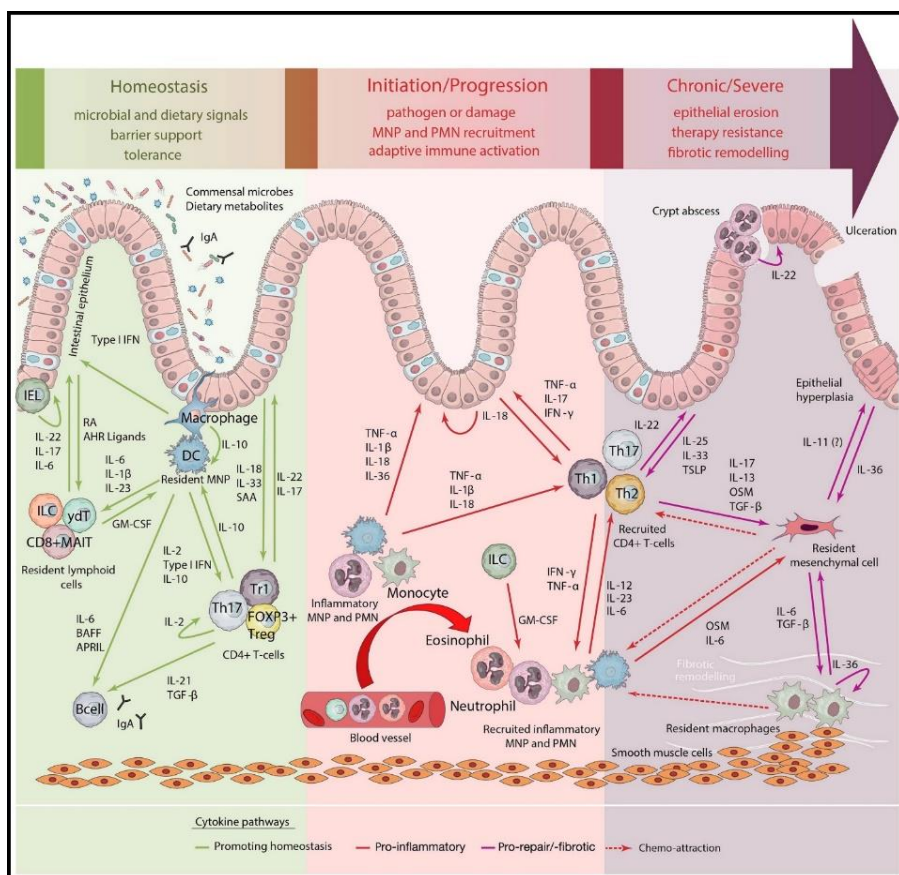


Figura 5. Evolución de la respuesta inflamatoria / inmunitaria durante la progresión de la EII (89). Numerosas citocinas median la comunicación entre células epiteliales y células inmunitarias innatas y adaptativas manteniendo la barrera epitelial y la tolerancia a la microbiota en homeostasis (flechas verdes). La interrupción de esta comunicación cruzada conduce al inicio de la inflamación, principalmente por citocinas proinflamatorias de origen innato en la fase temprana de la EII (flechas rojas, fase de iniciación y progresión). Si esta inflamación inicial no se resuelve, se reclutan fagocitos mononucleares (MNP) y leucocitos polimorfonucleares (PMN) proinflamatorios (flechas discontinuas), lo que crea un entorno de citocinas que da lugar a las respuestas patógenas Th1 y Th17 (flechas rojas, fase de iniciación y progresión). El establecimiento de la inflamación crónica se caracteriza por una respuesta proinflamatoria sustancial impulsada por mecanismos inmunitarios adaptativos, que puede evolucionar con el tiempo hacia una respuesta prorreparadora de tipo 2 (flechas violetas, fase crónica y grave). La inflamación crónica persistente puede provocar respuestas de reparación alteradas que conducen a una remodelación fibrótica en la EII en etapa avanzada. AHR, receptor de hidrocarburos arílicos; APRIL, ligando inductor de proliferación; BAFF, factor activador de células B; DC, célula dendrítica; FOXP3, *forkhead box P3*; GM-CSF, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos; IEL, linfocito intraepitelial; IFN, interferón; Ig, inmunoglobulina; IL, interleucina; ILC, célula linfocitoide innata; MAIT, célula T

invariante asociada a la mucosa; MNP, fagocitos mononucleares; OSM, oncostatina M; PMN, leucocito polimorfonuclear; SAA, amiloide sérico A; TGF, factor de crecimiento transformante; Th, T-helper; TNF, factor de necrosis tumoral; Tr1, células reguladoras tipo 1; y TSLP, linfopoyetina estromal tímica.

3. Cambios estructurales de la pared intestinal en la enfermedad de Crohn

Durante el curso de la EC se produce una acumulación de alteraciones estructurales en el intestino que acaban manifestándose en forma de estenosis y fístulas (**Figura 1**). Los tratamientos actuales no las previenen ni las corrigen, por lo que la única opción terapéutica es la cirugía, que no es curativa y no evita por tanto frecuentes recidivas. El análisis tisular de estos tejidos estenóticos o fistulizados muestra un aumento en el número de vasos y una significativa acumulación de matriz extracelular. Se deduce por ello, que las complicaciones de la EC se asocian a una desregulación de la angiogénesis y a la activación de procesos fibrogénicos.

3.1. Alteraciones vasculares

El endotelio vascular está constituido por células endoteliales (CE) formando una monocapa que cubre la superficie luminal de los vasos sanguíneos y separa la sangre del tejido subendotelial. Es un tejido metabólicamente activo que interacciona con otras células y factores regulando el tono y la permeabilidad vascular, el tráfico leucocitario, la agregación plaquetaria, la angiogénesis, la coagulación y la fibrinólisis. En condiciones normales, las CE forman una barrera de intercambio antiadhesiva y selectivamente permeable (90). Sin embargo, en la EII, responden a altos niveles de citocinas y quimiocinas, lo que provoca su activación y, por tanto, la expresión de moléculas de adhesión, la extravasación de leucocitos ([sección 4.1.](#)) y la alteración de la función de la barrera (78), incrementándose la permeabilidad y causando edema y daño tisular (91). De hecho, las CE derivadas de la mucosa afecta tienen una mayor capacidad para unir y retener leucocitos en comparación con las derivadas de mucosa normal

sin EII (92). Esta diferencia se observa incluso en CE autólogas aisladas de porciones de colon no afectadas y porciones inflamadas de pacientes con EC (93). Ello indica que la inflamación crónica condiciona la microvasculatura local a un estado permanente de hiperadhesividad para los leucocitos, que es muy probable que contribuya al mantenimiento de ésta.

Las CE inmersas en el ambiente inflamatorio también se exponen a factores de crecimiento como VEGF, y ello conlleva un estímulo de la angiogénesis (94). De hecho, los pacientes con EII presentan una mayor densidad vascular que los sujetos control en el tejido intestinal (95, 96), y lo mismo ocurre en modelos animales de colitis inducida por TNBS y DSS (78, 97). Esta situación supone un sello distintivo de la enfermedad intestinal activa y está relacionada con la gravedad de la enfermedad (78).

Generalmente, la angiogénesis consiste tanto en el reclutamiento de células progenitoras endoteliales, como en la división y extensión de los vasos existentes (98). Sin embargo, en la angiogénesis inflamatoria presente en la EII los vasos formados difieren de los que se forman durante un desarrollo normal. Estos vasos son inmaduros, no tienen revestimiento de pericitos, expresan ECAM (*Endothelial Cell-selective Adhesion Molecule*), tienen fugas, están hipoperfundidos, en muchos casos son estenosos e hipertrombóticos y presentan mayor capacidad para responder a factores de crecimiento (99, 100). Todo ello favorece la progresión de la EII (101, 102).

3.2. Fibrosis

Tras una lesión, la cicatrización es parte importante del proceso de reparación del tejido, pero el daño tisular repetido o la desregulación de la respuesta de curación de la herida conducen eventualmente al desarrollo de fibrosis, que es un proceso patológico definido por un depósito excesivo de matriz extracelular (MEC). La MEC está formada por un entramado de macromoléculas extracelulares como colágeno, glicoproteínas y enzimas, y su

función principal es dar soporte a las células circundantes. La fibrosis ocurre cuando se produce un desequilibrio entre la producción y la degradación de estas proteínas. La consecuente acumulación de MEC provoca cambios estructurales que suelen conducir a una disfunción orgánica (103). Aunque tradicionalmente la fibrosis en la EC se ha asociado al desarrollo de estenosis, hoy sabemos que es también un factor esencial en el fenotipo penetrante o fistulizante. De hecho, estudios recientes muestran un grado similar de fibrosis en los fenotipos B2 y B3 (58, 104).

La inflamación intestinal expone a las células mesenquimales a un microambiente complejo que incluye el contenido luminal y múltiples mediadores inflamatorios (citocinas y factores de crecimiento liberados por células inmunes y células no inmunes) que es muy probablemente crítico para el inicio de la fibrosis intestinal, pero que también puede perpetuarla. La cronificación se asocia a una evolución en la respuesta inflamatoria y a cambios en los mediadores involucrados (**Figura 5**). La asociación entre inflamación y fibrosis se sustenta en las siguientes observaciones: (1) la ubicación de las estenosis sigue la ubicación de la enfermedad, (2) el grado de fibrosis se correlaciona con el grado de inflamación y (3) ni en la CU ni en la EC se ha informado de fibrosis en áreas no afectadas por la inflamación (105). No obstante, el control de la inflamación no previene la fibrosis (106).

Las células más relevantes en la síntesis de MEC y, por tanto, en la respuesta fibrogénica, son los miofibroblastos. Estas son células muy activas que pueden proceder de linajes celulares diversos. Su precursor más habitual es el fibroblasto residente, que es el tipo celular más común en el tejido conectivo. Estas células mesenquimales tienen la función de mantener la estructura tisular en el intestino y de colaborar en la cicatrización y regeneración de heridas. Bajo la acción de distintos estímulos bioquímicos o mecánicos, se activan y se diferencian en miofibroblastos (107). Por otro lado, los miofibroblastos también pueden provenir de pericitos, de células del músculo liso, de fibrocitos

circulantes o de procesos de transición mesenquimal en células epiteliales y endoteliales (transición epitelial-mesenquimal, EMT; transición endotelial-mesenquimal, EndoMT; respectivamente, [sección 4.2.](#)) (108-110) (**Figura 6**). Así, ante un daño tisular, diversos tipos celulares se convierten en miofibroblastos y muestran mayor proliferación y migración, sintetizan matriz extracelular, y modulan la evolución del proceso de recuperación tras el daño mediante la secreción de citocinas y mediadores de la remodelación de la MEC. Cabe reseñar que estas funciones y los correspondientes cambios en el perfil transcripcional pueden ir variando con las diferentes etapas de la reparación tisular. Todo ello genera una población celular compleja, con fenotipos variados, cuya característica común es su capacidad de ejercer fuerza contráctil. Esta característica funcional y morfológica que define al miofibroblasto es debida a los haces de actina-miosina del citoesqueleto (107).

En situaciones fisiológicas, el destino de los miofibroblastos es la muerte por apoptosis. Sin embargo, en condiciones de inflamación crónica, la formación local de mediadores profibróticos mantiene el estímulo bioquímico, mientras que el progresivo aumento en la rigidez de la MEC perpetúa su activación a través de sus mecanorreceptores ([sección 5.2.](#)) (107). Todo ello produce un tejido cicatricial y, en el caso del intestino, estenosis, aumento de la presión sobre la pared intestinal y formación de fístulas (104, 111).

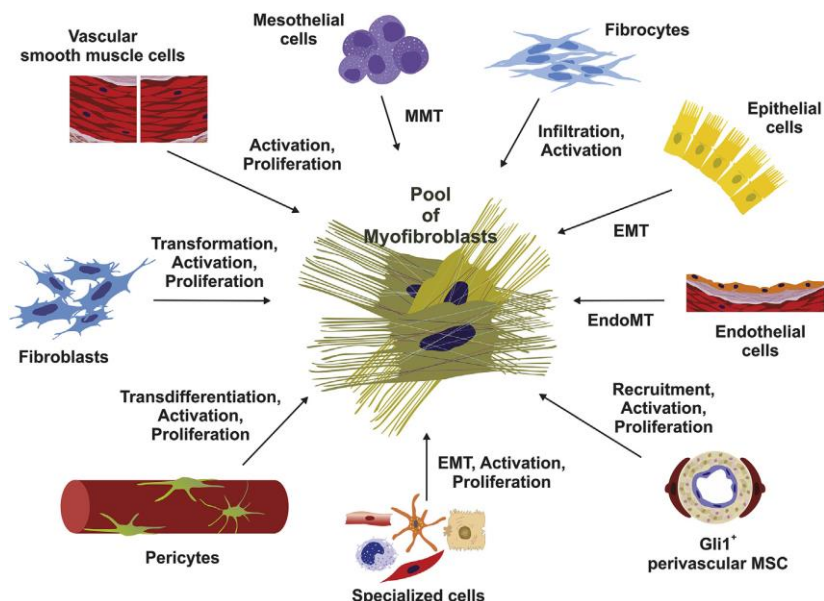


Figura 6. Origen y mecanismos que conducen a la formación de miofibroblastos (112).

Durante la fibrogénesis, los miofibroblastos son actores clave en la síntesis de la matriz extracelular. Esta población celular puede derivar de fibroblastos residentes, células mesoteliales, fibrocitos circulantes, células epiteliales, células endoteliales, pericitos, células musculares lisas vasculares, células madre mesenquimales perivasculares Gli1⁺ y otros tipos de células especializadas. Diferentes mecanismos, incluyendo la activación celular, transformación, proliferación, infiltración, expansión, transición epitelial-mesenquimal (EMT), transición mesotelial-mesenquimal (MMT) y transición endotelial-mesenquimal (EndoMT) son relevantes para aumentar la población de miofibroblastos.

Entre los estímulos bioquímicos responsables de la activación fibrogénica encontramos diversos factores de crecimiento y numerosas citocinas (**Figura 7, 113**). De entre los primeros, cabe destacar el factor de crecimiento transformante β o TGF- β como regulador central de la respuesta fibrogénica. De entre los segundos, nos detenemos en el factor de necrosis tumoral α (TNF α) como elemento patogénico esencial de la EII y principal diana de las terapias biológicas actuales.

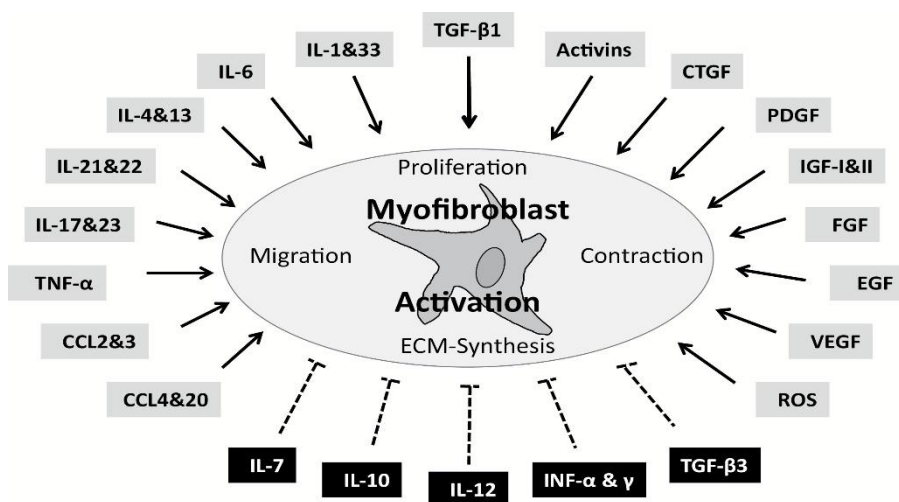


Figura 7. Efectos de múltiples factores de crecimiento y citocinas sobre los miofibroblastos de carácter pro o antifibrogénico (113). Las flechas indican efectos estimulantes, las líneas punteadas indican efectos inhibidores.

3.2.1. TGF-β

El TGF-β regula en condiciones fisiológicas la homeostasis inmunitaria, es producido especialmente por macrófagos y fibroblastos y ejerce diferentes acciones profibróticas, como la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, el aumento de la síntesis de proteínas de la MEC, y la activación de células epiteliales y endoteliales promoviendo la EMT y la EndoMT, respectivamente ([sección 4.2.](#)). En esta superfamilia existen tres isoformas, el TGF-β1 y el TGF-β2, que estimulan la producción de colágeno y modulan positivamente la expresión de los TIMP, y TGF-β3, que ha mostrado efectos contrarios en algunos contextos (114-116).

El TGF-β se sintetiza como un precursor que madura en el aparato de Golgi y, tras su secreción, se deposita en la MEC unido a la proteína LTBP-1 (*Latent TGF-β Binding Protein 1*), que lo mantiene inactivo. Su liberación y activación se realiza a través de proteasas extracelulares (plasmina, MMP-2, MMP-9, entre

otras) y la tracción celular mediada por integrinas ([sección 5.2.1.](#)). De hecho, numerosas proteínas extracelulares (proteoglicanos y colágenos) e inhibidores de libre difusión pueden interactuar con el TGF- β y controlar su disponibilidad ([117](#)). Una vez liberado, el TGF- β se une a un complejo tetramérico en la membrana plasmática, que consta de dos TGF β -R1 y dos TGF β -R2 ([118](#), [119](#)). En la vía canónica del TGF- β , una vez se activan los receptores de tipo I, la señal se transmite desde la membrana al núcleo mediante la fosforilación de unas proteínas efectoras llamadas SMAD ([120](#)), que se translocan al núcleo y modulan respuestas transcripcionales ([121](#)) (**Figura 8**). Esta vía puede ser defectuosa en la EII ([122](#)). Además, por vías no canónicas, el TGF- β modula la vía de las quinasas activadas por mitógenos MAPK/ERK, cJUN, p38 y la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)/AKT ([123](#), [124](#)), así como, la vía de señalización NF- κ B ([125](#)). En células intestinales de pacientes con EC, tanto el TGF- β como sus receptores se encuentran sobreexpresados ([126](#)).

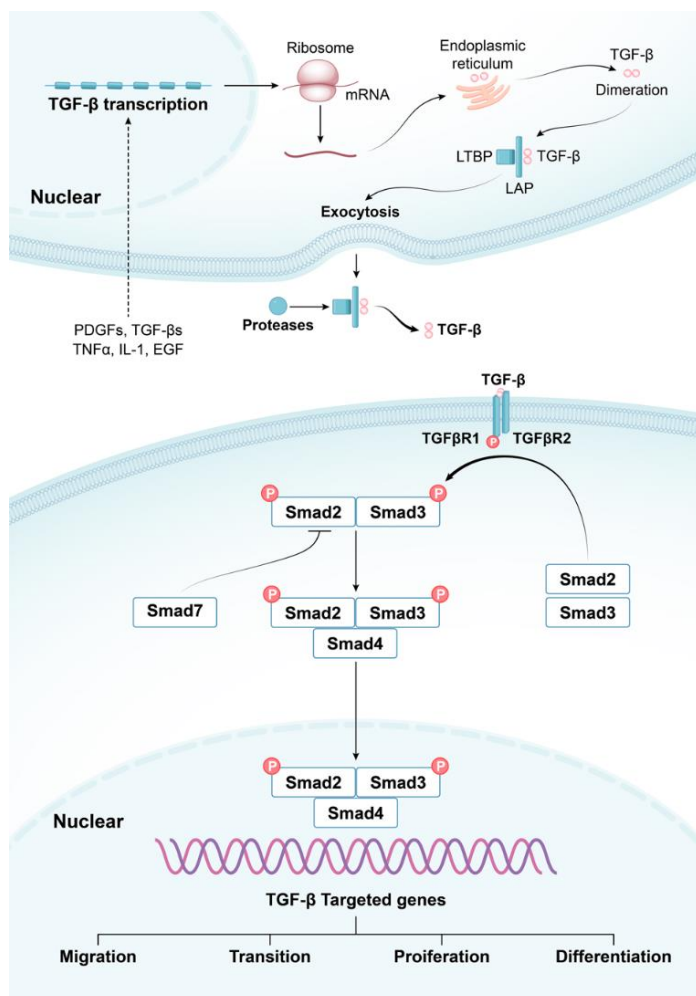


Figura 8. Descripción general de la vía de señalización canónica de TGF-β/Smad (127). Varias citocinas y factores de crecimiento, como PDGF, TGF-β, TNF-α, IL-1β y EGF, estimulan la transcripción de TGF-β. El pro-TGF-β se sintetiza en el ribosoma y el retículo endoplasmático. Después de la dimerización, LAP se une al TGF-β maduro y se adhiere a LTBP, ingresando al espacio intercelular a través de la exocitosis. El TGF-β es liberado por proteasas y se une a TGFβR-2 y TGFβR-1. El TGFβR-2 fosforilado fosforila a TGFβR-1, quien desencadena la fosforilación de Smad2/3, que interactúan con Smad4 y entran al núcleo para activar la expresión de genes diana. Smad7 es un regulador negativo de la señalización de TGF-β/Smad. LAP, péptido asociado a latencia; LTBP, proteína de unión a TGF-β latente.

3.2.2. TNF α

El TNF α es una citocina secretada por tipos celulares diversos y mediadora de múltiples procesos biológicos. Se implica en la inflamación, la apoptosis, el metabolismo, la trombosis y la fibrinólisis (128). Regula positivamente mediadores proinflamatorios muy significativos, como la IL1 β o la IL-6 (129), y amplifica las secuencias tempranas de la cascada inflamatoria al activar macrófagos, aumentar la respuesta de células T, promover la formación de edema y la adhesión al endotelio, y favorecer el reclutamiento de neutrófilos (130, 131).

El TNF y el TL1A (ligando 1A similar al TNF) son mediadores conocidos de la inflamación intestinal. También se implican en el desarrollo de fibrosis intestinal, indirectamente al promover la inflamación o directamente estimulando las células mesenquimales. El TNF aumenta la producción de colágeno I y IV por parte de los miofibroblastos intestinales y regula positivamente la expresión de TGF- β y el inhibidor tisular de las metaloproteinasas de matriz 1 (TIMP1) en las células epiteliales del colon. Por el contrario, la inhibición del TNF tiene propiedades antiinflamatorias en la EC y la CU y puede disminuir la producción de colágeno y reducir la fibrosis intestinal experimental. Sin embargo, clínicamente, los anticuerpos anti-TNF no previenen las estenosis de la EC (105).

El TNF α media su efecto a través de dos receptores: TNF-R1 (p55 o p60), que se expresa en todos los tipos celulares, y TNF-R2 (p75 o p80), presente en células endoteliales e inmunitarias (132). TNF-R1 tiene un papel más amplio en la activación de NF- κ B mientras que TNF-R2 colabora (a concentraciones bajas de TNF α) capturando la citocina y transfiriéndola a TNF-R1 (133) (**Figura 9**). En casi todos los tipos celulares, la exposición al TNF α activa el NF- κ B, un factor central en la inflamación que aumenta la expresión de citocinas, enzimas y moléculas de adhesión (134).

El factor NF- κ B está compuesto por cinco subunidades distintas: p50 (NF- κ B1), p52 (NF- κ B2), c-Rel (Rel), p65 (RelA) y RelB (135). Estas subunidades forman varios complejos homodiméricos y heterodiméricos, y cada combinación de subunidades tiene una función de señalización específica (136). Dichas subunidades se encuentran transcripcionalmente inactivas cuando están formando complejos con proteínas citoplasmáticas de la familia I κ B (inhibidor del NF- κ B), siendo I κ B α el miembro prototípico de la familia I κ B, cuyo objetivo principal es la retención citoplasmática de los dímeros p65:p50 (135). Su degradación por el proteasoma libera el NF- κ B, que se trasloca al núcleo y actúa como factor de transcripción.

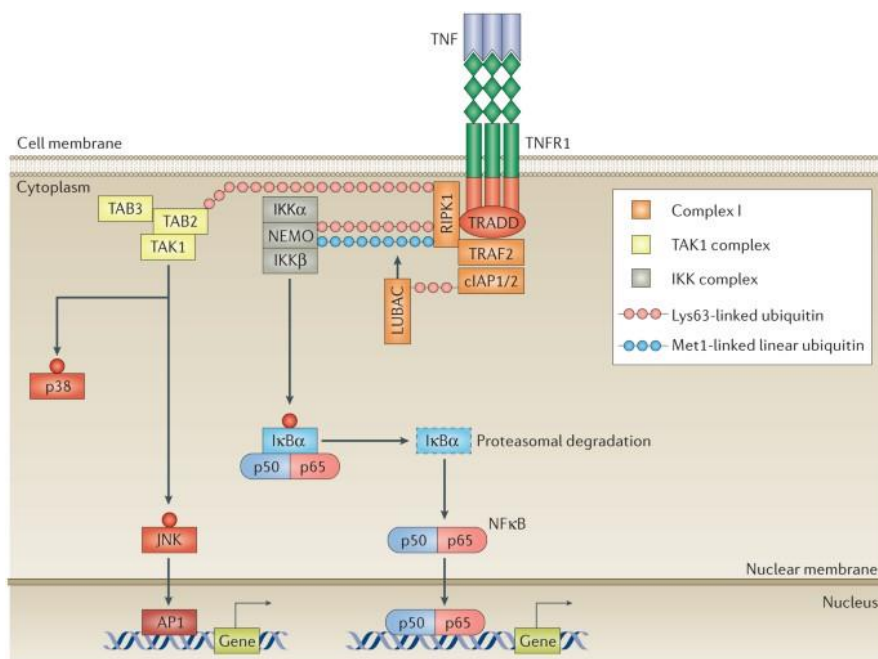


Figura 9. Señalización del complejo I del TNFR (134). La unión del TNF homotrimérico a los receptores homotriméricos del TNF (TNFR) induce la formación del complejo I (TRADD + RIPK1 + TRAF2 + cIAP1 + LUBAC) y el reclutamiento de los complejos TAK1 (quinasa 1 activada por TGF- β) e IKK (inhibidor de la quinasa κ B, I κ B). TAK1 activa p38 y JUN N-terminal kinase (JNK), lo que conduce a la transcripción de genes diana de AP1. IKK β fosforila I κ B, lo que induce su degradación proteasomal y la liberación del factor nuclear κ B (NF- κ B). El NF- κ B libre se transloca al núcleo, donde induce la expresión de genes diana. NEMO, modulador esencial de NF κ B; TAB, proteína de unión a TAK1.

4. Procesos celulares con potencial patogénico en la enfermedad de Crohn

4.1. Interacciones leucocito-endotelio

Una de las primeras fases del proceso inflamatorio consiste en la interacción entre las moléculas de adhesión del endotelio vascular y los ligandos existentes en las células leucocitarias que circulan por el torrente sanguíneo (137, 138). De hecho, el tráfico de células inmunitarias intestinales se ha identificado como un evento central en la patogénesis de EII (139). Mediante el cambio de propiedades adhesivas, las células del endotelio vascular serán las encargadas de regular el tránsito leucocitario al foco inflamatorio, principalmente de neutrófilos y monocitos (138, 140, 141). Esta interacción entre leucocitos y CE está mediada a través de una cascada secuencial de reacciones reversibles y transitorias entre ambos tipos celulares en la que se distinguen tres fases: rodamiento, adhesión y migración leucocitarias (**Figura 10**) (140, 142). Tales interacciones están mediadas por las selectinas e integrinas leucocitarias ([sección 5.2.1](#)) y sus correspondientes ligandos en las CE (selectinas e inmunoglobulinas, respectivamente) (**Tabla 3**). La mayoría de estas moléculas de adhesión tienen una expresión constitutiva, pero su expresión y activación en la superficie endotelial puede ser estimulada mediante citocinas o estímulos proinflamatorios que se generan tras el daño tisular (143).

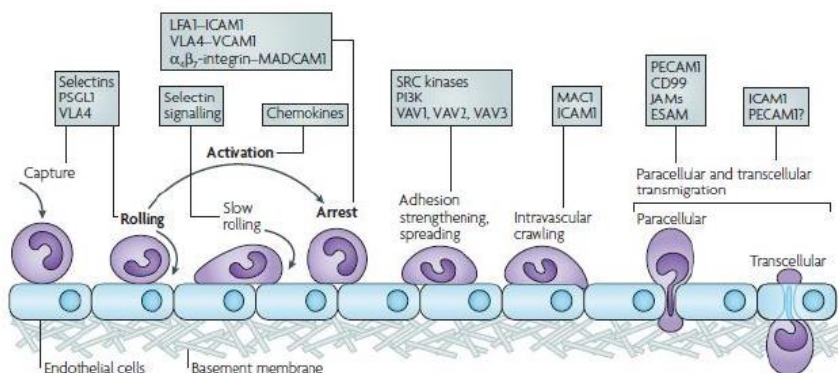


Figura 10. Etapas de la cascada de adhesión leucocitaria en el endotelio vascular (142). Un estímulo proinflamatorio puede impulsar la activación de los leucocitos y/o células endoteliales y aumentar la expresión de moléculas de adhesión. Consecuentemente, se inicia un proceso secuencial de interacción entre ambos tipos celulares que empieza con la ralentización de la velocidad de los leucocitos mediada por las selectinas leucocitarias (L-selectina) y endoteliales (E-selectina y P-selectina). La fase de rodamiento también está mediada por la unión de las integrinas $\alpha 4$ (VLA-4 y $\alpha 4\beta 7$) y $\beta 2$ (LFA-1) leucocitarias a las inmunoglobulinas VCAM-1 e ICAM-1 endoteliales, respectivamente. Si el estímulo continúa, las integrinas leucocitarias sufren un cambio conformacional que aumenta su afinidad por sus ligandos endoteliales y se produce la adhesión leucocitaria estable mediada por las interacciones LFA-1/ICAM-1 y Mac-1/ICAM-1. Por último, con el paso de los leucocitos a través de las uniones del endotelio y de la membrana basal perivascular, se activa una cascada de señalización que dará lugar a la migración leucocitaria a través de la MEC, mediante el resto de integrinas $\beta 1$ y las integrinas $\beta 3$, para dirigirse hacia el foco de la inflamación. ESAM, molécula de adhesión selectiva de célula endotelial; ICAM, moléculas de adhesión intracelular; JAMs, moléculas de adhesión de unión; LFA-1, antagonista del antígeno 1 asociado con la función de los linfocitos; Mac-1, moléculas de adhesión celular 1; PECAM-1, moléculas de adhesión entre plaquetas-células endoteliales 1; PI3K, fosfatidilinositol- 3-kinasa; PSGL-1, ligando 1 de la glicoproteína P-selectina; VAV, proteínas VAV; VCAM-1, moléculas de adhesión celular vascular; VLA-4, antígenos de activación tardía 4.

Tabla 3. Principales moléculas de adhesión implicadas en la interacción leucocito-endotelio.

MOLECÚLAS DE ADHESIÓN				
Familia	Molécula	Células	Ligandos	Función
<u>Integrinas $\beta 1$</u>	VLA - 4 ($\alpha 4\beta 1$, CD49/CD29)	Monocitos y linfocitos	VCAM-1	Rodamiento
<u>Integrinas $\beta 2$</u>	LFA - 1 ($\alpha L\beta 2$, CD11a/CD18)	Mayoría de los leucocitos	ICAM-1, ICAM-2	Rodamiento y adhesión
	Mac - 1 ($\alpha M\beta 2$, CD11b/CD18)	Neutrófilos y monocitos	ICAM-1, ICAM-2	Adhesión firme
	CR4 ($\alpha X\beta 2$, CD11c/CD18)	Monocitos, linfocitos, eosinófilos y CD	ICAM-1, VCAM-1, fibrinógeno	Adhesión
<u>Selectinas</u>	E - Selectina (CD62E)	Cél. endoteliales activadas	L-selectina, PSGL-1, CD44, ESL-1	Captura y rodamiento
	P - Selectina (CD62P)	Plaquetas y cél. endoteliales activadas		
	L - Selectina (CD62L)	Leucocitos activados	E-selectina, PSGL-1	
<u>Inmunoglobulinas</u>	ICAM - 1 (CD54)	Cél. endoteliales y algunos leucocitos	LFA-1, Mac- 1, CR4	Rodamiento y adhesión firme
	ICAM - 2 (CD102)	Cél. endoteliales y plaquetas	LFA-1, Mac- 1	
	VCAM - 1 (CD106)	Cél. endoteliales y cél. musculares lisas	VLA-4	Rodamiento
	PECAM - 1 (CD31)	Cél. endoteliales, plaquetas y leucocitos	$\alpha v\beta 3$ (en plaquetas)	Migración

CD, células dendríticas; CR4, complemento del receptor 4; ESL-1, ligando 1 de la E-selectina; ICAM, moléculas de adhesión intracelular; LFA-1, antagonista del antígeno 1 asociado con la función de los linfocitos; Mac-1, moléculas de adhesión celular 1; PECAM-1, moléculas de adhesión entre plaquetas-células endoteliales 1; PSGL-1, ligando 1 de la glicoproteína P-

selectina; VCAM-1, moléculas de adhesión celular vascular; VLA-4, antígenos de activación tardía 4.

4.2. Procesos de transición celular: EMT, EndoMT

Como se ha dicho anteriormente, las células epiteliales pueden sufrir un proceso de transdiferenciación, llamado transición epitelial-mesenquimal (EMT, *Epithelial to Mesenchymal Transition*, **Figura 11**), que se implica en el mecanismo de cicatrización de heridas, pero que en condiciones patológicas contribuye al progreso de la fibrosis (144). El fenotipo mesenquimal adquirido consiste en el cambio hacia una morfología alargada (similar a la de los fibroblastos), la pérdida de sus marcadores clásicos y la adquisición de marcadores de miofibroblastos (α -SMA, vimentina, FSP1, fibronectina y colágenos) (103). También pierden la polaridad celular, tienen una mayor capacidad migratoria y, consecuentemente, invasiva y sufren una disminución en la expresión de moléculas de adhesión (E-cadherina), uniones estrechas (claudinas y ocludinas) y componentes del citoesqueleto. En este proceso se implican varias familias de factores de transcripción (Twist, Snail (145), Slug, Zeb1/2 (103, 146) y las vías de señalización TGF- β /Smad ([sección 3.2.](#)), Wnt, Notch ([sección 5.1.](#)) y Hedgehog (145). Algunas de estas características también se observan en las células de transición o fibroblastos transicionales (derivados de las células epiteliales), que recubren el trayecto de la fístula (147). Todo ello sugiere la contribución del proceso de EMT a las principales alteraciones estructurales que se observan en la EC complicada (103).

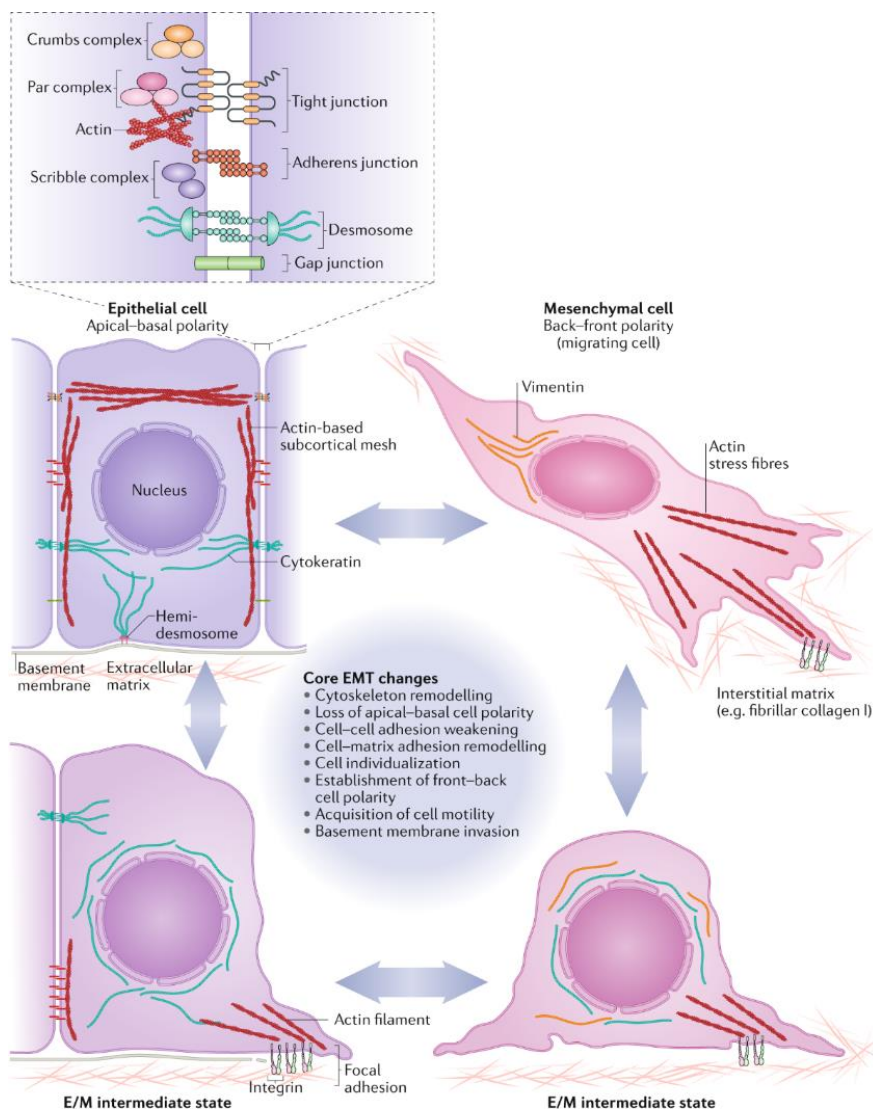


Figura 11. Características celulares y estados intermedios en la transición epitelial-mesénquimal (EMT) (148). Las características celulares asociadas con un estado de célula epitelial o mesénquimal se pueden encontrar en diferentes grados y combinaciones en función del contexto. Las **células epiteliales** están conectadas por uniones adherentes (conectadas a haces de actina cortical), desmosomas (vinculados con filamentos intermedios de citoqueratina), uniones gap y uniones estrechas (en los puntos de contacto apical-laterales para ayudar a mantener la polaridad epitelial). La organización adecuada de estas uniones depende de la polaridad apical-basal (definida por los dominios apical versus basolateral). Las células epiteliales están unidas a la membrana basal subyacente a través de hemidesmosomas formados por integrinas. Por el contrario, las **células mesénquimales** no contienen uniones epiteliales funcionales y presentan una polaridad anterior-posterior en sus fibras de tensión

de actina. Las células mesenquimales contienen filamentos intermedios basados en vimentina y utilizan adherencias focales que contienen integrina para unirse a la matriz extracelular. La pérdida o ganancia acumulada de características epiteliales/mesenquimales (E/M) empuja a una célula hacia varios estados intermedios (abajo a la izquierda y derecha) de manera fluida y reversible, entre un estado epitelial completo (centro a la izquierda) y un estado mesenquimal completo (centro a la derecha). EMT, transición epitelial-mesenquimal.

En el caso de las CE ocurre un proceso similar, llamado transición endotelial-mesenquimal (EndoMT, *Endothelial to Mesenchymal Transition*, **Figura 12**) (144). Este proceso se activa como consecuencia de condiciones inflamatorias persistentes y conlleva la diferenciación de las CE en células fusiformes (149). Originalmente, este fenómeno se describió como un proceso asociado al desarrollo embrionario e implicado en la correcta formación de válvulas y septos cardíacos (150). Posteriormente se identificó en entornos patológicos como la fibrosis cardíaca y renal (151, 152) o el cáncer (153). Los cambios fenotípicos que se asocian con la EndoMT consisten en la adquisición de una morfología de huso, reducción en la expresión génica de marcadores endoteliales (CD31, VE-cadherina, vWF), la disminución de la expresión de componentes de las membranas basales (colágeno IV, entactina) y la regulación al alza de marcadores mesenquimales (colágeno I y fibronectina) (103, 153, 154). La EndoMT y EMT comparten varios agentes inductores / mediadores. Cabe destacar entre ellos el TGF- β , en especial el TGF- β 2 (124), los factores de transcripción Snail1/2 (155-158) y las vías de señalización Wnt y Notch ([sección 5.1.](#)) (154, 159). Además, son promotores de EndoMT la hipoxia, la endotelina-1 (103, 154, 158) o los factores de crecimiento VEGF-A y FGF (124, 145, 154). La posible implicación de este proceso en la EII se deduce de la colocalización de vWF y α -SMA detectada en áreas de la microvasculatura mucosa cercana a los infiltrados inflamatorios en tejidos colónicos afectados (149).

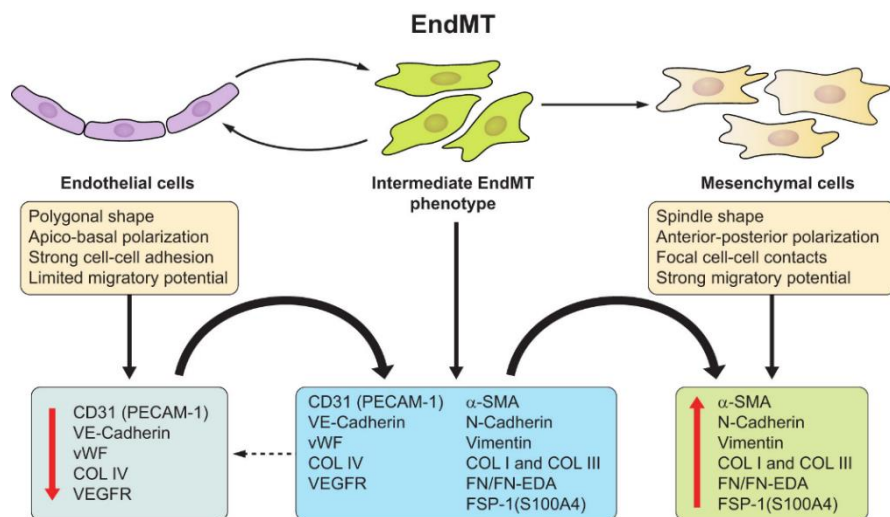


Figura 12. Proceso de transición endotelial-mesenquimal (EndoMT) (154). El diagrama ilustra los cambios morfológicos, fenotípicos y transcripcionales que ocurren durante el proceso de transición de células endoteliales a mesenquimales. La conversión fenotípica de células endoteliales en miofibroblastos activados conlleva mayor producción de varias macromoléculas específicas del mesénquima, entre ellas α -SMA (actina de músculo liso α), COL1 (colágeno 1), COL3 (colágeno 3), FN/EDA (fibronectina/dominio extra A de FN), vimentina, N-cadherina y FSP-1 (proteína 1 específica de fibroblastos). Estos eventos están acompañados por la pérdida marcadores específicos de las células endoteliales, como CD31/PECAM-1, VE-cadherina (cadherina vascular-endotelial), COL4 (colágeno 4), VEGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico vascular) y vWF (factor von Willebrand).

5. Vías de señalización con potencial patogénico en la EC

5.1. Ruta Notch

La familia Notch conforma una vía de señalización intercelular conservada evolutivamente que regula las interacciones entre células físicamente adyacentes. Los receptores Notch son polipéptidos transmembrana sintetizados en el retículo endoplásmico y transportados a la superficie celular a través de la red trans-Golgi (160). En mamíferos, existen cinco ligandos, DLL1 (*Delta-like 1*), DLL3 (*Delta-like 3*), DLL4 (*Delta-like 4*), JAG1 (*Jagged-1*) y JAG2 (*Jagged-2*), para los cuatro receptores Notch (Notch-1, Notch-2, Notch-3 y Notch-4) (161, 162). Una vez activados por sus ligandos, los receptores Notch experimentan tres

escisiones que liberan el dominio intracelular (NICD). Éste se traslada al núcleo y regula la transcripción de los genes diana mediante la unión a un factor de transcripción llamado CSL (*CBF1/Suppressor of hair-less/Lag1* (**Figura 13**).

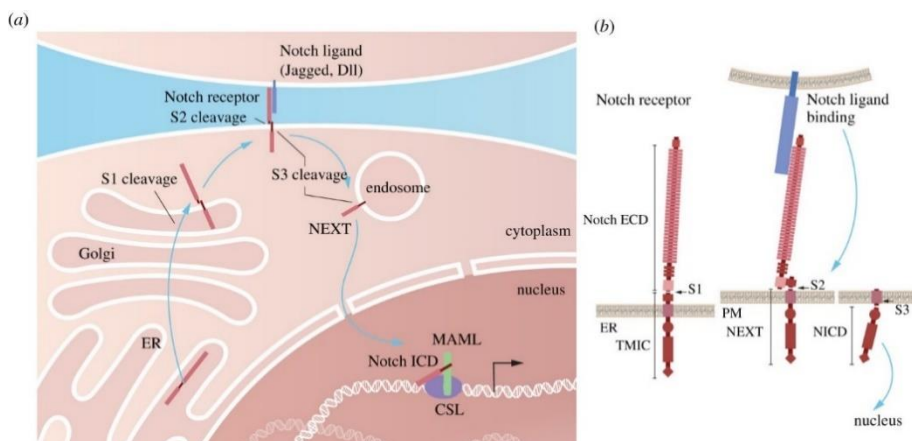


Figura 13. Vía de señalización Notch (163). (a) Representación esquemática de los pasos principales en señalización Notch en la célula. El receptor Notch se produce en el retículo endoplasmático (RE) y la primera escisión proteolítica (S1) tiene lugar en el compartimento de Golgi. Después de la interacción del ligando en la superficie celular, se produce la escisión S2. El receptor Notch sufre posteriormente una escisión S3, en la superficie celular o con frecuencia en el endosoma, y el dominio intracelular (ICD) resultante se transporta al núcleo, donde se convierte en parte del complejo transcripcional ternario ICD/CSL/MAML, que regula la activación génica posterior. (b) Presentación esquemática de los pasos de procesamiento proteolítico para el receptor Notch. El receptor Notch sufre una escisión S1 en el dominio de heterodimerización (HD). La escisión S1 genera el dominio extracelular (ECD) y las fracciones de fragmento transmembrana/intracelular (TMIC). El ECD se libera en el espacio extracelular o es absorbido por la célula presentadora del ligando, mientras que la fracción TMIC se escinde mediante la escisión S2 para formar el dominio truncado extracelular de Notch (NEXT). Finalmente, la escisión S3 en la membrana libera el ICD (NICD), que se transporta al núcleo. PM, membrana plasmática.

Fisiológicamente, la señalización Notch es esencial para la diferenciación, desarrollo y homeostasis del epitelio intestinal. Esta determina una decisión de destino clave que divide a los progenitores en aquellos destinados a tipos de células absorbentes y otros destinados a tipos de células secretoras.

Las células progenitoras, que pierden aleatoriamente la exposición a los ligandos Notch presentes en las células de Paneth, regulan positivamente sus propios ligandos Notch, DLL1 y DLL4. Quedan entonces destinadas al linaje secretor y pueden apoyar individualmente la actividad Notch en seis a ocho células vecinas que luego se diferencian en enterocitos. Este proceso, conocido como inhibición lateral, permite la generación de una proporción fija de células secretoras por cada población mucho mayor de enterocitos. (164). Por otro lado, la vía de señalización Notch es uno de los principales reguladores de la biología endotelial regulando diferentes pasos durante la génesis y remodelación de los vasos sanguíneos (vasculogénesis y angiogénesis), incluidos los roles críticos en la asignación de identidades arteriales y venosas a los vasos sanguíneos emergentes y la regulación de su ramificación (163). Sin embargo, los resultados de la señalización de Notch dependen en gran medida del contexto celular y tisular, así como del estado fisiológico o patológico (161).

Diversos estudios han detectado la intervención de la ruta Notch en alteraciones de la barrera intestinal y la reacción inflamatoria / inmunitaria asociadas a la EII (162, 165). Por otro lado, esta vía señalizadora se ha implicado en la fibrosis de diversos órganos (166-168), y lo mismo ocurre en enfermedades vasculares (163) y en las alteraciones vasculares asociadas a enfermedades con un componente fibrótico importante como el infarto de miocardio (168) o la enfermedad hepática crónica (166). Sin embargo, no existen estudios que analicen el papel de vía Notch en las alteraciones vasculares y fibróticas asociadas a la EII.

5.2. Matriz extracelular

La matriz extracelular (MEC) es fundamental en el funcionamiento fisiológico de los tejidos. Proporciona un soporte mecánico y un entorno óptimo para las funciones celulares normales actuando como medio de comunicación entre las células. Las células se comunican con la MEC y las células vecinas a

través de las moléculas de la superficie celular y el esqueleto intracelular, y ello ejerce un papel regulador de los procesos de diferenciación, motilidad, orientación, proliferación y supervivencia celular (169). Sin embargo, en condiciones patológicas, la MEC ejerce un papel activo afectando la morfología y las funciones de las células inmersas en ella y provoca así un efecto de amplificación que potencia el proceso de deposición de MEC y perpetúa la fibrosis (170).

Los efectos de la MEC sobre las células están mediados en gran medida por el proceso de mecanotransducción, que se define como el proceso por el cual las células detectan estímulos mecánicos y los traducen en señales bioquímicas. Este mecanismo está esencialmente mediado por la miosina, proteína motora que ejerce fuerzas sobre los filamentos de actina anclados a las adherencias célula-célula o célula-matriz o sobre los mecanosensores. Como mecanosensores se han descrito las integrinas ([sección 5.2.1.](#)), los canales piezoeléctricos, la proteína asociada a Yes (YAP) / coactivador transcripcional con motivo de unión a PDZ (TAZ) y el receptor de potencial transitorio vanilloide 4 (TRPV4) (**Figura 14**) (170).

El efecto de la MEC sobre las células depende por tanto de sus propiedades mecánicas, que a su vez dependen de las modificaciones postransduccionales de sus componentes, esencialmente, la glicación no enzimática y la reticulación del colágeno por parte de transglutaminasas (TGasa) y lisiloxidasas (LOX). Estos procesos se dan en mayor medida en el tejido fibrótico, de manera que, a la deposición excesiva de fibrillas se une un aumento en su reticulación, lo que aporta rigidez a la MEC. Los mecanosensores de las células locales responden a esta fuerza activando mecanismos fibrogénicos y, de esta forma, las características mecánicas de los microambientes fibróticos son a la vez resultado y causa de la progresión de la fibrosis (**Figura 14**) (171). Como caso particular de las células afectadas por las características de la MEC, cabría referirse a las

células endoteliales. De hecho, las adherencias entre estas células y la matriz regulan la función endotelial en la fase de desarrollo orgánico y también en los lechos vasculares maduros. Además, influye en la función de barrera endotelial en condiciones patofisiológicas que conllevan angiogénesis, inflamación o estrés hemodinámico ([172](#)).

Por otro lado, los componentes de la MEC también pueden modular la función celular a través de receptores convencionales. Es el caso del colágeno, la proteína más abundante en la MEC, que puede activar los receptores del dominio discoidina (DDR1 y DDR2) de tipo tirosin quinasa ([sección 5.2.2.](#)).

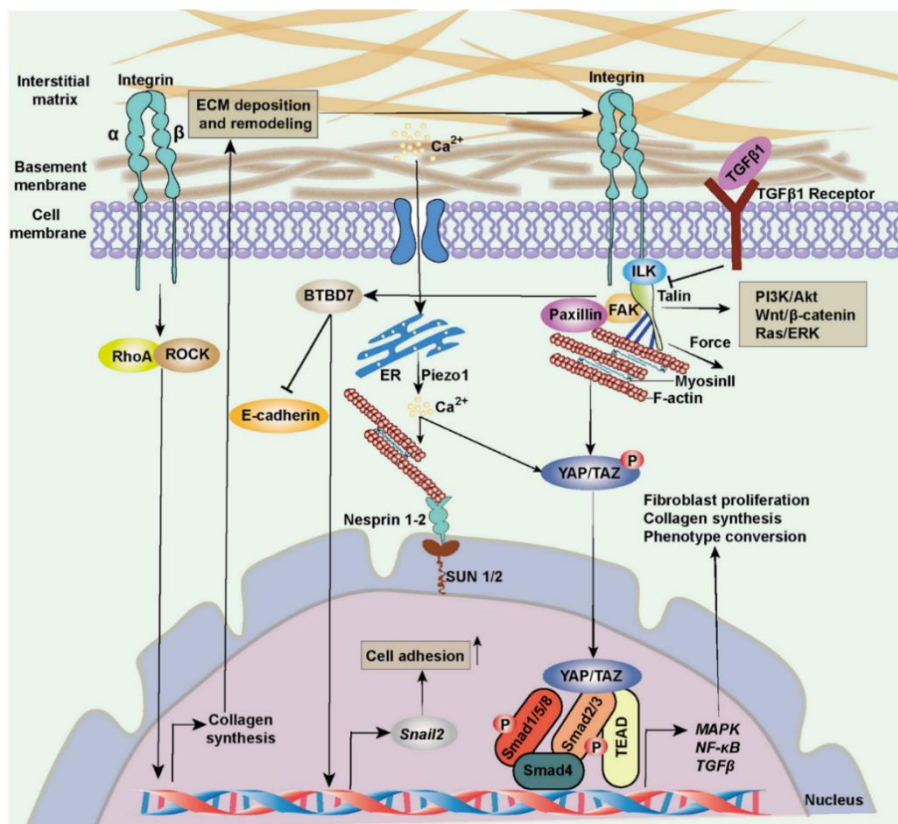


Figura 14. Mecanotransducción celular en respuesta a la rigidez de la MEC (170). Las integrinas transmiten señales mecánicas y bioquímicas desde la MEC a las células y facilitan los procesos de proliferación, diferenciación, migración e invasión celulares. La vía RhoA/ROCK promueve la acumulación de colágeno y fibronectina. El complejo Talin/FAK facilita el ensamblaje de F-actina para promover la transducción de señales. La actina se conecta con la miosina II y transmite las señales mecánicas al núcleo. YAP/TAZ se transloca al núcleo para promover la transcripción de genes, la síntesis de colágeno y la diferenciación celular. ECM, matriz extracelular; RE, retículo endoplásmico; ERK, quinasa relacionada con la señal extracelular; FAK, quinasa de adhesión focal; ILK, quinasa ligada a integrina; P, fosfato; TGFβ, factor de crecimiento transformante β.

5.2.1. Integrinas

Las integrinas son proteínas transmembrana que median la adhesión celular, sirven como enlaces entre la MEC y el citoesqueleto, y transmiten señales bioquímicas y mecánicas entre diferentes células y entre las células y la matriz

que las envuelve. En los mamíferos, hay un total de 24 pares diferentes de integrinas heterodímeras que comprenden 18 subunidades α y 8 subunidades β (Figura 15.173).

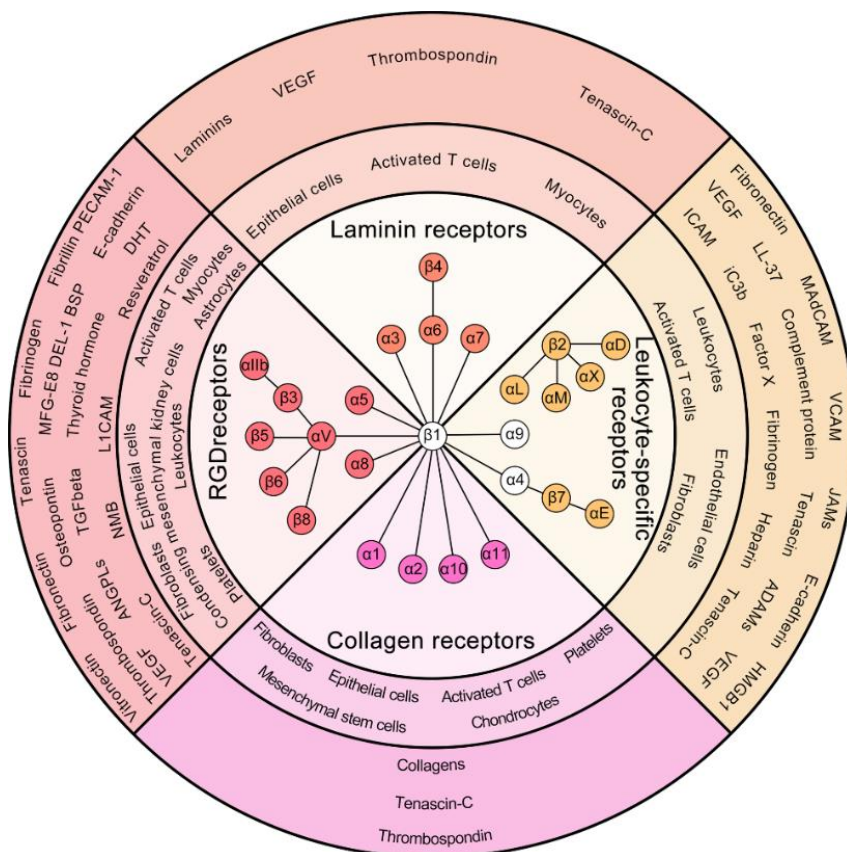


Figura 15. Clasificación, distribución y ligandos de las integrinas (173). El anillo interior muestra las 24 integrinas divididas en cuatro categorías según su distribución, especificidad de ligando y funciones.

La función de las integrinas se regula por interacciones proteína-proteína, cambios conformacionales y tráfico proteico. Estos procesos se desencadenan a través de señales "de adentro hacia afuera", que comienzan con la interacción de proteínas intracelulares con la cola citoplasmática de la integrina β y resultan en la activación de la integrina, y "de afuera hacia adentro", que se activan por la unión a ligandos de la matriz extracelular y provocan el reclutamiento de

complejos de adhesión y la vinculación de la subunidad β con las proteínas del citoesqueleto. Todo ello activa rutas bioquímicas y mecánicas de señalización (Figura 16) (173).

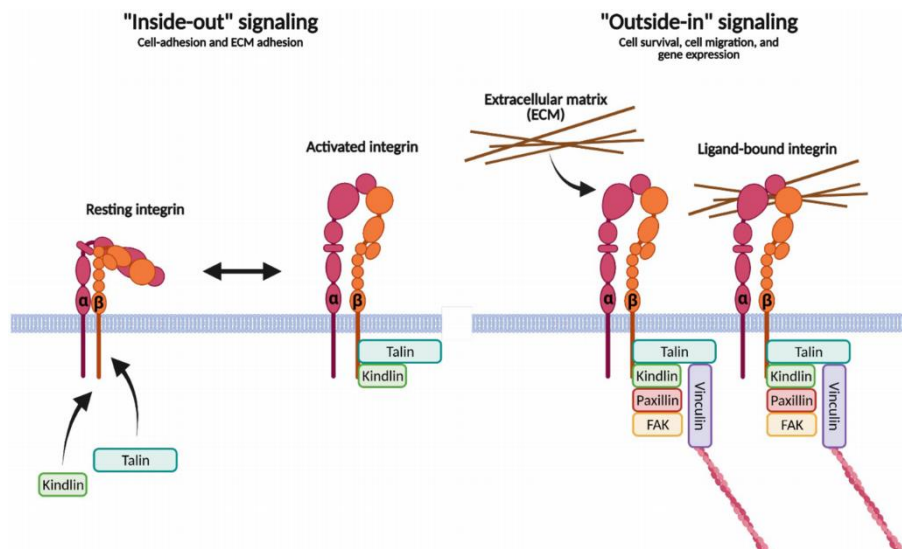


Figura 16. Representación esquemática simplificada de la señalización bidireccional mediada por integrinas (174). En la señalización “de adentro hacia afuera”, las proteínas adaptadoras talina y kindlina se unen a la subunidad β de la integrina en reposo. Como resultado, tanto la subunidad α como la β se despliegan y se unen a varios ligandos de la matriz extracelular. En la señalización “de afuera hacia adentro”, las moléculas de la matriz extracelular se unen a las integrinas que median la señal a través del complejo de adhesión focal y los filamentos de actina del citoesqueleto.

De entre las diferentes familias de integrinas descritas, resultan relevantes para el presente estudio las mediadoras de las interacciones leucocito-endotelio (sección 4.1.) y las que actúan como receptores de colágeno, que se estudian a continuación.

Las integrinas pueden unirse al colágeno interactuando con el motivo GFOGER en la triple hélice del colágeno I a través de su dominio α I. De las 18 subunidades α , sólo nueve contienen este dominio, y de entre ellas, se reconocen como receptores de colágeno las integrinas α 1 β 1, α 2 β 1, α 10 β 1 y

$\alpha 11\beta 1$. El estudio evolutivo de las mismas indica que las cuatro tienen una edad similar y que sus ortólogos están ausentes en los invertebrados, y aparecen por primera vez en organismos con endoesqueletos y tejidos intersticiales (175). Las integrinas $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ han sido recientemente calificadas como “receptores de colágeno generalistas” dada su amplia expresión y amplia variedad de funciones en tipos celulares diversos. De entre todos ellos, cabe resaltar su implicación en el proceso de angiogénesis y en el desarrollo de fibrosis (176), en los que en ocasiones muestran roles opuestos (176). Las integrinas mesenquimales $\alpha 10\beta 1$ y $\alpha 11\beta 1$, por otra parte, se expresan en condiciones no patológicas en células del estroma donde interactúan con colágenos fibrilares en matrices intersticiales (177). La integrina $\alpha 10\beta 1$ se expresa ampliamente en los tejidos cartilaginosos, donde parece jugar un papel clave de las interacciones célula-matriz necesarias para el desarrollo adecuado del cartílago y el esqueleto (178). La integrina $\alpha 11\beta 1$ es la última incorporación a esta familia y se ha caracterizado como un receptor de colágenos fibrilares involucrado en la migración celular, la proliferación celular y la reorganización del colágeno. En el desarrollo tisular normal y la homeostasis tisular adulta, $\alpha 11\beta 1$ está restringida a las células madre mesenquimales y a subconjuntos de fibroblastos. Se ha descrito su implicación en la remodelación del colágeno y la diferenciación de miofibroblastos. Parece, por tanto, importante en la cicatrización de heridas y, en el contexto patológico, se ha implicado en la fibrosis de algunos tejidos y de tumores diversos (179).

Cada una de estas integrinas muestra un patrón particular de afinidad por los diferentes colágenos. La **Tabla 4** resume estos datos y reseña de forma más explícita su perfil de expresión y las principales funciones asignadas a cada receptor. No existen antecedentes de su implicación en las manifestaciones patológicas de la EII.

Tabla 4. Principales características de las integrinas receptoras de colágeno
(173, 174, 176, 179-184).

Receptores de colágeno			
	Ligandos	Detectados en:	Funciones en las que se implican
$\alpha 1\beta 1$	Colágenos (I, II, III, IV, V, IX, XIII, XVI y XVIII) Lamininas Galectinas	Cel. endoteliales Fibroblastos Pericitos Cel. mesangiales CM mesenquimales de la médula ósea Cel. Estrelladas Condrocitos Cel. neuronales Linfocitos T Cel. NK Macrófagos Cel. músculo liso Cel. de Schwann	Activación de células T Integridad ósea Síntesis y remodelado de la MEC Angiogénesis, crecimiento y metástasis tumoral
$\alpha 2\beta 1$	Colágenos (I, II, III, IV, V, XI, XVI y XXIII) Lamininas Tenascina C Decorina Lumicano Perlecano	Cel. epiteliales Queratinocitos Cel. endoteliales Plaquetas Megacariocitos Cel. mieloides Linfocitos T Fibroblastos	Estabilización del trombo Fibrosis Angiogénesis
$\alpha 10\beta 1$	Colágenos (I, II, IV y VI)	Condrocitos CM mesenquimales condrogénicas Cel. del endostio Cel. del periostio	Producción de cartílago Desarrollo esquelético Migración celular del melanoma
$\alpha 11\beta 1$	Colágenos (I, IV, V, IX)	Fibroblastos CM mesenquimales	Erupción dental Cicatrización de heridas Fibrosis Cáncer

CM, células madre; Cdc42, proteína “*Cell Division Cycle 42*”; CXCL5, ligando 5 de la quimiocina CXC; EMT, transición epitelial-mesenquimal; MMP, metaloproteinasas de matriz; ROS, especies reactivas de oxígeno.

5.2.2. Receptores del dominio discoidina (DDRs, *Discoidin Domain Receptors*)

Los receptores del dominio discoidina (DDR1 y DDR2) son una subfamilia de receptores de tipo tirosin quinasa (RTKs) que median la señalización iniciada por

colágeno en muchos procesos celulares y tisulares. Los principales agonistas son los colágenos I, II y III, aunque también pueden actuar como tales los de tipo IV y VII (DDR1), y el colágeno X (DDR2) (183). Los DDR se encargan de funciones pleiotrópicas durante el desarrollo embrionario, así como en tejidos adultos y en diversas enfermedades humanas, incluido el cáncer (185). Así, el DDR1 está relacionado con trastornos fibróticos, y su inhibición reduce la inflamación, el infiltrado macrofágico y la fibrosis en modelos de aterosclerosis (186, 187), fibrosis renal y pulmonar (188, 189). Parte de sus efectos pueden deberse a su capacidad de activar las integrinas receptoras del colágeno (182), lo que establece una conexión entre ambos tipos de señalización.

5.3. Vía succinato - SUCNR1

El succinato es un ácido dicarboxílico que interviene en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y es la forma desprotonada aniónica del ácido succínico (190, 191). En condiciones fisiológicas, se produce en las mitocondrias y es catalizado a fumarato a través de la acción de la succinato deshidrogenasa (SDH) (**Figura 17**). Esta enzima también está implicada en la cadena de transporte de electrones de la membrana mitocondrial (complejo II) y, por tanto, su actividad depende indirectamente de la disponibilidad de oxígeno y las situaciones en las que la pO₂ es baja conllevan acumulación de succinato. Esta acumulación también puede ser consecuencia de la alteración del sentido de flujo del TCA hacia un ciclo alternativo parcialmente invertido. Además, puede formarse succinato de forma no enzimática en condiciones de estrés oxidativo, en las que se genera α -cetoglutarato mediante un proceso de transaminación (191, 192). El succinato acumulado por cualquiera de estas vías puede salir de la matriz mitocondrial al citosol mediante transportadores de ácidos dicarboxílicos localizados en la membrana mitocondrial interna (193) y, posteriormente, a través de porinas para atravesar la membrana mitocondrial exterior (194). Finalmente, el succinato pasa al torrente sanguíneo mediante un intercambiador de aniones independiente de sodio capaz de intercambiar ácidos dicarboxílicos

y citrato a través de la membrana celular (191, 192). Una vez, secretado al medio extracelular el succinato puede unirse específicamente al receptor GPR91 y provocar su activación (195-197).

El receptor GPR91, también conocido como SUCNR1 (*Succinate Receptor 1*), es un receptor acoplado a proteína G identificado en 2004 (191, 198). Está presente en tipos celulares diversos (células estrelladas hepáticas (199), megacariocitos y plaquetas (200), adipocitos blancos (201), CE (202), macrófagos y células dendríticas inmaduras (191) entre otras), en los que puede activar rutas de señalización distintas en función de la proteína G predominante en cada caso (Figura 18).

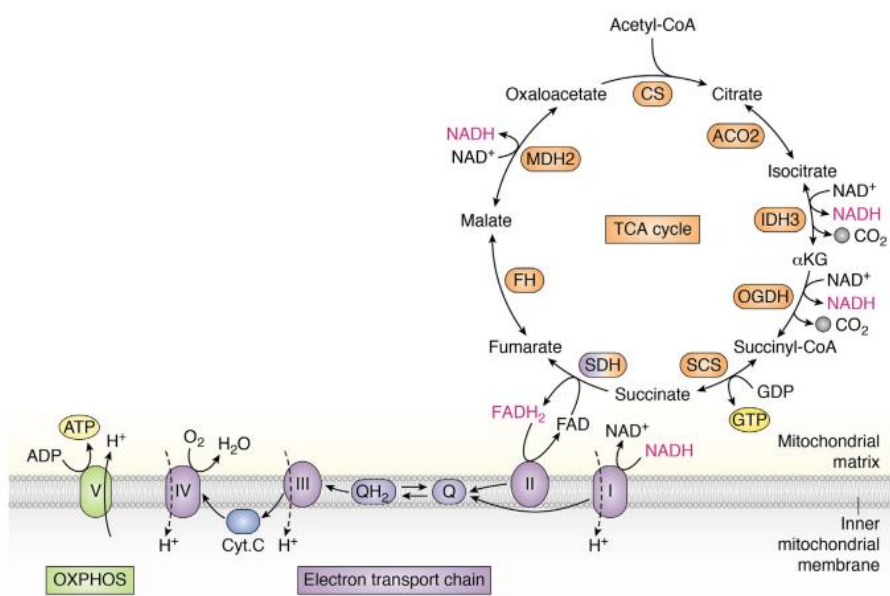


Figura 17. Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y la cadena de transporte de electrones mitocondrial (203).

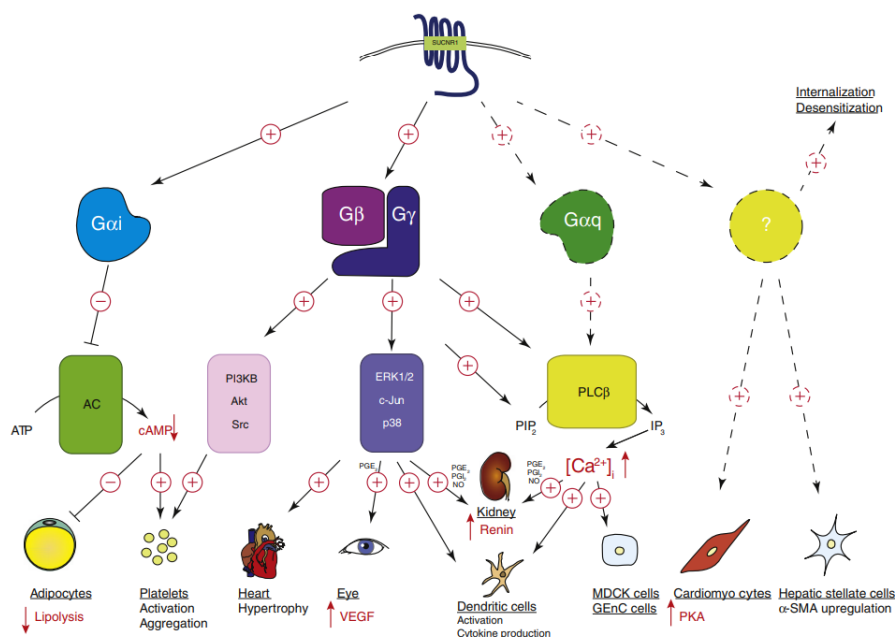


Figura 18. Vías de señalización activadas tras la unión de succinato a GPR91 (204). La activación de GPR91 es específica de tejido y depende de la proteína G acoplada al receptor: a) acoplado con proteínas G α i reduce los niveles de AMPc (tejido adiposo), b) acoplado al dímero $\beta\gamma$ puede activar las vías ERK1/2 ERK1/2-c-JUN-p38 (células dendríticas) o la vía PI3K-Akt-Src (plaquetas), c) con Gq se activa PLC- β y se moviliza calcio intracelular (también en células dendríticas).

El interés por el succinato y su receptor SUCNR1 ha crecido recientemente al describirse su papel como sensor metabólico en la homeostasis y en la respuesta inflamatoria (205). Sus efectos parecen ser mayoritariamente proinflamatorios si bien, en determinados contextos, ha mostrado un carácter antiinflamatorio (206, 207). Los mecanismos moleculares responsables de estos efectos se han descrito sobre todo en macrófagos (193). La activación macrofágica conlleva una reprogramación metabólica que depende del fenotipo macrofágico resultante. Así, en los macrófagos proinflamatorios prevalece la glicólisis, mientras que los antiinflamatorios utilizan esencialmente la fosforilación oxidativa (193, 208). Se ha demostrado que en los macrófagos proinflamatorios activados por la vía LPS/TLR4, el succinato se acumula debido a

la disrupción del TCA. En esta situación, el succinato parece funcionar como señal inflamatoria que alimenta el proceso por, al menos, 3 vías paralelas. En primer lugar, la inhibición de la prolin hidroxilasa (PHD), que estabiliza HIF-1 α e induce la expresión de IL-1 β (196, 209). En segundo lugar, la inducción de ROS mitocondrial por acción de la succinato deshidrogenasa y al aumento en el potencial de la membrana mitocondrial, que se acompañan de síntesis de IL-1 β y promueven el transporte electrónico reverso (RET) (208). Por último, la estimulación del receptor GPR91, que crea un bucle que retroalimenta la producción de IL-1 β dependiente de HIF-1 α (210). Además, el succinato aumenta la expresión de SUCNR1, lo que lo convierte en un sensor autocrino y paracrino impulsor de la producción de IL-1 β (210) (**Figura 19**). Por otro lado, se ha descrito también la capacidad del succinato para aumentar la expresión de TNF α y reducir la de IL-10 en PBMCs (211), de provocar un efecto profibrótico en células estrelladas (212) y de actuar como un factor quimiotáctico para las células dendríticas (213).

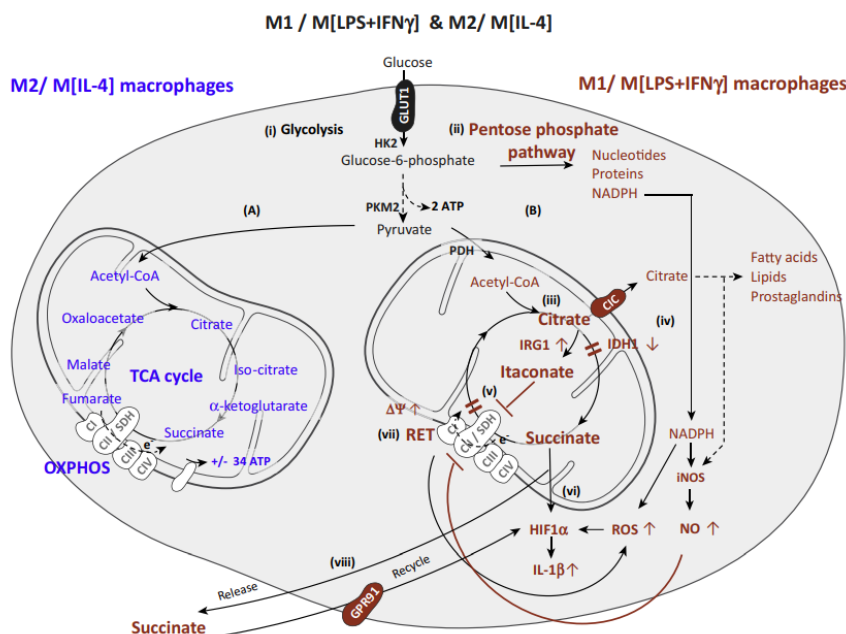


Figura 19. Representación de los tipos de metabolismo en macrófagos M1 (fenotipo proinflamatorio) y en macrófagos M2 (fenotipo antiinflamatorio) (193). **A)** En los macrófagos con un fenotipo antiinflamatorio (inducido por IL-4), el metabolismo de glucosa a través del TCA está intacto, lo que resulta en una producción sostenida de ATP a través de la fosforilación oxidativa (OXPHOS). **B)** En los macrófagos con un fenotipo proinflamatorio (inducido por LPS+IFN γ) se observan (i) tasas glicolíticas elevadas, (ii) un aumento en la vía de las pentosas fosfato que produce NADPH ($\rightarrow$ producción de ROS y NO), y (iii) un TCA alterado ($\rightarrow$ acumulación de citrato y producción de itaconato). Todo ello promueve la acumulación de succinato que, a su vez, puede contribuir a la inflamación a través de tres mecanismos relacionados entre sí: a) estabilización de HIF1 α , b) producción de ROS en la mitocondria y, c) activación de GPR91.

De todo lo expuesto se deduce que el papel final de la vía succinato-SUCNR1 puede depender en gran medida del contexto fisiopatológico. La vía succinato-SUCNR1 parece ejercer un efecto proinflamatorio en la artritis reumatoide (210, 214) y en la diabetes y sus complicaciones renales (197). En cambio, se le asigna un carácter antiinflamatorio en la dermatitis alérgica (215) y en los macrófagos del tejido adiposo (216). En la EII, estudios metabolómicos han demostrado una acumulación de succinato en el tejido inflamado y en las heces de pacientes (194) y ello se asocia con la actividad y gravedad de la

enfermedad en un modelo murino de colitis inducida por DSS (217). En cuanto al receptor GPR91, estudios realizados por nuestro grupo han mostrado su elevación en muestras de pacientes con EII y demostrado su carácter proinflamatorio y profibrótico en diferentes modelos murinos de inflamación y fibrosis intestinal (218, 219). Estos resultados sugieren que la vía de señalización succinato-SUCNR1 presenta potencial como nueva diana farmacológica frente a la EII y conviene, por tanto, profundizar en los mecanismos implicados en los efectos terapéuticos derivados de su inhibición.



OBJETIVOS

El **objetivo general** de esta Tesis Doctoral es identificar mecanismos etiopatogénicos contribuyentes a las alteraciones estructurales asociadas a las complicaciones intestinales de la enfermedad de Crohn.

Los **objetivos específicos** son:

1. Detectar elementos moleculares que puedan estar implicados en el desarrollo de alteraciones vasculares y fibróticas en el intestino de pacientes con EC complicada partiendo del perfil transcriptómico del tejido lesionado.
2. Analizar la relación entre la vía de señalización Notch, los receptores de colágeno y los cambios en los compartimentos mesenquimal, endotelial y epitelial en muestras de resección intestinal de pacientes con EC complicada y en modelos murinos de fibrosis intestinal.
3. Estudiar el papel de la ruta Notch y de la integrina $\alpha 11$ sobre funciones de la célula endotelial que pueden contribuir a la fibrogénesis y la expansión vascular en las lesiones intestinales asociadas a la enfermedad de Crohn.
4. Analizar el patrón de expresión de miARN en muestras de resección intestinal de pacientes con EC complicada y evaluar su asociación con las alteraciones del compartimento vascular.
5. Estudiar la posible interacción entre el miRNA miR-378a-3p, la ruta Notch y los receptores de colágeno en células endoteliales humanas.

6. Analizar la expresión de GPR91 en el compartimento vascular del tejido ileal de pacientes con EC complicada y determinar su papel en el proceso inflamatorio inducido por TNF α .



MATERIAL Y MÉTODOS

1. Muestras humanas

1.1. Resecciones intestinales de pacientes con EC

Se utilizaron muestras ileales procedentes de pacientes con EC del Hospital de Manises (València) (**Tabla 5**). Los criterios para la utilización de dichas muestras fueron: (1) el diagnóstico definitivo de EC (B2 o B3, según la clasificación de Montreal); (2) que fuera la primera cirugía realizada por complicaciones de la EC. En la primera cohorte, las resecciones de cada paciente consistían tanto en muestras de tejido ileal afecto (EC-A), como en muestras de la parte del íleon no afecto y emparejado del mismo paciente (EC-NA). En la segunda cohorte sólo se recogió muestra de la zona afectada. Además, también se obtuvieron resecciones del íleon no afecto de pacientes que fueron intervenidos quirúrgicamente por cáncer de colon derecho (muestras control).

Tabla 5. Características de los pacientes.

Muestras de pacientes	EC		Control	
Cohorte	1	2	1	2
Número de pacientes	14	7	10	9
Edad	20-77	24-77	41-88	37-89
Género	50% H 50% M	57% H 43% M	40% H 60% M	33% H 67% M
Localización (Ileon terminal)	14	6	10	8
Comportamiento				
• B2	6	5		
• B3	8	2		
Medicación concomitante				
• Corticoides	1	1		
• Azatioprina	1	2		
• Terapia biológica				
○ Ustekinumab	4	2		
○ Anti-TNF α	4	1		
○ Vedolizumab	1	2		
• Sin tratamiento	2			
• Desconocido	1			

Las resecciones ileales obtenidas tras la cirugía se recogieron en PBS frío. Tras varios lavados con PBS, se retiraron los restos de tejido adiposo presentes en algunas muestras y se obtuvieron trozos transversales de tejido de aproximadamente 1-5 mm intentando abarcar todas las capas de la pared intestinal. Los trozos destinados al análisis de la expresión génica o proteica se guardaron en criotubos para su congelación en N₂ líquido y almacenamiento a -80°C. Los trozos destinados a estudios histológicos se fijaron en formalina al 5 % para su posterior inclusión en parafina.

1.2. Leucocitos mononucleares de sangre periférica (PBMCs)

Para la extracción de células leucocitarias se utilizó sangre procedente de donantes sanos del Centro de Transfusiones de la Comunidad Valenciana o del

Hospital Clínico Universitario de Valencia recogida en tubos que contienen citrato sódico como anticoagulante (220).

Los leucocitos mononucleares de sangre periférica (PBMC, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) se aislaron por centrifugación en gradiente de densidad. Para ello, la muestra de sangre (15 ml) diluida en PBS sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} (dilución 1:1, temperatura ambiente) se depositó con cuidado sobre 13 ml de Ficoll-Paque™ Plus evitando su mezclado. Tras la centrifugación (258 x g, 40 min sin aceleración ni freno) se recogió la interfase que se forma entre el plasma y el Ficoll-Paque y que contiene los PBMC (**Figura 20**). La preparación resultante se lavó con HBSS (*Hanks Balanced Salt Solution*) y se centrifugó de nuevo (583 x g, 10 min). Las células obtenidas en el sedimento se resuspendieron en medio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 completo (10 % suero fetal bovino inactivado, 1 % penicilina/estreptomicina, 1 % L-glutamina, 1 % piruvato sódico) (220) a una concentración de 1.5×10^6 de células, manteniéndose en el incubador a 37°C hasta el momento del experimento (2 horas como máximo).

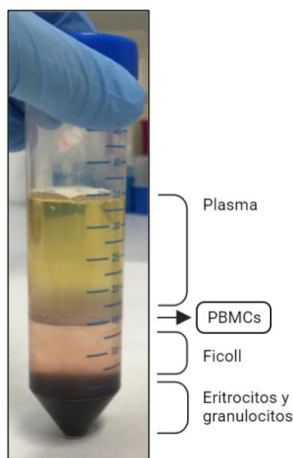


Figura 20. Aislamiento de PBMCs después de la centrifugación con Ficoll-Paque™ Plus.
Separación de fases por gradiente de densidad.

1.3. Células endoteliales de vena del cordón umbilical humano (HUVEC)

Las células endoteliales se extrajeron de la vena del cordón umbilical humano de donantes sanas del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

El interior de la vena se lavó con PBS a 37°C, a continuación, se añadió collagenasa (1 mg/ml) y se mantuvo el cordón umbilical en el incubador durante 17 minutos a 37°C (221, 222) (**Figura 21**). Transcurrido ese tiempo se masajeó el cordón umbilical para garantizar la extracción de las células endoteliales de la pared del vaso, se recogió el contenido y se centrifugó a 259 x g. El precipitado obtenido se resuspendió en medio de cultivo EBM-2 (*Endothelial Cell Growth Basal Medium-2*) suplementado (**Tabla 6**).



Figura 21. Cordón umbilical humano lleno de collagenasa para la posterior extracción de células endoteliales (HUVEC) (223).

Tabla 6. Suplementos añadidos al medio EBM-2 para el cultivo de HUVEC.

SUPLEMENTO	CONCENTRACIÓN
Suero fetal bovino (FBS)	2 %
Hidrocortisona	0.04 %
Factor de crecimiento de fibroblastos humanos (hFGF-B)	0.4 %
Factor de crecimiento endotelial vascular (VEFG)	0.1 %
Factor de crecimiento semejante a la insulina tipo 1 (R3-IGF-1)	0.1 %
Ácido ascórbico	0.1 %
Factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (rhEGF)	0.1 %
Sulfato de Gentamicina – Amfotericina B (GA-1000)	0.1 %
Heparina	0.1 %
Penicilina	50 unidades/ml
Estreptomycin	50 µg/ml
Fungizona	2.5 µg/ml

La suspensión celular se depositó en un frasco T-25 que se incubó a 37°C en atmósfera húmeda y 5 % de CO₂. Cuando se observó una confluencia cercana al 100%, las células se despegaron con tripsina y se sembraron en placas de cultivo adecuadas. En todos los experimentos se utilizaron células de primer pase.

1.4. Líneas celulares humanas

Utilizamos las siguientes líneas celulares:

- Células endoteliales HUVEC CC-2519 (Lonza). Células primarias provenientes de la vena del cordón umbilical de un conjunto de donantes (*pooled donor*). Se cultivaron en medio EGM-2 (*Endothelial Growth Medium-2*) atemperado y suplementado con el *Kit EGM™-2 SingleQuots* (CC-3124, Lonza) (0.1 % factor de crecimiento epidérmico humano (*human Epidermal Growth*

Factor, hEGF), 0.1% hidrocortisona, 0.1% GA-1000, 0.4% extracto cerebral bovino (*Bovine Brain Extract*, BBE), 0.1% ácido ascórbico y 2% suero fetal bovino (FBS)).

- Células epiteliales HT-29 (American Type Culture Collection, Manassas, EE. UU.). Línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano con morfología epitelial. Se cultivaron con medio atemperado McCoy modificado (Sigma-Aldrich) suplementado con 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina y 10 % de FBS inactivado.
- Células epiteliales HCoEpiC (*Human Colonic Epithelial Cells*) (Innoprot, España). Células primarias procedentes de cólon humano sano. Se cultivaron con medio atemperado CoEpiCM (*Colonic Epithelial Cell Medium*) suplementado con 5 ml de suplemento de crecimiento de células epiteliales colónicas, 5 % de FBS y 1 % de solución de penicilina/estreptomicina.
- Fibroblastos de intestino delgado humano (HSIF) (Innoprot, España). Células primarias cultivadas en medio atemperado de fibroblastos (Innoprot) suplementado con 2 % de FBS inactivado, 5 ml de suplemento de crecimiento de fibroblastos y 1 % de solución de penicilina/estreptomicina.

1.5. Tratamientos *in vitro*

Generamos distintos modelos celulares según el objeto de estudio (**Tabla 7**). Utilizamos la citoquina TGF-β como elemento inductor de fibrogénesis. Tratamos las células con DLL4 para imitar la mayor actividad de la ruta Notch observada en las muestras de nuestros pacientes. Como modelo de inflamación y atendiendo a su importancia en la EC, aplicamos un tratamiento con TNFα. Añadimos además succinato para emular la acumulación del metabolito detectada en estos enfermos.

Tabla 7. Tratamientos *in vitro* utilizados.

Nombre	Concentración *	Duración tratamiento	Células tratadas	Casa comercial
TGF-β2	1 ng/ml	48 h	HUVEC primarias	Sigma-Aldrich
DLL4	1 μ g/ml	7, 8, 10 o 24 h	HUVEC primarias, CC-2519, HCoEpiC, HT29 y HSIF	Sigma-Aldrich
TNF-α	20 ng/ml	4 h	HUVEC primarias	Sigma-Aldrich
Succinato	0.1, 0.5, 1 mM	4 h	HUVEC primarias	Sigma-Aldrich

* Concentraciones establecidas en experimentos preliminares

Bloqueo del receptor SUCNR1 (antagonista NF-56-EJ40)

El compuesto NF-56-EJ40 (HY-130246, MedChemExpress) se une profundamente dentro del bolsillo hidrofóbico del receptor y actúa como un potente y altamente selectivo antagonista del SUCNR1 (GPR91) humano (IC₅₀ de 25 nM, K_i de 33 nM) (224). Este fármaco se añadió al medio de cultivo a la concentración de 1 μ M y 30 minutos antes del tratamiento con el agonista.

Transfección: siRNA/miRNA

Para poder introducir ciertas moléculas como ARNs cortos de interferencia (siRNA) y micro-ARN (miRNA) dentro de las HUVEC fue necesario llevar a cabo un método de transfección mediante el reactivo Lipofectamina® RNAiMAX. Cuando las células endoteliales alcanzaron una confluencia del 70 – 80 % se empezó con el protocolo de transfección del fabricante. Las HUVEC fueron transfectadas con un siRNA frente a ITGA11 (30 nM) o el miR-378a-3p (20 nM), además de sus respectivos controles negativos, durante 16h (**Tabla 8**). El medio de transfección utilizado fue el EBM-2 sin antibióticos ni FBS. El grupo *mock* siguió el mismo procedimiento, pero sin el material a transfectar.

La eficacia de la transfección se determinó analizando la expresión del ARNm del gen diana o del miARN respecto al control negativo.

Tabla 8. Moléculas transfectadas en HUVEC.

MOLÉCULAS TRANSFECTADAS EN HUVEC				
siRNA/miRNA	Tiempo transfección	Concentración	Referencia	Casa comercial
si-ITGA11	16 h	30 nM	s242	Thermo Fisher Sci.
Control negativo siRNA #1	16 h	30 nM	4390843	Thermo Fisher Sci.
hsa-miR-378a-3p (mímico)	16 h	20 nM	MC11360	Thermo Fisher Sci.
Control negativo mímico	16 h	20 nM	4464061	Thermo Fisher Sci.

2. Modelos murinos

2.1. Animales

Se utilizaron ratones macho C57BL/6 (Charles-River) de 8-12 semanas de edad y 25-30 g de peso corporal. Los animales se mantuvieron a 21 ± 1 °C en condiciones libres de patógenos, con un régimen de 12 h de luz/oscuridad y acceso *ad libitum* a agua y comida. La asignación a los diferentes grupos experimentales se hizo al azar y los grupos resultantes se alojaron juntos para reducir posibles diferencias en la microbiota. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con la Ley Europea de Investigación Animal, y los protocolos fueron aprobados por los comités institucionales de cuidado y uso de animales de laboratorio de la Universitat de València.

2.2. Modelo murino de fibrosis intestinal: Trasplante Heterotópico

La fibrosis intestinal murina fue inducida *in vivo* mediante la implantación de tejido colónico de un ratón dador en el espacio subcutáneo dorsal de un ratón receptor. Para ello, el ratón dador se sacrifica mediante dislocación cervical y su colon, extraído a través de una incisión abdominal, se lava con NaCl al 0,9 % y se divide en 6 partes iguales de 10 mm (**Figura 22 A**). En el animal receptor anestesiado con isoflurano, se rasura la zona dorsal y se realizan dos incisiones de forma perpendicular a la columna vertebral. Seguidamente, se implanta un injerto intestinal en cada una de estas bolsas subcutáneas (**Figura 22 B**) y se cierran ambas con puntos de vicryl-5. Además, se guardaron dos segmentos adyacentes del colon de cada donante para usarlos como tejido de control autólogo (denominado como día 0). Después de 7 días, los ratones receptores se sacrificaron por dislocación cervical y se obtuvieron los injertos intestinales (**Figura 22 C**). Todos los tejidos se subdividieron para el aislamiento de ARN y proteínas y el análisis histológico.

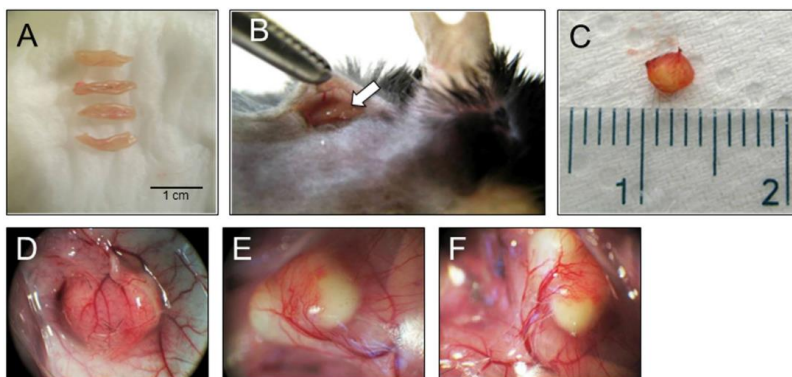


Figura 22. Protocolo para la generación del modelo *in vivo* de trasplante heterotópico (inducción de fibrosis intestinal murina) (adaptada de 225). **(A)** Resecciones de colon pertenecientes a los ratones dadores, **(B)** incisión en la cual se realizará el trasplante, **(C)** trozo de colon trasplantado tras ser recuperado, para ser guardado y analizado. **(D, E y F)** Distintas fases de la generación de fibrosis tras el trasplante.

2.3. Modelo murino de colitis crónica inducida por DSS

Se indujo la colitis crónica en ratones hembra (WT) mediante la administración de sulfato de dextrano sódico (DSS) vía oral durante 4 ciclos de porcentajes crecientes (1%, 1%, 1,5% y 1,5%) de DSS (MW 36 000–50 000, MP Biomedicals, Santa Ana, EE. UU.) en agua potable (7 días), intercalado con fases de recuperación (10 días) con agua potable normal. Los animales se sacrificaron 10 días después del último ciclo de DSS. Los grupos control recibieron solo vehículo. Al final del experimento, se sacrificaron a los ratones de forma adecuada para recoger muestras de tejido de colon para los estudios posteriores.

2.4. Modelo murino de inflamación aguda: Microscopía Intravital

Generamos un modelo de inflamación aguda en ratones de cepa salvaje (*wild type*, WT) y *knockout* para SUCNR1 (SUCNR1^{-/-}, generados y cedidos por el Dr. Kenneth McCreath), mediante la administración de una de las principales citocinas presentes en la EC, el TNF α , combinada o no con succinato (**Figura 25**). Los animales se dividieron en cuatro grupos que recibieron los siguientes tratamientos:

- 1) Suero fisiológico (100 μ l, i.p.) + suero fisiológico (100 μ l, intraescrotal)
- 2) TNF α (100 μ l, i.p., 500ng/ratón) + suero fisiológico (100 μ l, intraescrotal)
- 3) Suero fisiológico (100 μ l, i.p.) + succinato 1mM (100 μ l, intraescrotal)
- 4) TNF α (100 μ l, i.p., 500ng/ratón) + succinato 1mM (100 μ l, intraescrotal)

Cuatro horas más tarde, se analizaron las interacciones leucocito-endotelio en vénulas cremásticas mediante microscopía intravital. Para ello, los ratones anestesiados (xilacina clorhidrato 10 mg/kg más ketamina clorhidrato 100

mg/kg, i.p.) se colocaron sobre una almohadilla térmica que mantenía la temperatura corporal y se sometieron a una incisión en el testículo para la posterior extensión del cremáster sobre un pedestal transparente (**Figura 23**). Esta preparación, que permite observar directamente los vasos mediante un microscopio intravital ortostático (Nikon Optiphot-2, SMZ1, Nikon, Holanda), se superfundió de forma continua con una solución tampón bicarbonatada (pH 7.4), a 37°C y una velocidad de 2 mL/min (226), y las imágenes se grabaron mediante una cámara (Sony SSC-C350P; Sony, Germany) acoplada al microscopio (**Figura 24**).



Figura 23. Músculo cremastérico de ratón extendido y expuesto sobre pedestal transparente para el estudio de la interacción leucocito-endotelio (227).

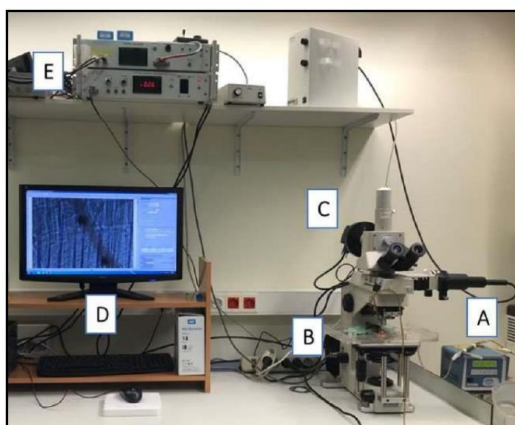


Figura 24. Sistema de montaje para la técnica de microscopía intravital. (A) Baño termostático, (B) Pedestal transparente, (C) Videocámara, (D) Monitor de ordenador, (E) "Video Caliper".

Se seleccionaron vénulas sin ramificaciones de 25-40 μm de diámetro (Vídeo Caliper, Microcirculation Research Institute, Texas A&M University, College Station, USA) y se grabaron imágenes durante 5 min (programa NIS Elements AR program (226)) para el análisis posterior, y de forma ciega, de los siguientes parámetros leucocitarios:

- **Rodamiento leucocitario:** se registra el número de leucocitos en rodamiento (circulando a una velocidad inferior a la de los eritrocitos) que atraviesan un punto preestablecido de la vénula durante un periodo de 1 minuto. Se expresa en células/min.
- **Adhesión leucocitaria:** se contabilizan los leucocitos que permanecen estacionados o tienen contacto estable con el endotelio venular durante un periodo igual o superior a 30 segundos en 100 μm de vaso, en el transcurso del mismo minuto en el que analizamos el rodamiento. Se expresa en células/ mm^2 (228, 229).

Tras la grabación, se procedió a la eutanasia del animal por dislocación cervical y, de forma inmediata, se extirparon y congelaron en nitrógeno líquido los dos tejidos cremastéricos para el análisis de expresión génica y proteica.

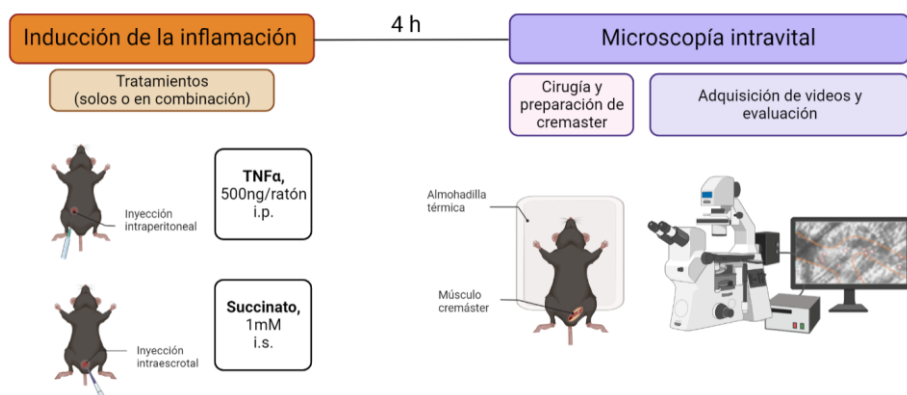


Figura 25. Esquema de la dinámica de trabajo para la evaluación de las interacciones leucocito - endotelio en los ratones del modelo de inflamación aguda. La microscopía intravital permite evaluar las interacciones leucocitarias que acontecen en el endotelio venular del tejido cremastérico de los ratones. El número total de grupos experimentales para nuestro estudio fue de 8, es decir, 4 grupos experimentales para cada una de las poblaciones (WT y SUCNR1^{-/-}).

3. Estudio transcriptómico en resecciones ileales de pacientes de Crohn

El patrón de expresión génica se analizó mediante RNA-seq (104) en las resecciones quirúrgicas ileales de pacientes con EC con comportamiento B2 o B3 y en las muestras control ([Sección 1.1](#)), siguiendo los siguientes pasos.

Aproximadamente 35 mg de las muestras de resecciones intestinales congeladas fueron utilizadas para la extracción total de ARN con protección de miARN, utilizándose el kit miRvana miRNA Isolation (Applied Biosystems/Ambion, USA) ([Sección 5.1](#)). La preparación de las librerías y la secuenciación de última generación de ARN (ARNs pequeños y ARNm) fueron realizadas por el Servicio de Genómica y Epigenética de la Unidad Central de Investigación en Medicina (UCIM) de la Universidad de Valencia, utilizando la tecnología de secuenciación de Illumina.

Para la secuenciación de ARN, se prepararon librerías utilizando el ARN total y el kit de preparación de bibliotecas de ARNm, TruSeq Stranded mRNA Library Preparation Kit (Illumina, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, la purificación del ARNm se realizó mediante oligo dT, que selecciona específicamente estas moléculas debido a su complementariedad con las colas de poli-A. A continuación, se fragmentaron las moléculas y se sintetizó el ADNc. El ADNc se amplificó mediante PCR y la calidad y el tamaño de la biblioteca se determinaron mediante fluorimetría y el bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, EE. UU.). Finalmente, se secuenció una cantidad equimolar de todas las muestras mediante el secuenciador de plataforma NGS NextSeq550 (Illumina, CA, EE. UU.), utilizando secuenciación de un único extremo (single-end sequencing) de 75 pb.

Para la secuenciación de ARN pequeños, las librerías fueron generadas con NEXTFLEX® Small RNA-Seq v3 Kit for Illumina Platforms (Bioo Scientific® Corporation, TX, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las moléculas de ARN pequeño fueron ligadas a unos adaptadores 3'-4N adenilados dirigidos al grupo fosfato terminal para poder seleccionar estas moléculas específicamente. Después, se utilizaron adaptadores 5'-4N y se realizó una transcripción inversa para sintetizar ADNc. Estos fragmentos de ADNc fueron amplificados mediante PCR e indexados con cebadores con código de barras exclusivos para cada muestra. El paso final para la preparación de la librería consistió en la selección del tamaño. La calidad y la concentración de las librerías se verificó mediante chips de ADN de alta sensibilidad en el Bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, EE. UU.). Por último, se secuenció un conjunto equimolar de todas las muestras en la plataforma NextSeq550 (Illumina, CA, EE. UU.) mediante secuenciación de un único extremo (single-end sequencing) de 50 pb.

Los análisis bioinformáticos se realizaron en Epidisease S.L mediante archivos fastq preprocesados (verificación de calidad de las lecturas con FastQC v0.11.9). Se recortaron las lecturas de los archivos fastq para eliminar los adaptadores en 3' para micro-ARN y 5'/3' para el ARNm con Cutadapt v 1.18. Se descartaron las secuencias de ARN con una puntuación de calidad media mínima inferior a 20. Se consideraron las secuencias de longitud igual o superior a 25 nucleótidos en el caso del ARNm y de 18 nucleótidos en el caso del miARN. Se utilizó el software MultiQC v1.11 para resumir algunos parámetros de las secuencias recortadas como la puntuación de calidad media de Phred (>34) y el contenido del adaptador (*adapter content*) (<1%). Finalmente, las secuencias se alinearon con el genoma humano de referencia (ChGR38) del UCSC Genome Browser con Subread v2.0.2, donde un promedio del 87,5% (ARNm) y del 84,2% (miARN) de las lecturas se mapearon con éxito. La cuantificación de las lecturas se realizó utilizando Rsubread R-package.

Posteriormente, se realizó un análisis de expresión diferencial (DEA) de entre los grupos de muestras, utilizando un modelo DESeq2 (ARNm) y edgeR R-package (miARN) para el análisis de datos. Se clasificó el ARN candidato según el signo del *fold change* en cada comparación, considerando significativos los ARNm y miARN con un FDR <0,05. Por último, el análisis de los datos obtenidos para el ARNm se orientó hacia la clasificación de familias génicas representantes de procesos biológicos o *pathways* (GO terms) mediante un análisis bioinformático. El análisis de sobrerrepresentación (ORA) examina los genes que cumplen un criterio de selección y determina si hay conjuntos de genes que están sobrerrepresentados estadísticamente en esa lista y que se asocian a procesos/funciones concretas. El análisis de sobrerrepresentación se realizó con un paquete clusterProfiler R. Todo el proceso se completó internamente en bash y R-scripts utilizando el software R v 4.1.0, de forma rutinaria. En el caso del miARN, se generaron mapas de calor de agrupamiento jerárquico de miRNA significativos en R con los paquetes gplots y stats, utilizando las funciones

heatmap.2 y hclust, respectivamente. Los datos se normalizaron en una escala de -1 a 1 para mejorar su visualización.

4. Análisis de la expresión génica

4.1. Aislamiento de ARN de tejido humano y murino

Las muestras de tejido se homogenaron con el triturador ULTRA-TURRAX® (IKA, Staufen, Germany) en 350 µL de TriPure™ Isolation Reagent. El sobrenadante obtenido tras la centrifugación de los homogenados (12000 x g, 15 min, 4°C) se incubó con cloroformo (150 µL, 15 min, en hielo) y se centrifugó de nuevo (12000 x g, 15 min, 4°C). Para la precipitación del ARN, el sobrenadante se incubó con isopropanol (375 µL, 1 h, -20°C) y, tras una última centrifugación (12000 x g, 15 min, 4°C), el precipitado se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en 30 µL de agua libre de ARNasas. La pureza y concentración del ARN se determinaron por espectrofotometría, utilizando un espectrofotómetro NanoDrop™ ND-1000 (Thermo Scientific).

4.2. Aislamiento de ARN de células cultivadas

Las células se despegaron con tripsina, se lavaron con PBS y centrifugaron (500 x g, 3 min) para obtener los sedimentos celulares de los que se extraería y purificaría el ARNm mediante el Kit de aislamiento RNA spin Mini illustra™ (siguiendo el protocolo del fabricante). Para ello, el sedimento celular se resuspendió en 350 µL de tampón de lisis con β-mercaptoetanol y se homogeneizó pasándolo a través de una aguja de calibre 25. Después, se agregaron 350 µL de etanol al 70 %, se mezclaron y se transfirieron a una columna que retiene el ARN. Tras la incubación con ADNasa para eliminar el ADN genómico, las columnas se lavaron 3 veces y el ARN se eluyó en 30 µL de agua libre de ARNasas. La pureza y concentración del ARN se determinaron utilizando un espectrofotómetro NanoDrop™ ND-1000 (Thermo Scientific).

4.3. Síntesis de ADN complementario (ADNc) mediante transcripción reversa

El ADNc se sintetizó mediante retrotranscripción (RT), utilizando el Kit de Reactivos para RT PrimeScript™ (*Perfect Real Time*). Siguiendo el protocolo del fabricante, la reacción se realizó en un volumen final de 20 µl usando 1 µg de ARN y 4 µl de 5X Tampón PrimeScript, 1 µl de Mix I de Enzimas TR PrimeScript, 1 µl (50 pmol) de hexámeros aleatorios (*Random hexamers*) y 1 µl (25 pmol) de cebadores Oligo dT. La reacción se llevó a cabo en el Termociclador SimpliAmp™ (Applied Biosystems™, Thermo Fisher) bajo las siguientes condiciones: 15 min a 37°C, 5 seg a 85°C y 4°C hasta el infinito.

4.4. PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

La RT-qPCR se realizó con SYBR® Premix Ex Taq™ (TaKaRa Bio Inc.) que contiene ADN polimerasa Ex Taq HS TaKaRa, una mezcla de dNTPs, Mg²⁺, ARNasa Tli H y TB Green I (intercalador de ADN que emite fluorescencia solo cuando se une a ADN de doble cadena). La detección de su señal fluorescente permite la cuantificación de los productos de amplificación. La reacción se llevó a cabo mezclando 1 µl de ADNc, 5 µl de SYBR premix Ex Taq 2X, 2 µM de cebadores específicos sentido y anti-sentido y agua libre de ARNasas en un volumen final de 10 µl. La RT-qPCR se llevó a cabo en el equipo Lightcycler® 96 Real-Time qPCR System (Roche Life Science), siguiendo el protocolo: 95°C durante 30 seg; 95°C durante 5 seg; 60°C durante 20 seg (x 50 ciclos); 95°C durante 1 seg; 65°C durante 15 seg; 95°C durante 1 seg y 40°C durante 30 seg.

Todos los experimentos se realizaron por duplicado con un control negativo (agua libre de ARNasa en lugar de ADNc). Los pares de cebadores específicos se diseñaron (Sigma) y se muestran sus secuencias en las **Tablas 9 y 10**. Antes de su uso en RT-qPCR, los cebadores fueron testados realizando un análisis de la curva de fusión (*melting curve*) y una electroforesis estándar en gel de agarosa al 2 % en tampón TAE 1X que contenía tinción de ADN GelRed®. Las

bandas se detectaron en una cámara Amersham™ ImageQuant™ 800 biomolecular imager (GE Healthcare, Chicago, EE.UU.).

La expresión génica relativa se analizó utilizando el umbral del ciclo (Ct) para el cálculo del *fold change*, medida que describe cuánto cambia la expresión entre una medición y otra (ratio entre dos expresiones). Como gen constitutivo, se utilizó ACTB (β -actina).

$$\text{Fold change} = 2^{-\Delta(\Delta Ct)}$$

Donde:

- $\Delta Ct = Ct \text{ (gen diana)} - Ct \text{ (gen constitutivo de referencia)}$
- $\Delta(\Delta Ct) = \Delta Ct \text{ (grupo experimental)} - \Delta Ct \text{ (control)}$

Tabla 9. Secuencias de los cebadores humanos empleados.

CEBADORES (Estudio inflamación)	SECUENCIA	
	(s)	(as)
SUCNR1/ GPR91	GGAGACCCCACTACAACCTC	AGCAACCTGCCTATTCTCTG
CEBADORES (Estudio fibrosis)	SECUENCIA	
	(s)	(as)
ADAM12	TAGGCGTGGAAGTGTGGAATG	TGGTCCCTTGAAATAAACCCC
ADAMTS9	GGGGAACGGAAACGAAAACCTG	ACACTGGGCACTACATTCACCTC
ANGPT2	CCAAACAGCGGAGCAAACG	CGAGAGGGAGTGTCCAAGAG
BGN	ACCTCCCTGAGACCTGAATG	GGACAGAAGTCGTTGACACCC
CD31/PECAM	GAGTCCTGCTGACCTTCTG	ATCTGGTGCTGAGGCTTGAC
CDH1/ E- CADHERINA	TGGAGGAATTGTGCTTGC	CGCTCTCTCCGAAGAAC
CDH2/ N- CADHERINA	TGTTTGACTATGAAGGCAGTGG	TCAGTCATCACCTCCACCAT
CDH5/ VE- CADHERINA	GGGCTCTCTGTTTGTGAGGAC	TGACCTGGGCTCTGTTCCC
CHI3L1	GGAATGATGTGACGCTCTACGG	CTGGGTGTTGGAGGCTATCTTG
COL1A1	GGAGCAGACGGGAGTTTCTC	CCGTTCTGTACGCAGGTGAT

COL1A2	AGAGAGCGGTAACAAGGGTG	GACCACGAGAACCAGGACTAC
COL3A1	CGCCCTCCTAATGGTCAAGG	TTCTGAGGACCAGTAGGGCA
COL4A1	CCGGATCACATTGACATGAAAC	TGGAAACCAGTCCATGCTCG
COMP	GCAGACAATGAACAGCGACC	CCAAAGATGAAGCCCGCATAG
DDR1	CCACCTCCCACCAACTTCAG	GCTCCTCTTCCAACACCCCTC
DDR2	GCTCCTTCACCAGCAAAGTG	CTGGGAGGCATATCAACGGG
DLL3	GAGACACCCAGGTCCTTTGA	CAGTGGCAGATGTAGGCAGA
DLL4	GTGCAGCGTACACCGGCACT	TCTGTTGCGGACGCCGCTTT
EPYC	TGAAGACATTAGCAGGACTTGTTT	TGGGGAGAAGAGCCATCAATC
FN1	AAACCAATTCTTGAGCAGG	CCATAAAGGGCAACCAAGAG
FSCN1	CAGCCGAACAAAGGAGCAGG	CGCAGTTGATGAGGCCGAAC
IL1A	TGGCGTTTGAGTCAGCAAAG	CAGAACCTTCCCGTTGGTTG
IL1B	GCTCGCCAGTGAAATGATGG	TCGTGCACATAAGCCTCGTT
IL8	AGAGACAGCAGAGCACACAAG	AATTTGGGGTGGAAGGTTTGG
ITGA1	ATAAGTGTCCAGTTGGGAGAGG	GACTTGAAATGTGGGGCTGAC
ITGA2	TGTGGTGAGGACGGACTTTG	AACCGGCAGGGAGAATGATG
ITGA10	GATCAGGCATGGAACCTCCC	AGGGCAGCGATAAACGTCC
ITGA11	AACATGGACACCAGGAAGCC	GACCAGCCACTTATTGCCAC
JAG1B	GGCCGAGGTCTATACGTTG	TTAGGACTGCAGCCTTGTCG
JAG2	GTCAAGGTGGAGACGGTTGT	TTGCACTGGTAGAGCACGTC
MMP2	ACTACAACCTCTCCCTCGCA	CAAAGGCATCATCCACTGTCTC
MMP19	GCCTCTCAACAAAAGGTGTTT	GCCAACTCATAGCAGCCGAG
NOTCH1	GATCGAGGAGGCGTGCGAGC	CTTCCGCACGCTGGCAGTCA
NOTCH2	ATGACTGCCCTAACCACAGG	CTGGAGTACAGGAGGCGAAG
NOTCH3	GCTTCAGCGGCTCCACGTGT	TCAAAGCCCTCGGCACAGCG
NOTCH4	CCCCAGTGAGAGCTCTGAGGGTC	GCACACTGGCAGGTCCCTTGTC
PAI1/ SERPINE1	CTCTCTCTGCCCTCACCAAC	TCGGTCATTCCCAGGTTCTC
SNAI1	AACTGCAAATACTGCAACAAGG	ATTCTGGGAGAAGGTCCGAG
SNAI2	ACGCCTCCAAAAAGCCAAAC	ACAGTGATGGGGCTGTATGC
TGFB1	AGCAACAATTCTGGCGATAC	CGGTAGTGAACCGTTGATG
TNFA	GCTGCACTTTGGAGTGATCG	GGGTTTGCTACAACATGGGC
VASH1	GTGGGCTACCTGTGGATGAG	GAAGTGTGTCCTGTGTGATTG
VASH2	AGGTCAAGATTGGGCTGTACG	GCTTCTCACTTGGGTCGGAG
VEGFR2	CAGAGTTGGTGGAACATTTGGG	AGGTGAGGTAGGCAGAGAGAG
VIM	ATGAAGGAGGAAATGGCTCGTC	GGGTATCAACCAGAGGGAGTGAA
VWF	CCTCTCCGTGTATCTTGGGG	CCGCAGGTCTTGTTGAAGTATC

CEBADORES (Otros)	SECUENCIA	
	(s)	(as)
ACTB	GGACTTCGAGCAAGAGATGG	AGCACTGTGTTGGCGTACAG

Tabla 10. Secuencias de los cebadores murinos empleados.

CEBADORES (Estudio inflamación)	SECUENCIA	
	(s)	(as)
<i>Il1b</i>	TGCCACCTTTTGACAGTGATG	ATGTGCTGCTGCGAGATTG
<i>Il6</i>	GAGTCCTTCAGAGAGATACAGAAAC	TGGTCTTGGTCCTTAGCCAC
<i>Il18</i>	GCTTGCTTTCACTTCTCCCC	TGCTGGATGCTTGTAACCTG
<i>Tnfa</i>	ATCGGTCCCCAAAGGGATG	GGTGGTTGTGAGTGTGAGGG
CEBADORES (Estudio fibrosis)	SECUENCIA	
	(s)	(as)
<i>Cd31/pecam</i>	GCATCGGCAAAGTGGTCAAG	TGTCTCTGGTGGGCTTATCTG
<i>Cdh2/ N-cadherina</i>	GAAACCCAGGAAAAGTGGCAG	AGTTGATTGGCGGGATGACC
<i>Cdh5/ Ve-cadherina</i>	CCACCATCGCCAAAAGAGAG	CACAATGAGGGCAGTAAGGAAG
<i>Col3a1</i>	CTACACCTGCTCTGTGCTTC	GATAGCCACCCATTCTCCCA
<i>Col4a1</i>	ATTAGCAGGTGTGCGGTTTG	TCTCGTTCTCTCTATGGTGG
<i>Ddr1</i>	CTATCGGTTGCGTTACTCCC	TCCTTCAGCACTACTCCCC
<i>Ddr2</i>	TTGACTTGCGAACCCTACAC	GTGACTGGGATAAGGCGAAC
<i>Fgfr1</i>	CTTGGCGGGTAACTCTATCGG	ATCTGGCTATGGAAGTCGCTC
<i>Fn1</i>	AGTTGGCACCACGAAGAG	TCATCTGTAGGCTGGTTCAGG
<i>Itgav</i>	TATTGGGGACGACAACCTC	CACGCTGAAACGAAGACCAG
<i>Itga1</i>	CGGCTTCAGTGCTCATTATTC	CCACAGTTCGGTTCCAGTC
<i>Itga2</i>	TCAAGGAGGAGACAATTCCAG	TCCAGTCAAAAGCCCCAC
<i>Itga10</i>	GGAGGCTGGTAGGAAGACTG	TGGGCGGTTCTCGTTTCTC
<i>Itga11</i>	GCCCCAGATTCAACCATAC	TACACCTTGCTCGCTCTC
<i>Vwf</i>	GCAACTCCTTCTCCACAAAC	GCCTCTTCTCATTCCCATCTTC
CEBADORES (Otros)	SECUENCIA	
	(s)	(as)
<i>Actb</i>	GCCAACCGTGAAAAGATGACC	GAGGCATACAGGGACAGCAC

5. Análisis de la expresión de micro-ARNs

5.1. Aislamiento de ARN con protección de micro-ARNs

Se aisló el ARN total de las muestras (HUVEC o muestras ileales de pacientes EC), incluidos los miARN, utilizando el Kit de aislamiento de miARN mirVana™ siguiendo el protocolo del fabricante. La disrupción de las membranas celulares se consiguió incubando la muestra en 500 µl de Solución de Lisis (con 1/10 del reactivo *miRNA Homogenate Additive*). La mezcla se incubó en hielo (10 min), se le añadió un volumen de 500 µL de fenol ácido:cloroformo y, después, se vorteoó vigorosamente (60 seg) antes de ser centrifugada (10000 x g, 5 min). De la fase acuosa resultante (fase superior) de la extracción orgánica, fue recuperado un volumen aproximado de 500 µL y fue mezclado con 575 µL de etanol 100 %. La mezcla se transfirió a una columna que retiene el ARN. Las columnas se lavaron 3 veces y el ARN aislado y purificado fue eluído con 50 µL de agua libre de ARNasas. La concentración de ARN total se cuantificó con el Espectrofotómetro Multiskan SkyHigh™ (Thermo Scientific).

5.2. Selección de las sondas/cebadores TaqMan (miARNs)

Se escogieron sondas/cebadores TaqMan de tres miARN que se encontraron alterados respecto a los controles en el análisis transcriptómico que realizamos en resecciones ileales de pacientes de Crohn ([Sección 3](#)). Por lo que fueron seleccionados para el estudio los micro-ARN mostrados en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Cebadores utilizados para la RT-qPCR Taqman.

Sondas/Cebadores TaqMan	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
miR-378a-3p	Thermo Fisher Scientific	ID: 001314, 4427975
miR-7-5p	Thermo Fisher Scientific	ID: 005723_mat, 4440886
miR-3529-3p	Thermo Fisher Scientific	ID: 005723_mat, 4440886
RNU48 (control endógeno para la RT-qPCR)	Thermo Fisher Scientific	ID: 001006, 4427975

5.3. Síntesis de ADNc mediante RT

Para la retrotranscripción (RT) se realizó un multiplexado mediante el uso de cebadores específicos para cada miARN de interés (hsa-miR-378a-3p, hsa-mir-7-5p, hsa-mir-3529-3p y RNU48).

Las reacciones de retrotranscripción (RT) se realizaron en placas de 96 pocillos con el kit de transcripción reversa de miARN TaqMan en un volumen total de reacción de 20 μ L. Se añadió 5.35 μ L de la muestra correspondiente (100ng de ARN) y 14.65 μ L de TaqMan™ MicroARN Reverse Transcription Kit (10x RT Buffer (2 μ L), 25x dNTP Mix 100mM (0.4 μ L), 5x Pool RT Primers (8 μ L), Multiscribe Reverse Transcriptase, 50U/ μ L (4 μ L) e inhibidor de ARNasas 20U/ μ L (0.25 μ L); 4366597).

La reacción se realizó en el termociclador 2720 Applied Biosystems (ThermoFisher Scientific, Walham, MA, EE. UU.), bajo las siguientes condiciones: 16°C durante 30 min (unión de los cebadores específicos), 42°C durante 30 min (síntesis ADNc) y 85°C durante 5 min (periodo de inactivación).

5.4. RT-qPCR-TaqMan

Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron por triplicado, en volúmenes de reacción reducidos de 10 μ L, usando 5 μ L TaqMan 2x Universal PCR Master Mix II sin UNG (4440040), 0,5 μ L TaqMan Small RNA Assay (20x) específicos para cada miARN de interés (hsa-miR-378a-3p (001314), hsa-mir-7-5p (005723_mat), hsa-mir-3529-3p (005723_mat) y RNU48 (001006) (**Tabla 10**)), 3,5 μ L de agua libre de nucleasas y 1 μ L de producto RT (ADNc obtenido previamente).

La PCR en tiempo real se realizó en un termociclador QuantStudio™ 5 Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific). El protocolo de amplificación fue el siguiente: 50°C durante 2 min, 95°C durante 10 min (activación de la polimerasa) seguido de 45 ciclos de 95°C durante 15 seg y 60°C durante 1 min. Uno de los

miARN más estables para el recuento (*stable counting reads*), el miARN RNU48 (001006), se utilizó como control endógeno para normalizar los datos de expresión mediante el método delta-delta CT ($2^{-\Delta\Delta CT}$).

6. Análisis de la expresión proteica

6.1. Extracción de proteína total de tejido humano y murino

Las muestras de tejido fueron homogenizadas en 150 -350 μ L de tampón de lisis PhosphoSafe, el cual extrae eficientemente proteínas citosólicas de células de mamíferos e insectos al tiempo que preserva su estado de fosforilación. Este tampón se completó con inhibidores de proteasas de amplio espectro (cComplete™ Mini Protease Inhibitor Cocktail, dilución 1/10).

La homogenización se realizó con el homogenizador ULTRA-TURRAX® (IKA, Staufen, Alemania) durante 1 minuto (aumentando la velocidad de homogenizado paulatinamente). Tras el primer procesado, se dejaron las muestras en hielo (1 min) y se procedió al segundo homogenizado. Después de una centrifugación (16000 x g, 20 min, 4°C), los sobrenadantes o extractos proteicos totales se mantuvieron en hielo hasta su cuantificación.

6.2. Extracción de proteína total de células cultivadas

Las células se despegaron de las placas mediante tripsinización, se lavaron con PBS y se centrifugaron (583 x g, 5 min), resuspendiendo el correspondiente sedimento celular en 70-150 μ L de tampón de lisis (PhosphoSafe Extraction Reagent suplementado con de inhibidores de proteasas - Complete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail, dilución 1/10). El preparado resultante se homogenizó (Vórtex, 2 X 1 min), se incubó en hielo (10 min) y se sonicó en frío (1 min). Tras una centrifugación (16000 x g, 15 min, 4°C), se obtuvo el sobrenadante o extracto proteico total.

6.3. Cuantificación de proteína total mediante el ensayo de BCA

Este ensayo se basa en el uso del ácido bicinconínico (BCA) para la detección colorimétrica y posterior cuantificación de proteínas totales en un extracto. El método combina la conocida reacción de Biuret (reducción de Cu^{+2} a Cu^{+1} por las proteínas en un medio alcalino) con la detección colorimétrica altamente sensible y selectiva del catión de cobre (Cu^{+1}) que interacciona con el reactivo BCA. El producto de reacción de color púrpura obtenido en el ensayo se produce por la quelación de dos moléculas de BCA con un ion cuproso. El complejo colorado y soluble en agua exhibe una fuerte absorbancia a 562 nm que es casi lineal con el aumento de las concentraciones de proteína en un rango de trabajo de 125–2000 $\mu\text{g/mL}$ y es analizable por un espectrofotómetro.

Este ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (con algunas variaciones detalladas a continuación). Se preparó una curva de proteína estándar mediante diluciones en serie de seroalbúmina bovina (BSA, *Bovine Serum Albumin*) (1 - 0,03 $\mu\text{g/mL}$). En una placa de 96 pocillos, se agregaron 200 μl por pocillo de reactivo de trabajo diluido 1:50 con la solución correspondiente del Kit de ensayo de proteínas BCA Pierce™ (Thermo Fisher Scientific). Posteriormente, se agregaron en cada pocillo 20 μl de las muestras diluidas 1:20 o de las diluciones seriadas de la curva estándar. Tanto las muestras como los puntos de la curva estándar se analizaron por duplicado. Después de 30 min de incubación en oscuridad y a 37°C, se midió la absorbancia a 562/575 nm utilizando un espectrofotómetro de microplacas Multiskan SkyHigh™ (Thermo Scientific). Por último, se utilizó la curva estándar de concentraciones proteicas conocidas de BSA para obtener las concentraciones de las muestras de interés.

6.4. Western blotting (WB)

Preparación de las muestras: Las proteínas se desnaturalizaron mezclando las muestras con un tampón de carga 6X (Tris-HCl 0,5 mM pH 6,8, glicerol al 25 % v/v, SDS al 10 %, β -mercaptoetanol al 0,5 % y azul de bromofenol al 0,5 %) y llevándolas a ebullición (100°C, 5 min).

Preparación de los geles de poliacrilamida: estos geles están compuestos por una mezcla de soluciones de acrilamida/bisacrilamida (37.5:1) y se dividen en dos partes, el gel concentrador (*stacking gel*) con un porcentaje de poliacrilamida al 3.75% en Tris-HCl 0.125 M pH 6.8 y SDS al 0.1%, y el gel separador o de resolución (*resolving gel*) con poliacrilamida al 8 - 12% en Tris-HCl 0.375 M pH 8.8 y SDS al 0.1%. Para catalizar la reacción de polimerización del gel utilizamos persulfato de amonio (APS) al 0.1% y N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED).

Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE): la SDS-PAGE se realizó en el Mini-PROTEAN Tetra Cell System (Bio-Rad, California, EE.UU.). Para ello, extractos con igual concentración proteica se cargaron en el gel junto a un marcador que permitiese identificar las proteínas según su peso molecular (EZ-Run™ Pre-Stained Rec Protein Ladder). La electroforesis húmeda se llevó a cabo en un tampón compuesto por Tris 25 mM pH 8,3, SDS al 0,1% y glicina 192 mM, y a un voltaje constante de 120 V.

Transferencia de proteínas a la membrana de nitrocelulosa: tras la electroforesis, las proteínas en el gel de poliacrilamida se transfirieron a una membrana de transferencia de nitrocelulosa con un poro de 0.45 μ m (GE Healthcare Life Science, Chicago, EE.UU.) mediante el uso del Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad, California, EE.UU.). El proceso se realizó a un amperaje constante de 0,35 A, durante 70 min, a 4°C y con el tampón de transferencia (Tris 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM y metanol al 20%).

Tinción de Ponceau: para verificar la eficiencia de la transferencia, las membranas de nitrocelulosa se sumergieron durante 1 min en una solución de Ponceau (Ponceau S al 0.1% y solución de ácido acético al 5%), la cual tiñe las proteínas de rojo.

Tratamiento con anticuerpos: las membranas se incubaron inicialmente (1h, TA) con una solución de bloqueo (leche en polvo desnatada al 5 % o BSA al 5 % en TBS-T (tampón salino-Tris con Tween-20 al 0.1%) (Tris-HCl 20 mM pH 7,2, NaCl 150 mM y Tween-20 v/v al 0,1 %) para prevenir interacciones no específicas. Seguidamente, se incubó con el anticuerpo primario (diluido en solución de bloqueo suplementada con azida de sodio (NaN₃) al 0.02 %) durante toda la noche, a 4°C y con agitación suave y continua. Tras tres lavados de 10 min con TBS-T a TA y con agitación potente, la membrana se incubó, durante 1 h y a TA, con el anticuerpo secundario disuelto en solución de bloqueo. Finalmente, se lavó de nuevo. Todos los anticuerpos primarios y secundarios utilizados están listados en la Tabla de Anticuerpos (**Tabla 12**).

Tabla 12. Anticuerpos empleados para WB.

ANTICUERPOS PRIMARIOS	REFERENCIA, CASA COMERCIAL	DILUCIÓN
Anti- ERK-1/2	4695, Cell Signaling	1:1000
Anti- ERK-1/2 fosforilado	9101, Cell Signaling	1:1000
Anti- Factor de transcripción p65 (NF-κB)	8242, Cell Signaling	1:1000
Anti- Factor de transcripción p65 fosforilado (Fosfo-NF-κB)	3033S, Cell Signaling	1:1000
Anti- GAPDH	G9545, Sigma-Aldrich	1:10000
Anti- Inhibidor α del NF-κB (IκBα)	sc-371, Santa Cruz Biotechnology	1:1000
Anti- Integrina α11	ab198826, Abcam	1:1000
Anti- MAP quinasa p38 beta	506123, Sigma-Aldrich	1:1000
Anti- MAP quinasa p38 beta fosforilada	28B10, Cell Signaling	1:1000
Anti- Notch3	ab23426, Abcam	1:1000
Anti- Notch4	ab33163, Abcam ab184742, Abcam	1:1000
Anti- Proteína tipo delta 4	ab7280, Abcam	1:1000
Anti- Receptor con dominio discoidina 1	5583, Cell Signaling	1:1000
ANTICUERPOS SECUNDARIOS	REFERENCIA, CASA COMERCIAL	DILUCIÓN
Anti- IgG de conejo (producido en cabra)	A16096, Invitrogen	1:5000
Anti- IgG de ratón (producido en cabra)	32230, Invitrogen	1:2000
Anti- IgG de cabra (producido en caballo)	PI9500, Vector	1:5000
Anti- IgG de cabra (producido en conejo)	61-1620, Thermo Fisher	1:5000

Detección de la quimioluminiscencia: el marcaje mediante anticuerpos se detectó mediante la quimioluminiscencia derivada de una reacción de oxidación del luminol (compuesto presente en las soluciones reveladoras) catalizada por la enzima peroxidasa del rábano picante (HRP) que está conjugada con el anticuerpo secundario y que, en presencia de peróxido de hidrógeno, da lugar a 3-aminofalato que emite luz a 425 nm. Se utilizaron los siguientes sustratos siguiendo las instrucciones del fabricante: Immobilon Crescendo Western HRP

Substrate, Immobilon Forte Western HRP Substrate o SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate.

La señal del inmunomarcaje se visualizó con un analizador de imagen luminiscente digital, Amersham™ ImageQuant™ 800 biomolecular imager (GE Healthcare, Chicago, EE.UU.). Los análisis densitométricos se realizaron utilizando el software Multi Gauge V3.0 (Fujifilm). La expresión de las proteínas se normalizó frente a la de GAPDH (control de carga).

Lavado de la membrana o *stripping*: en algunos casos, tras el revelado de una proteína, se procedió a eliminar los anticuerpos de la membrana con la finalidad de poder reutilizarla para la detección de otra proteína en las mismas muestras. Este método consistió en la incubación de la membrana con glicina 0,5 M pH 2,5 durante 1 h a TA con una agitación vigorosa. Después, la membrana se lavó dos veces con TBS-T y se bloqueó e incubó con anticuerpos primarios y secundarios nuevamente, según el protocolo descrito anteriormente.

6.5. Análisis histológico: Inmunohistoquímica

Las inmunotinciones de las muestras fijadas e incluidas en parafina se llevaron a cabo en cortes histológicos de 5 µm grosor y de acuerdo con los siguientes pasos:

Desparafinar e hidratar: para deparafinar los tejidos, los portaobjetos con los cortes se sometieron a una temperatura de 55°C durante 30 minutos y a dos lavados de 5 min con xileno. La rehidratación de los tejidos se consiguió mediante incubaciones sucesivas en soluciones hidroalcohólicas organizadas de mayor a menor graduación de etanol (3 min cada una, último lavado en agua).

Recuperación de epítomos inducida por calor (HIER, *Heat-induced epitope retrieval*): El formaldehído se une covalentemente a las proteínas del tejido y puede crear enlaces cruzados que enmascaren los antígenos y dificulten la unión

del anticuerpo. Por ello, en tejidos fijados en formalina es necesario realizar un paso de recuperación o desenmascaramiento del antígeno que rompa estos enlaces antes de la exposición al anticuerpo. Para ello, los portaobjetos se incubaron durante 20 min en un tampón de citrato a pH6 (SUNCN1) o pH9 (Integrina $\alpha 11$, Notch3 y Notch4) (Dako Target Retrieval Solution 10X, dilución 1:10) sumergido en un baño de agua a 95 °C. Tras esperar 10 min para que redujesen su temperatura, se lavaron en agua destilada (2 X 3 min) y TBS-T (2 X 5 min).

Bloqueo de peroxidasas endógenas: Las peroxidasas endógenas presentes en algunos tejidos pueden reaccionar con la solución de sustrato cromogénico utilizada para el revelado y producir así tinciones inespecíficas y falsos positivos. Para evitarlo, los portaobjetos se incubaron en una solución de bloqueo de las peroxidasas (H_2O_2 al 3%, en agua destilada, 15 min, TA) y, seguidamente, en TBS-T (3 X 5 min).

Bloqueo e incubación con el anticuerpo primario: tras la incubación durante 1h con tampón de bloqueo (PBS con 0,5% de Tritón-X, 1% de BSA, 2,5-5% de suero de la especie en la que se generó el anticuerpo secundario), las muestras se incubaron con el anticuerpo primario disuelto en solución de bloqueo durante 30min (para la Integrina $\alpha 11$, Notch3 y Notch4) o toda la noche (para SUNCN1) y a 4 °C.

Incubación con el anticuerpo secundario: las muestras se lavaron con TBS-T (3 X 5 min) y, seguidamente, se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa y diluido en tampón de bloqueo (30 min, TA, dilución 1:100), que se lavó posteriormente con TBS-T (2 X 5 min). En el caso de SUNCN1, y con el fin de amplificar la señal, utilizamos el Kit Universal ABC Vectastain® Elite® siguiendo las instrucciones del fabricante. Este método se basa en el uso de anticuerpos secundarios biotinilados y en la formación de complejos de

avidina-biotina-peroxidasa (ABC, *Avidin-Biotinylated peroxidase Complexes*) (230).

Todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda y los reactivos específicos utilizados en cada caso están especificados en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Combinación de anticuerpos empleados para IHQ.

ANTICUERPO PRIMARIO (Dilución, Referencia y Casa comercial)	ANTICUERPO SECUNDARIO (Kit utilizado)	SUERO EN SOLUCIÓN DE BLOQUEO
anti-Integrina $\alpha 11$ (1:250, ab198826, Abcam)	Ac frente a inmunoglobulinas de conejo (ImmPRESS® HRP Horse Anti-Rabbit IgG Polymer Detection Kit)	Suero de caballo
anti-Receptor de succinato 1 (1:200, NBP1-00861, Novus Bio)	Ac universal biotinilado frente a inmunoglobulinas de conejo/ratón (Kit Universal ABC Vectastain® Elite®)	Suero de caballo
anti-Notch3 (1:250, ab300527, Abcam)	Ac frente a inmunoglobulinas de conejo (ImmPRESS® HRP Horse Anti-Rabbit IgG Polymer Detection Kit)	Suero de caballo
anti-Notch4 (1:250, ab184742, Abcam)	Ac frente a inmunoglobulinas de conejo (ImmPRESS® HRP Horse Anti-Rabbit IgG Polymer Detection Kit)	Suero de caballo

Detección cromogénica: empleamos el sustrato cromogénico tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobencidina (DAB Enhanced Liquid Substrate System) que, al ser transformado por la peroxidasa, precipita y produce una intensa mancha marrón. Tras la adición de DAB sobre la muestra, se monitorizó la aparición de tinción por un periodo máximo de 3 min, tras los cuales, se paró la reacción sumergiendo las muestras en agua. Todas las secciones de tejido se contrastaron con hematoxilina durante 30 segundos. A continuación, los tejidos se enjuagaron con agua durante 10 segundos y, de forma secuencial, se fueron sumergiendo en etanol al 0,5% - HCl durante 10 segundos y en agua destilada durante 5 minutos.

Montaje y adquisición de imágenes: Las secciones de tejido se deshidrataron por exposición a soluciones hidroalcohólicas de graduación creciente y a xileno. Finalmente, utilizamos medio de montaje DPX® Mountant for histology para fijar los cubreobjetos.

Los tejidos teñidos se analizaron utilizando un microscopio de luz digital (Leica DMD 108, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) adquiriéndose imágenes a diferentes aumentos.

6.6. Inmunocitoquímica (ITGA11)

Fijación: Se lavaron las HUVEC sembradas en placas de 48 pocillos con PBS-T (PBS 1X, Tween-20 al 0.1%) y después fueron fijadas con paraformaldehído 4% durante 20 min.

Bloqueo: Tras dos nuevos lavados con PBS-T 1X se llevó a cabo el bloqueo (1h, TA), con una solución de bloqueo compuesta por PBS, un 10% de suero (el cual será del animal donde se ha producido el anticuerpo secundario que se usará más adelante) y BSA al 1%.

Incubación con anticuerpos y tinción de los núcleos: Se eliminó la solución de bloqueo y se incubaron las muestras con el anticuerpo primario anti- Integrina $\alpha 11$ a una concentración de 1/500 diluido en solución de bloqueo (**Tabla 14**). Esta incubación se dejó toda la noche a 4°C.

El día siguiente se realizaron dos lavados con PBS-T y se incubaron las muestras con el anticuerpo secundario fluorescente diluido 1:1000 en PBS durante 45 min (**Tabla 14**). Tras esta incubación se lavaron las células 3 veces para eliminar los restos de anticuerpo y se añadió el marcador fluorescente de ácidos nucleicos Hoechst, a una concentración 1:1000 en PBS, el cual permitirá tanto localizar como enfocar el núcleo celular durante la adquisición de imágenes.

Tabla 14. Anticuerpos empleados para la ICQ.

ANTICUERPO PRIMARIO	REFERENCIA, CASA COMERCIAL	DILUCIÓN
Anticuerpo frente a ITGA11	ab198826, Abcam	1/500
ANTICUERPO SECUNDARIO	REFERENCIA, CASA COMERCIAL	DILUCIÓN
Anticuerpo conjugado con FITC frente a IgG de conejo	4030-02, Southern Biotech	1:1000

Preparación de las placas y adquisición de imágenes: Se lavaron las placas 3 veces con PBS-T y, posteriormente, se añadió PBS. Las células fueron observadas a distintos aumentos con el microscopio Leica DMI8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) utilizando los filtros fluorescentes para el UV (detección de los núcleos) y para el fluorocromo FITC (isotiocianato de fluoresceína, detectado en el espectro de luz verde).

Se realizaron controles de autofluorescencia, donde las muestras no se incubaron con anticuerpo primario, sino con solución de bloqueo, para asegurar que no hubiera señales inespecíficas. El resto de protocolo fue igual al descrito.

7. Adhesión dinámica en cámara de flujo paralelo

La interacción de los leucocitos con las células endoteliales se analizó mediante la técnica de adhesión dinámica en cámara de flujo paralelo (*Parallel Flow Chamber*), que simula *in vitro* la circulación sanguínea en las vénulas (220).

Se utilizaron células endoteliales (HUVEC) sembradas en cubreobjetos circulares de plástico de 25 mm de diámetro pretratados con fibronectina (5 µg/mL) que, una vez montada la cámara, se expusieron al flujo leucocitario en una porción de 5 x 25 mm (231, 232) (Figura 26 y 27).

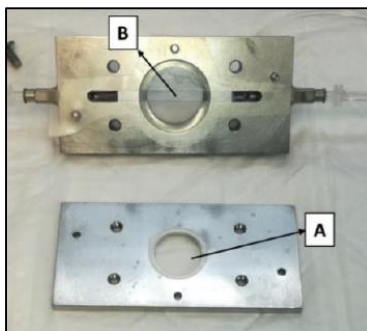


Figura 26. Partes de la cámara de flujo paralelo. La cámara posee una hendidura **(A)**, sobre la cual se sostiene el cubreobjetos circular donde se encuentran las HUVEC crecidas en monocapa, y un canal **(B)**, sobre el que pasara el flujo leucocitario de PBMCs.

La población leucocitaria se resuspendió en tampón DPBS+ (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*), con Ca^{2+} y Mg^{2+} y con seroalbúmina humana (HSA, *Human Serum Albumin*) al 0.1 %.

La cámara se colocó sobre un microscopio invertido (Nikon Eclipse TE 2000-S) conectado a una videocámara (Sony Exware HAD) (**Figura 28**) y se inició la perfusión de 0.5×10^6 PBMC/mL sobre la monocapa de células endoteliales a un flujo de 0.36 mL/min (0.7 dinas/cm^2) controlado mediante una bomba de infusión. Todo el proceso se realizó a 37°C .

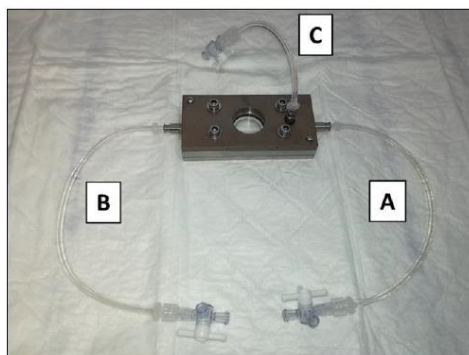


Figura 27. Sistema de montaje de la cámara de flujo paralelo. El flujo de las muestras leucocitarias (PBMCs) accede al canal de la cámara a través de la conexión de entrada **(A)**. Una vez dentro de la cámara, en la hendidura, el flujo leucocitario entra en contacto con el cubreobjetos circular (5 x 25 mm) donde están adheridas las células endoteliales confluentes en monocapa. Una vez atravesada la cámara de adhesión el flujo sale a través de la conexión de salida **(B)**. Existe una tercera conexión en la parte anterosuperior de la cámara que permite la expulsión de posibles burbujas de aire dentro del recorrido **(C)**.

La preparación se observó con un objetivo 40x y las imágenes se captaron durante 5 min con el programa informático NIS Elements AR program. El rodamiento se determinó analizando los leucocitos que circulaban a una velocidad inferior a los eritrocitos en un campo fijo (tramo de 100 μ m) y se expresó en células/min. La adhesión leucocitaria al endotelio se determinó contando el número de leucocitos que mantuvieron contacto estable con la monocapa durante 30 seg en un total de 5 campos adicionales (células adheridas/mm²) (**Figura 29**).

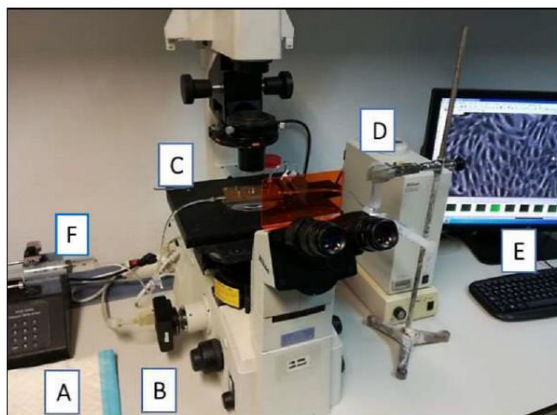


Figura 28. Sistema de montaje de la cámara de flujo paralelo sobre microscopio invertido. (A) Bomba de infusión/succión, (B) cámara de video, (C) cámara de flujo paralelo, (D) jeringa invertida con la suspensión de PBMCs, (E) ordenador conectado a la videocámara para la adquisición de imágenes y (F) jeringa de desechos conectada a la bomba de succión.

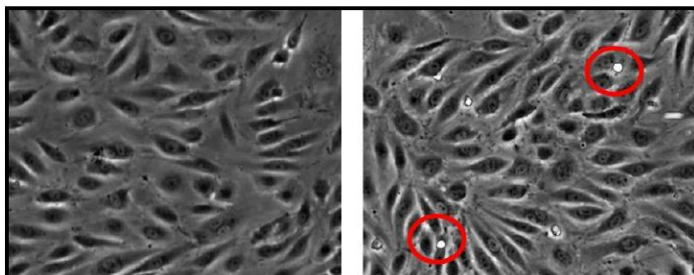


Figura 29. Imágenes representativas de la interacción leucocito-endorotelo. Endotelio no-activado (izquierda), no se aprecian leucocitos. Endotelio activado (derecha), se observan leucocitos adheridos a las células endoteliales.

8. Ensayo de cicatrización de heridas

La capacidad migratoria de las células endoteliales se analizó mediante un ensayo *in vitro* de cicatrización de heridas (*Wound Healing Assay*) en presencia de diferentes estímulos y condiciones.

Las HUVEC se sembraron en placas de 48 pocillos (30000 células / pocillo) pre-tatadas con colágeno tipo I (dilución 1/167 en ácido acético 20 nM), tanto

para conseguir una mejor adherencia celular, como para estimular los receptores de colágeno presentes en la membrana celular. Tras 24 h, cuando las HUVEC alcanzaron la confluencia deseada, se realizó un raspado en el eje central de los pocillos con una punta de pipeta de 10 μ L. Tras lavar para retirar las células desprendidas del plástico y añadir el medio con los tratamientos deseados, se realizaron fotos a través del microscopio de fluorescencia invertido Leica DMI8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) con el objetivo 4X para valorar la situación a tiempo 0. Transcurrido el tiempo del tratamiento, se procedió a fijar las HUVEC con formalina al 2%, y se realizaron las fotos correspondientes al tiempo final.

Las áreas de las heridas se determinaron mediante el software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) a partir de 3 fotografías representativas de cada pocillo. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de herida cerrada, tomando como referencia el área en tiempo 0 h como el 0 % de herida cerrada.

9. Ensayo de formación de tubos

La capacidad de formación de nuevos capilares fue estudiada en HUVEC utilizando Geltrex™ LDEV-Free Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix, una forma soluble de membrana basal que se purifica a partir de células tumorales de Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) cuya composición incluye laminina, colágeno IV, entactina y proteoglicanos de heparán sulfato.

La gelificación de la matriz se realizó en placas de 48 pocillos, durante 30 min a 37°C, siguiendo el protocolo del fabricante, tras lo cual, sembramos las HUVEC (65000 células / pocillo) en medio EBM-2 completo. Tras una incubación de durante 7 horas (37°C, atmósfera húmeda, 5 % de CO₂) se tomó una imagen a través del objetivo 4X en la zona central de cada pocillo y 5 imágenes de 5

campos aleatoriamente elegidos a través del objetivo 10X. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio de invertido Leica DMI8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) y analizadas con el software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE.UU.) con la ayuda del macro *Angiogenesis Analyzer* (233) (Figura 30).

Los parámetros que se tuvieron en cuenta para la cuantificación de la formación de capilares son los siguientes:

- **Nodos (*nodes*):** son las estructuras mínimas que permiten una bifurcación en una red esqueletizada, en las uniones/cruces y las extremidades. Un píxel correspondía a un nodo cuando tenía al menos 3 píxeles vecinos.
- **Ramificaciones (*branches*):** son líneas que unen un cruce y un extremo.
- **Cruces o uniones (*junctions*):** son grupos de nodos que forman una bifurcación.

Los resultados fueron expresados como el número de nodos, ramificaciones y uniones formadas, tomando como referencia la angiogénesis basal del control (sin tratamiento).

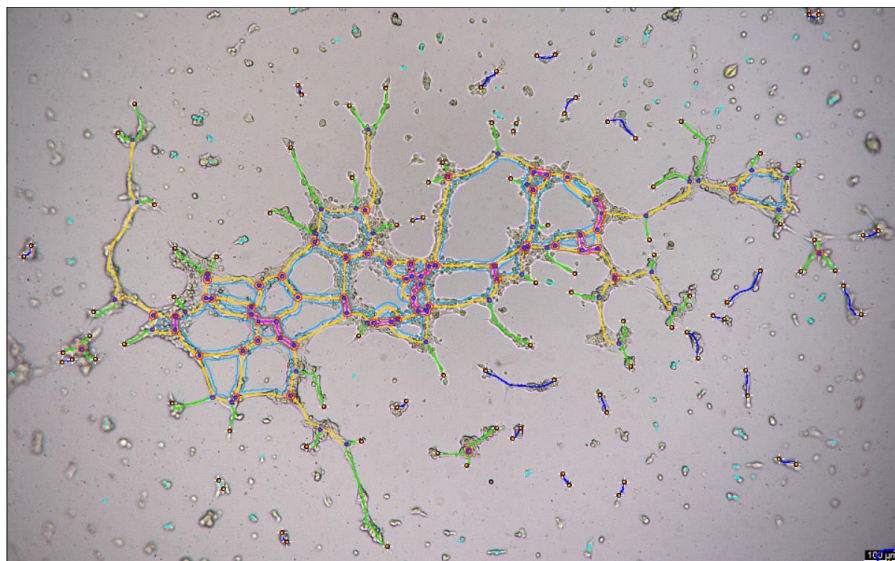


Figura 30. Proceso de cuantificación de la formación de capilares en HUVEC mediante el macro *Angiogenesis Analyzer* (Image J).

10. Citometría de flujo

La expresión de moléculas de adhesión se determinó mediante citometría de flujo utilizando un citómetro de flujo (FACSCalibur, BD™). La población de HUVEC y de leucocitos se identificó en función de sus características específicas de tamaño y granulosidad (*Forward Scatter* -FS- y *Side Scatter* -SS-, respectivamente). La intensidad de fluorescencia media se utilizó como marcador de expresión de las diferentes moléculas de adhesión analizadas y los datos se relativizaron con el valor del grupo control sin tratamiento. Por muestra se analizaron 10.000 eventos.

Las HUVEC tratadas se despegaron con tripsina y la suspensión celular se incubó 20 min (4°C, oscuridad) en presencia de anticuerpos específicos marcados con fluorescencia FITC o PE contra E-selectina (CD62E), ICAM-1 (CD54) y VCAM-1 (CD106). En las poblaciones leucocitarias se utilizaron anticuerpos contra L-selectina (CD62L), las diferentes subunidades de las integrinas β 2

(CD18, CD11a, CD11b, CD11c) y la integrina $\alpha 4\beta 1$ o VLA-4 (CD49d) (**Tabla 15**). Después de la incubación, se fijaron las células con formalina al 10% y luego se analizaron las muestras en el citómetro.

Tabla 15. Anticuerpos frente a humano utilizados en la citometría de flujo.

ANTICUERPO	Casa comercial
Anticuerpo frente CD62E conjugado con PE	BD Biosciences
Anticuerpo frente CD54 conjugado con PE	BD Biosciences
Anticuerpo frente CD106 conjugado con FITC	BD Biosciences
Anticuerpo frente CD62L conjugado con FITC	BD Biosciences
Anticuerpo frente CD18 conjugado con FITC	BD Biosciences
Anticuerpo frente CD11a conjugado con FITC	BD Biosciences
Anticuerpo frente CD11b conjugado con PE	BD Biosciences
Anticuerpo frente CD11c conjugado con PE	BD Biosciences

11. Análisis estadístico

Los datos se presentan como media $\pm$ SEM o como mediana y rango intercuartil. Se utilizaron pruebas de normalidad para comprobar su distribución. La comparación entre dos grupos se realizó mediante el test T de Student (datos con distribución normal) o el test de Mann-Whitney (datos con distribución no normal). Cuando las muestras eran pareadas, estos test se sustituyeron por el test T de Student pareado o por el test de Wilcoxon, respectivamente. La comparación entre tres grupos se realizó mediante el test de ANOVA de una vía seguido de la prueba de Tukey (datos con distribución normal) o la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn (datos con distribución no normal). La correlación entre los diferentes sets de datos se analizó mediante el coeficiente de correlación de Pearson (datos con distribución normal) o de Spearman (datos con distribución no normal). En todos los casos, se consideraron significativos los valores de p inferiores a 0,05. Los análisis se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism® 8.0a (GraphPad Prism® Software Inc., La Jolla, CA, USA).

12. Reactivos

En la **Tabla 16** se detallan todos los reactivos empleados durante la realización de la tesis y la casa comercial de la que fueron obtenidos.

Tabla 16. Reactivos empleados.

REACTIVO	CASA COMERCIAL
Ácido acético	Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos
Ácido clorhídrico (HCl)	Panreac Química S.L.U., Barcelona, España
Ácido succínico	Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos
Acrilamida (30%)	Panreac Química S.L.U., Barcelona, España
Agua tratada con DEPC	Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos
Albúmina Sérica Bovina (BSA)	Fisher Scientific, Hampton, NH, EE. UU.
Albúmina Sérica Humana (HSA) (25%)	Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos
Azida de sodio (NaN₃)	Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos
Azul de tripano	Gibco™ Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos
Bicarbonato de sodio (NaHCO₃)	Panreac Química S.L.U., Barcelona, España
Cloroformo	Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos
Cloruro férrico	Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos
CoEpiCM medio de cultivo	Innoprot, Bizkaia, España
Colagenasa	Gibco™ Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos
Colágeno tipo 1 de cola de rata (tratamiento de placas)	Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos

cOplete™ (cóctel inhibidor de proteasas)	Merck KGaA, Darmstadt, Alemania
Cubre de plástico de 25 mm de diámetro	Nunc™, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos
DAB Enhanced Liquid Substrate System (sustrato revelador IHQ)	Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos
Dako Target Retrieval Solution 10X (solución desenmascaradora de antígenos)	Agilent, Santa Clara, CA, EE. UU.
Dextran Sulfate Sodium (DSS)	MP Biomedicals, Santa Ana, EE. UU.
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos
DLL4 (péptido)	SRP3026. Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos
Dodecil sulfato de sodio (SDS)	Fisher BioReagents™ Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos
DPX® Mountant (medio de montaje para histología)	Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos
Dulbecco's PBS con Ca²⁺ y Mg²⁺ (DPBS+)	Lonza, Basilea, Suiza
Dulbecco's PBS sin Ca²⁺ y Mg²⁺ (DPBS-)	Lonza, Basilea, Suiza
EBM-2 medio de cultivo + kit suplementos	Lonza, Basilea, Suiza
EGM-2 medio de cultivo	Lonza, Basilea, Suiza
Etanol	J.T. Baker™, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos
EZ-RUN Prestained Rec Protein Ladder (marcador de peso molecular)	Fisher BioReagents™ Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos
Factor de Crecimiento Transformante- β2 (TGFβ2)	Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos
Factor de Necrosis Tumoral (TNFβ2) humano	Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos
Factor de Necrosis Tumoral (TNFβ2) murino	Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos

Fenol ácido:cloroformo, pH 4,5 (para extracción miARNs)	Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos
Fibronectina	Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos
Ficoll-Paque™ Plus	GE Healthcare, Chicago, Estados Unidos
Formalina 10%	Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos
Geltrex™ LDEV-Free Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix (matriz para el cultivo celular)	Gibco™ Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos
Glicina	Fisher BioReagents™ Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos
Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)	Lonza, Basilea, Suiza
Hematoxilina, Gill No. 3	Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos
Hidróxido Amónico (NH₄OH)	Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos
Histofix® Preservative	Panreac Química S.L.U., Barcelona, España
Hoechst 33342 (marcador fluorescente de ácidos nucleicos)	Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos
Immobilon Crescendo Western HRP Substrate (sustrato revelador WB)	Merck-Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania
Immobilon Forte Wester HRP Substrate (sustrato revelador WB)	Merck-Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania
Ketamina	Merial, Lyon, Francia
Kit EGM™-2 SingleQuots	Lonza, Basilea, Suiza
Kit de aislamiento de ARNm mirVana™, sin fenol	Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos
Kit de aislamiento RNA spin Mini illustra™	Cytiva Europe GMBH, Barcelona, España

Kit de ensayo de proteínas BCA Pierce™	Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos
Kit de Reactivos para RT PrimeScript™ (Perfect Real Time)	Takara™ Takara Bio Inc., Shiga, Japan
Kit para la RT TaqMan™ MicroARN Reverse Transcription	ThermoFisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos
Kit Universal ABC Vectastain® Elite®	Vector Laboratories, Peterborough, UK
Leche en polvo sin grasa	Mercadona, España
Lipofectamina RNAiMAX (reactivo de transfección)	Invitrogen™ Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos
Master Mix universal TaqMan™ II (sin UNG)	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos
McCoy medio de cultivo	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos
Medio de cultivo de fibroblastos	Innoprot, Bizkaia, España
NF-56-EJ40 (antagonista SUCNR1/GPR91)	MedChemExpress (MCE), Nueva Jersey, Estados Unidos
N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED)	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos
Penicilina/ estreptomicina/ anfotericina	Gibco™ Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos
Peróxido de hidrogeno (H₂O₂) (30%)	Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos
Persulfato de amonio (APS)	SERVA, Heidelberg, Germany
PhosphoSafe Extraction Reagent (tampón para la extracción de proteínas)	Merck KGaA, Darmstadt, Alemania
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos
RPMI 1640 suplementado con 20 mM HEPES	Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos
Succinato	Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos
Suero de cabra	Gibco™ Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos

Suero Fetal Bovino (FBS)	Lonza, Basilea, Suiza
Suero Fisiológico (NaCl) (0.9%)	B. Braun, Melsungen, Alemania
Sulfato de magnesio (MgSO₄)	Panreac Química S.L.U., Barcelona, España
SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (sustrato revelador WB)	Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos
Tampón Fosfato Salino (PBS)	Gibco™ Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos
TB Green™ Premix Ex Taq™ (Tli RNase H Plus)	Takara™ Takara Bio Inc., Shiga, Japan
Tinción de ADN GelRed® (geles de agarosa)	Fisher Scientific™, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos
Tripsina	Gibco™ Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos
TriPure™ Isolation Reagent (reactivo extracción ARN)	Roche Life Science, Basilea, Sweden
Tris ((HOCH₂)₃CNH₂)	Fisher BioReagents™ Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos
Tritón-X	Acros Organics, 422365000 cas:9002-93-1
Tubos citrato sódico	BD Vacutainer, Beckton Dickinson, Nueva Jersey, Estados Unidos
Tween-20	Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos
Xilacina	Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos
Xileno	Panreac Química S.L.U., Barcelona, España

13. Comités éticos

Tanto el Comité Ético del Hospital Clínico Universitario de Valencia como el de Bioseguridad de la Universitat de València aprobaron el proyecto dentro del cual se enmarca este estudio con muestras de cordón umbilical humano y sangre humana. Todos los pacientes firmaron el correspondiente consentimiento informado.

En el caso de los estudios con resecciones humanas, el Comité Ético del Hospital de Manises y el Comité de Bioseguridad de la Universitat de València también aprobaron el proyecto. Igual que en el caso anterior, todos los pacientes firmaron el consentimiento informado.

El Comité Ético de Experimentación Animal de la Universitat de València, así como de la Conselleria de Agricultura, Medio Ambiente, Cambio Climático y Desarrollo Rural de la Generalitat Valenciana aprobó los estudios con animales de experimentación realizados en este trabajo, los cuales están en concordancia con las directrices institucionales para el cuidado y uso de animales de experimentación de laboratorio. Procedimientos aprobados:

- 2018/VSC/PEA/0179.
- 2021/VSC/PEA/0059.
- 2021/VSC/PEA/0244.



RESULTADOS

1. Estudio de secuenciación de ARNm en muestras de pacientes con EC

Analizamos inicialmente el patrón de expresión génica de las muestras de tejido ileal afecto y no afecto de pacientes con EC mediante secuenciación de ARNm (RNA-seq). Dicho análisis reveló 8151 genes expresados diferencialmente en ambos tipos de muestra, de los cuales 4932 alcanzaron significación estadística. Entre ellos, 2283 genes estaban significativamente regulados al alza, mientras que 2649 estaban significativamente regulados a la baja. El análisis de componentes principales (PCA) de los perfiles transcriptómicos mostró que las muestras no afectas y afectas formaban dos grupos distintos (**Figura 31A**). En el gráfico tipo volcán se muestra una visión global de las características transcriptómicas en la que se indican los 50 genes modificados en mayor medida (**Figura 31B**).

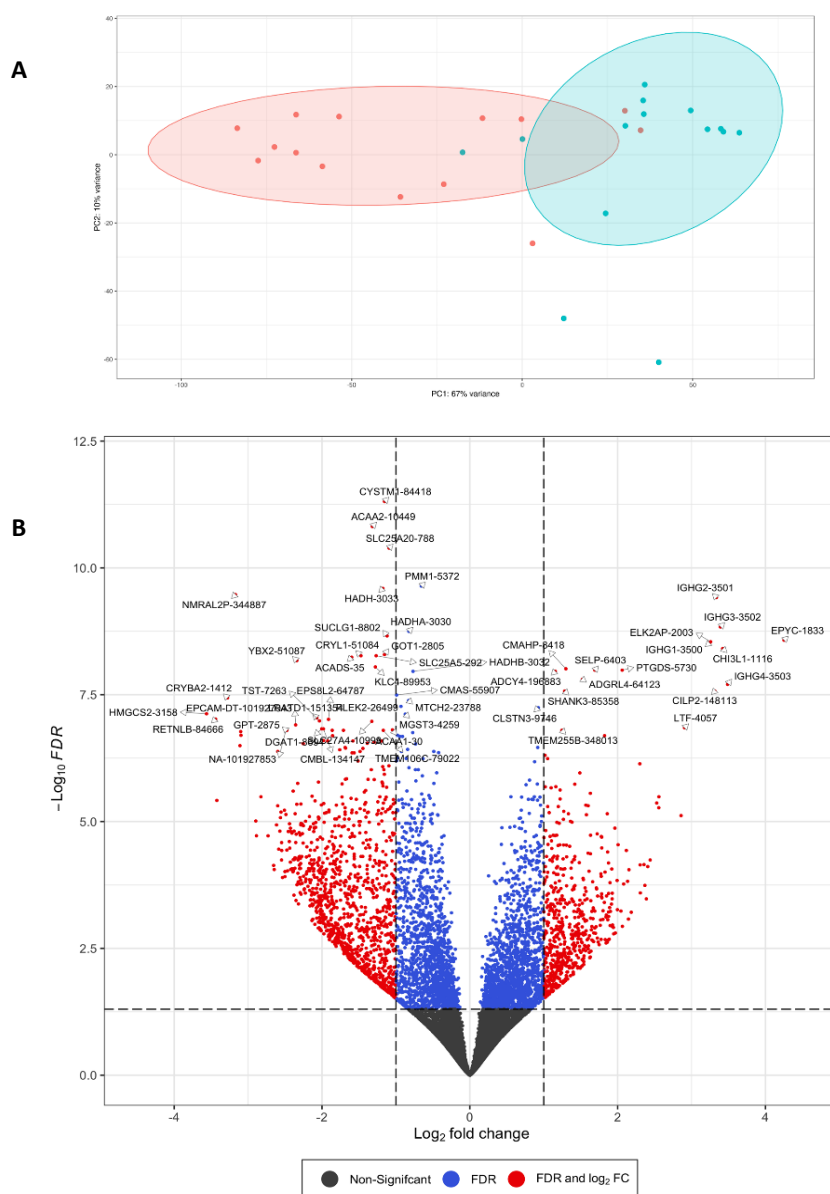


Figura 31. Existe una expresión diferencial en las muestras ileales de la parte afecta y la parte no afecta de pacientes con EC. (A) El análisis de componentes principales (*Principal Component Analysis, PCA*), que extrae patrones sólidos de conjuntos de datos grandes y complejos y facilita la comparación de los perfiles de expresión de cada muestra (puntos en la gráfica), muestra la agrupación de las muestras ileales de la parte afecta (rojo) y las muestras ileales de la parte no afecta emparejada del mismo paciente con EC (verde). Ello indica que existe similitud en el patrón de expresión génica dentro de ambos grupos y, a su vez, un patrón

diferencial entre grupos. **(B)** El *volcano plot* muestra la dispersión de la significatividad estadística (P valor ajustado a comparaciones múltiples y FDR/false discovery rate) en función de la magnitud del cambio (*fold change*) para los genes diferencialmente expresados en ambos tipos de muestra. Los genes analizados pueden estar sobreexpresados en las muestras (parte derecha) o regulados a la baja (parte izquierda), y los cambios más significativos se encuentran en la parte superior de la gráfica. En la gráfica se indican los 50 genes modificados en mayor medida.

El análisis de enriquecimiento de ontología genética (GO) reveló 513 términos GO significativamente inhibidos que se relacionaban principalmente con la regulación del metabolismo y la respiración celular, mientras que los genes sobreexpresados en las lesiones de EC se vincularon a un total de 998 términos GO significativamente regulados al alza. La **Figura 32** muestra los 10 términos más sobrerrepresentados dentro de las categorías de procesos biológicos (BP), componentes celulares (CC) o función molecular (MF). Entre ellos, destacan los relacionados con la composición y organización de la MEC. Cabe resaltar además la presencia de procesos referentes a la bioactividad de los componentes de la matriz (p. ej. *glycosamin binding*, *integrin binding*, *collagen binding*, *extracellular matrix structural constituent conferring tensile strength*) (**Figura 32**).

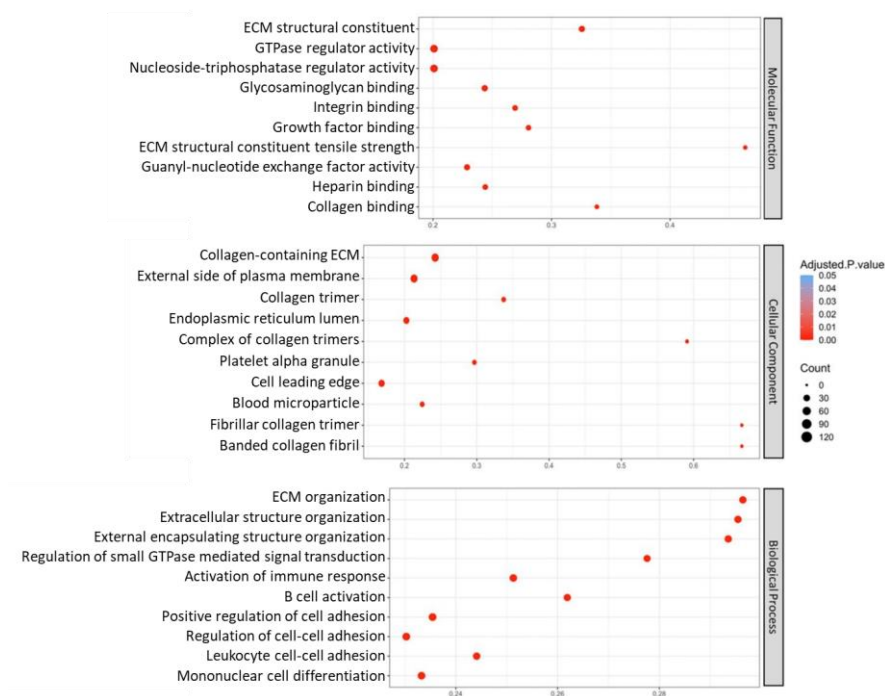


Figura 32. Diagrama de puntos que muestra los resultados más significativos del análisis de enriquecimiento. Los términos GO más regulados al alza en muestras de pacientes con EC están relacionados con la organización y composición de la MEC, así como, con la adhesión celular y la función de algunos componentes de la MEC (p.e. unión de la glucosamina, de las integrinas o el colágeno). Adjusted P value: Valor de p que tiene en cuenta las comparaciones múltiples y controla FDR/false discovery rate.

Con la finalidad de inferir qué mediadores podrían estar implicados en los cambios detectados, examinamos los 200 términos GO más significativamente sobrerrepresentados. Llamó nuestra atención que 72 de ellos (el 36%) incluían elementos pertenecientes a la ruta de señalización Notch (**Figura 33**). Revisamos las funciones que regulaban dichos términos y los clasificamos en cinco categorías: (i) modulación de la MEC, (ii) modulación de la respuesta inmunitaria, (iii) modulación del compartimento vascular / endotelial, (iv) regulación del compartimento epitelial, y (v) procesos asociados a la interacción física de las células con su entorno y el movimiento celular.

ARN-seq (EC-NA/EC-A)

Primeros 200 términos GO regulados al alza: 72 de ellos contienen **elementos de la vía de señalización Notch** (36%) y están involucrados con la **MEC**, la **respuesta inmunitaria**, **cambios epiteliales**, **cambios endoteliales** ↔ **motilidad celular**

# p.adjust	Description	#	Description
1	extracellular matrix organization	101	negative regulation of cell adhesion
2	extracellular structure organization	105	urogenital system development
3	external encapsulating structure organization	106	regulation of epithelial cell proliferation
7	B cell activation	108	epithelial cell proliferation
9	regulation of cell-cell adhesion	112	positive regulation of Ras protein signal transduction
11	mononuclear cell differentiation	115	cytokine-mediated signaling pathway
12	lymphocyte differentiation	119	lymphocyte activation involved in immune response
24	Ras protein signal transduction	125	endothelial cell migration
25	bone development	128	positive regulation of MAPK cascade
33	regulation of Ras protein signal transduction	130	endothelium development
43	T cell differentiation	132	positive regulation of small GTPase mediated signal transduction
46	B cell differentiation	134	heart valve development
	adaptive immune response based on somatic recombination	136	regulation of epithelial cell migration
48	of immune receptors built from immunoglobulin superfamily domains	138	epithelial tube morphogenesis
51	ameboid-type cell migration	140	negative regulation of locomotion
52	regulation of leukocyte differentiation	141	glomerulus development
54	connective tissue development	147	renal system vasculature development
56	cell chemotaxis	148	kidney vasculature development
61	regulation of chemotaxis	150	aorta development
67	ossification	152	embryonic organ development
70	leukocyte activation involved in immune response	153	renal system development
72	cell-substrate adhesion	154	heart morphogenesis
76	cell activation involved in immune response	156	negative regulation of response to external stimulus
78	epithelium migration	157	mesenchyme development
80	regulation of hemopoiesis	162	glomerulus vasculature development
81	epithelial cell migration	164	kidney development
83	positive regulation of leukocyte differentiation	165	heart valve morphogenesis
84	positive regulation of hemopoiesis	167	ERK1 and ERK2 cascade
85	tissue migration	168	response to peptide
90	artery development	173	nephron development
97	cellular response to vascular endothelial growth factor stimulus	174	morphogenesis of a branching structure
99	wound healing	178	tissue remodeling
		181	regulation of ERK1 and ERK2 cascade
		188	regulation of cell-substrate adhesion
		189	myeloid leukocyte differentiation
		192	myeloid cell differentiation
		193	mature B cell differentiation
		195	positive regulation of nervous system development
		197	positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade
		198	regulation of endothelial cell proliferation
		200	morphogenesis of a branching epithelium

Figura 33. 72 de los primeros 200 términos GO sobrerrepresentados en muestras ileales afectas de pacientes con EC (ordenados según la significatividad estadística), están relacionados con la vía de señalización Notch. Dichos términos se clasificaron según las funciones que regulaban en 5 categorías: (i) en color naranja los procesos relacionados con la modulación de la MEC, (ii) en rojo los relacionados con la modulación de la respuesta inmunitaria, (iii) en azul los asociados a la modulación del compartimento vascular/endotelial y (iv) en verde los relativos a la regulación del compartimento epitelial. Por último, se marcaron en gris (v) todos los procesos relacionados con la motilidad celular (interacción física de las células con su entorno y el movimiento celular). # P-adjust: posición que ocupa cada término en el listado ordenado por valor de P ajustado a comparaciones múltiples y FDR/false discovery rate, de menor a mayor.

Este análisis sugería que la ruta Notch podría estar influyendo en las alteraciones estructurales que se observan en las complicaciones de la EC y, por ello, centramos nuestro interés en el estudio del papel de esta vía de señalización en la EC.

2. Las muestras ileales de pacientes con EC muestran cambios en la expresión de componentes de la vía Notch

El primer objetivo fue caracterizar el patrón de expresión de los constituyentes de la ruta Notch en estas muestras, empezando por confirmar mediante RT-qPCR los cambios en la expresión génica detectados en el estudio de secuenciación. Añadimos el grupo control a la comparativa y, como se muestra en la **Figura 34**, observamos que la parte afecta sobreexpresa los receptores NOTCH3 y NOTCH4, tanto si lo comparábamos con las muestras control, como si lo comparábamos con las muestras de pacientes EC no afectas.

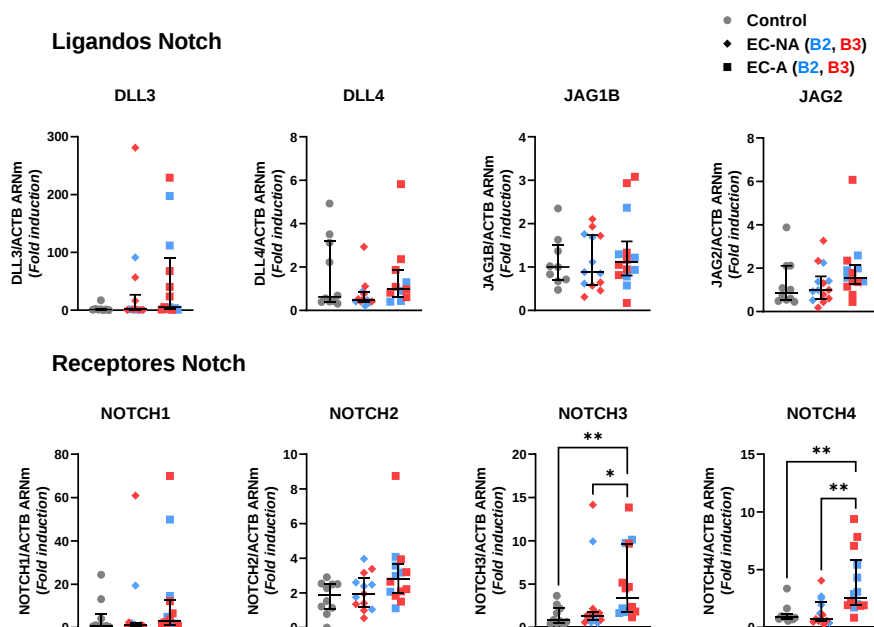


Figura 34. Las muestras ileales afectas de pacientes con EC muestran mayor expresión génica de los receptores NOTCH3 y NOTCH4. Expresión de ARNm (expresada como *fold induction* frente a β -actina) en tejido ileal de pacientes control, y en tejido no afecto y afecto de pacientes con EC (EC-NA y EC-A, respectivamente). Se representan los datos individuales (EC estenótica o B2: azul; EC penetrante o B3: rojo), la mediana y el rango intercuartil (* $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$; Kruskal-Wallis + Dunn test).

En cuanto a la expresión proteica, observamos mediante western blot un aumento significativo de Notch3 respecto de las muestras control, sin cambios significativos en los niveles proteicos de Notch4 (**Figura 35**).

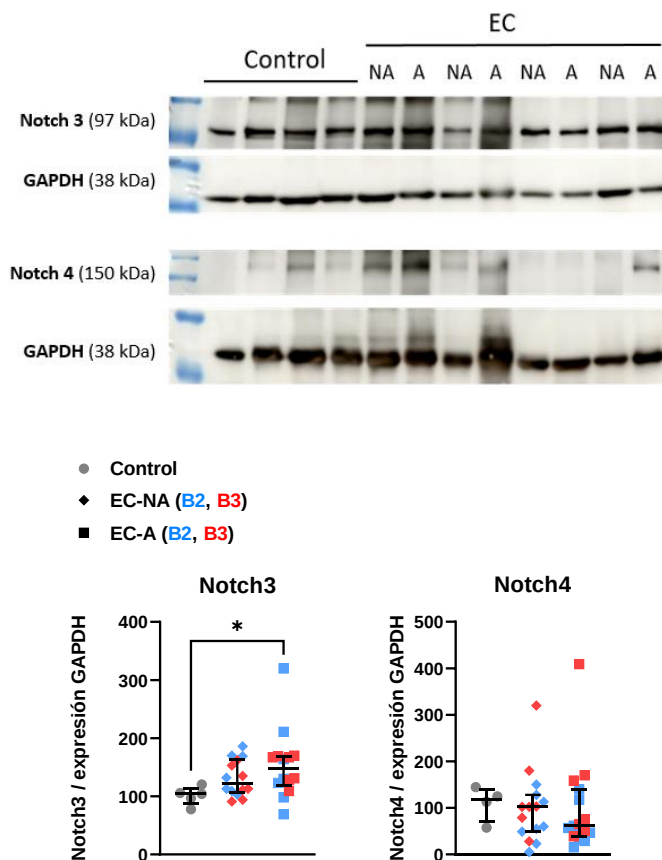


Figura 35. Las muestras ileales afectas de pacientes con EC muestran mayor expresión proteica del receptor Notch 3. Imagen representativa del análisis por WB de las proteínas Notch3 y Notch4 en tejido ileal de pacientes control, y en tejido no afecto y afecto de pacientes con EC (EC-NA y EC-A, respectivamente). Los gráficos muestran la cuantificación de la expresión de ambas proteínas referida a la expresión de GAPDH y representada como porcentaje relativo al nivel observado en muestras control. Se representan los datos individuales (EC estenótica o B2: azul; EC penetrante o B3: rojo), la mediana y el rango intercuartil (*P<0.05, Kruskal-Wallis + Dunn test).

Por último, los estudios inmunohistoquímicos indicaron que Notch3 se expresaba principalmente en el tejido muscular liso, células de la lámina propia y, de forma muy intensa, en el endotelio vascular (**Figura 36**). Notch4 también se detectó en células de la lámina propia, pero no en el endotelio vascular (**Figura 36**).

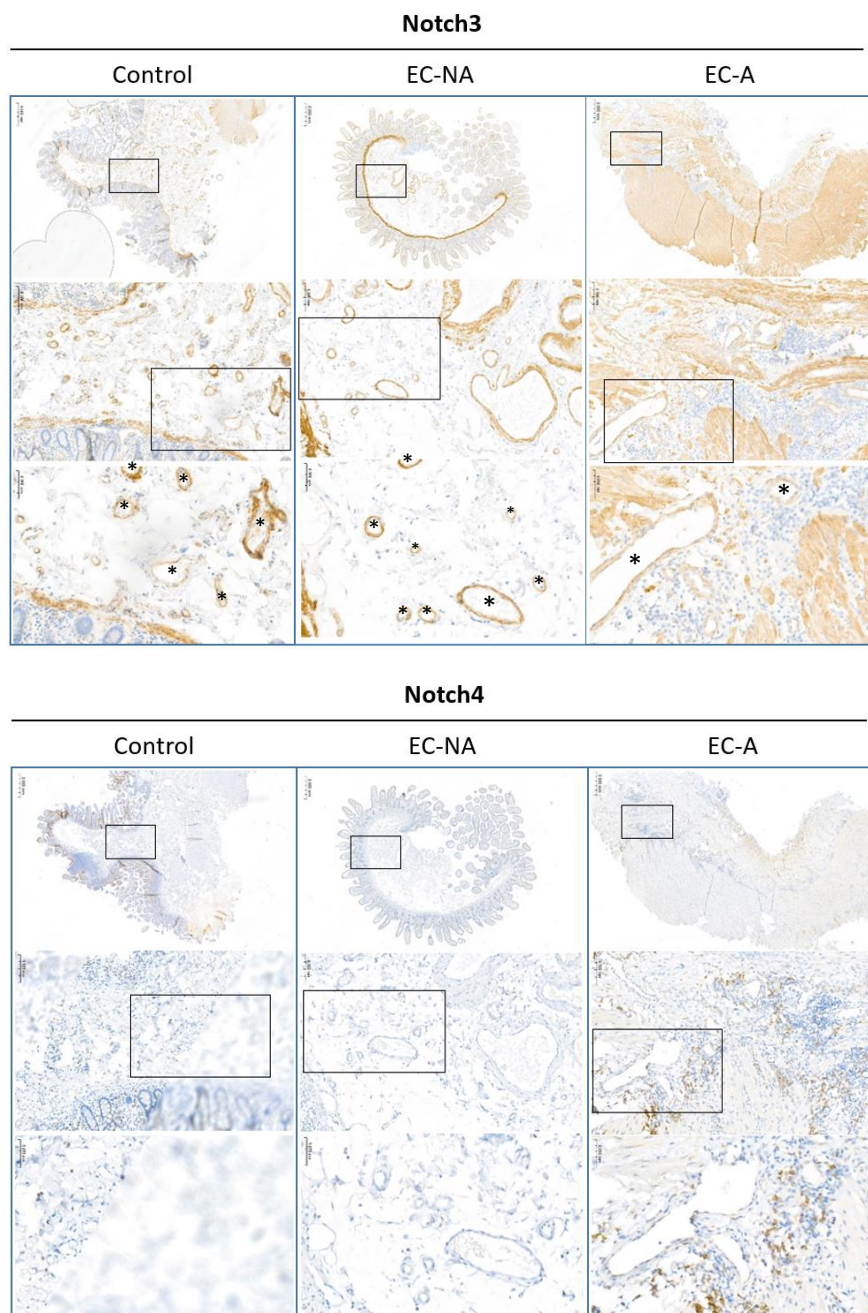


Figura 36. Inmunotinción de los receptores Notch 3 y Notch 4 en el tejido ileal de pacientes control y tejido ileal afecto y no afecto de pacientes con EC. En los tres tipos de muestras se confirma la expresión de Notch3 en el endotelio vascular (*). Se puede observar también que se sobreexpresa en células de la lámina propia. En las muestras EC-A se detectó Notch3 en toda la parte fibrótica. No se detecta expresión del receptor Notch4 en el endotelio vascular.

3. Las muestras ileales de pacientes con EC muestran expansión de los compartimentos mesenquimal y vascular y pérdida del compartimento epitelial

3.1. Matriz extracelular

De entre los genes sobreexpresados en el íleon afecto de los pacientes con EC incluidos en los términos GO (**Tabla 17**), nos centramos en los relativos a constituyentes de la matriz y enzimas que la modulan, identificando más de 20 tipos de colágenos, glicoproteínas no colágenas y proteoglicanos, así como varias metaloproteinasas, y muchos miembros de la familia ADAM y ADAMTS (**Figura 37**).

Tabla 17. Términos GO relacionados con la modulación y organización del compartimento mesenquimal que se encuentran sobrerrepresentados en las lesiones EC.

Términos GO relacionados con la modulación y organización de la MEC	
-	Extracellular matrix organization
-	Extracellular structure organization
-	External encapsulating structure organization

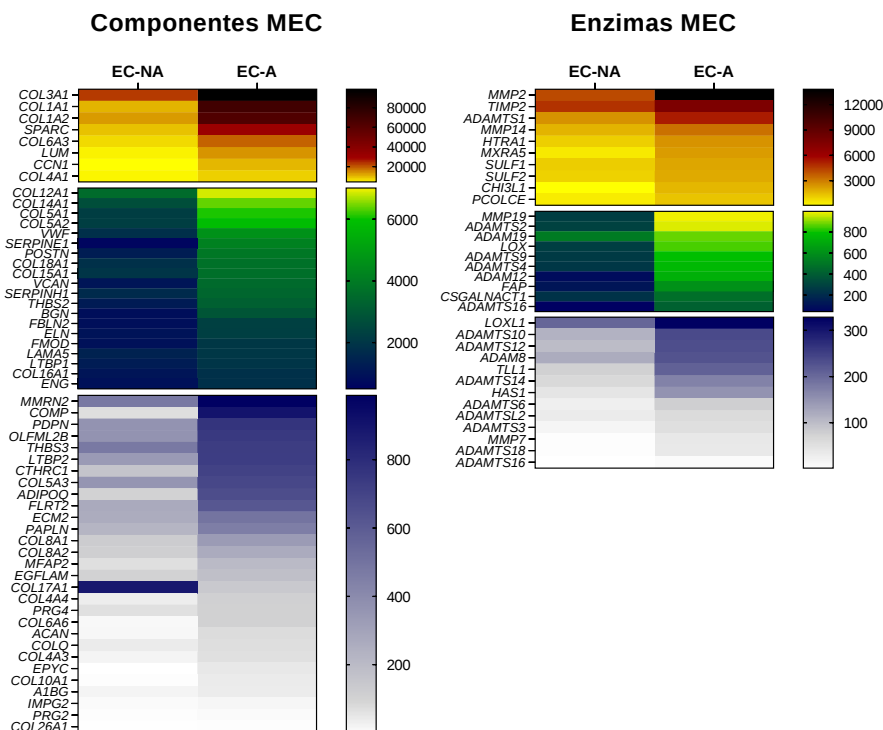


Figura 37. El tejido ileal afecto de pacientes con EC muestra un aumento en la expresión de componentes y moduladores de la matriz extracelular. El mapa de calor muestra el número normalizado de cuentas obtenido en el estudio de secuenciación para cada uno de los genes incluidos en los términos GO relativos a la modulación de la MEC (relacionados arriba) en muestras ileales afectas (EC-A) y no afectas (EC-NA) de los pacientes con EC.

Para validar el resultado obtenido en el estudio de ARN-seq, analizamos la expresión de alguno de los genes que aparecen en la **figura anterior** mediante RT-qPCR en las mismas muestras secuenciadas, añadiendo el grupo control (pacientes sin EC) al análisis. Los resultados corroboraron los datos de secuenciación ya que se observó un aumento significativo en la expresión de COL1A1, COL3A1, COMP, FSCN1, EPYC, BGN, MMP2, MMP19, ADAM12 y CHI3L1 en muestras ileales de la parte afecta respecto a los controles. Así como, un aumento significativo de los genes COL3A1, COMP, EPYC, MMP2, ADAM12 y

CHI3L1 en las muestras de la parte afecta respecto a las muestras de la parte no afecta emparejada de cada paciente con EC (**Figura 38**).

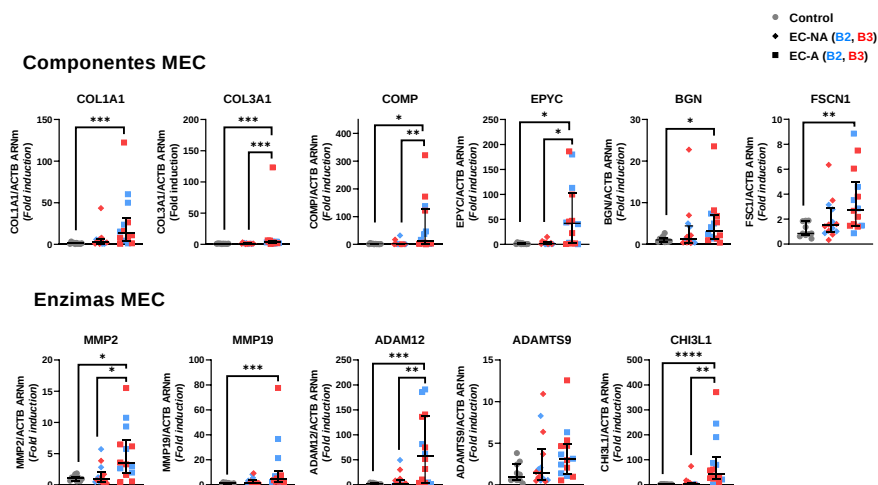


Figura 38. Las muestras ileales afectas de pacientes con EC muestran un incremento en la expresión génica de componentes y enzimas reguladoras de la MEC. Expresión de ARNm (expresada como *fold induction* frente a β -actina) en tejido ileal de pacientes control, y en tejido no afecto y afecto de pacientes con EC (EC-NA y EC-A, respectivamente). Se representan los datos individuales (EC estenótica o B2: azul; EC penetrante o B3: rojo), la mediana y el rango intercuartil (* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ y **** $P<0.0001$; ANOVA + Tukey test o Kruskal-Wallis + Dunn test, según corresponda).

3.2. Compartimento vascular

El siguiente diagrama (**Figura 39**) refleja los cambios en la expresión de todos los genes englobados en los términos relativos al funcionamiento del compartimento vascular y endotelial (**Tabla 18**). De entre ellos, seleccionamos dos marcadores de célula endotelial (PECAM1, CDH5), así como varios genes implicados en la regulación de la función endotelial y la angiogénesis (SERPINE1, ANGPT2, VASH1, VASH2), y analizamos su expresión en muestras ileales por RT-qPCR. Los resultados obtenidos mostraron una sobreexpresión de todos ellos en las muestras afectas de pacientes con EC (**Figura 40**).

Tabla 18. Términos GO relacionados con la modulación del compartimento endotelial que se encuentran sobrerrepresentados en las lesiones EC.

Términos GO relacionados con la modulación del compartimento vascular / endotelial	
-	Artery development
-	Cellular response to vascular endothelial growth factor stimulus
-	Endothelial cell migration
-	Endothelium development
-	Regulation of endothelial cell proliferation

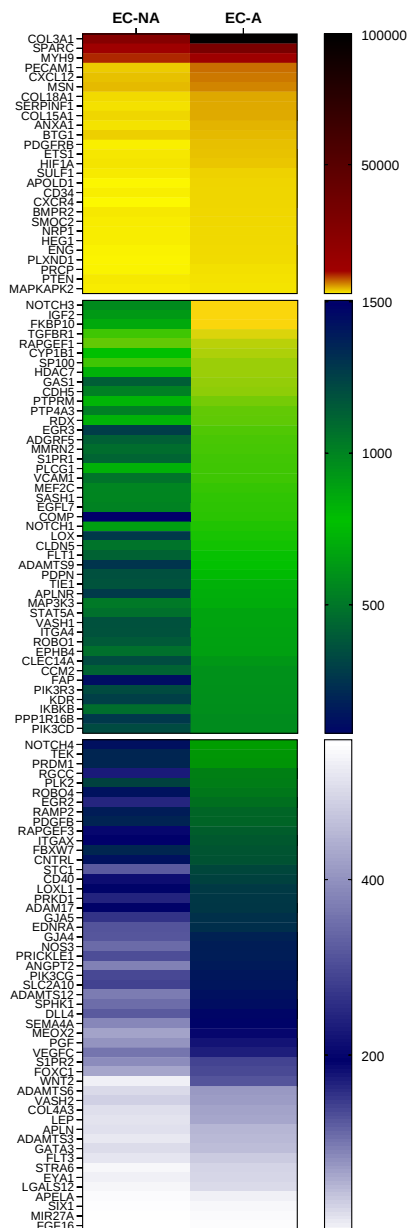
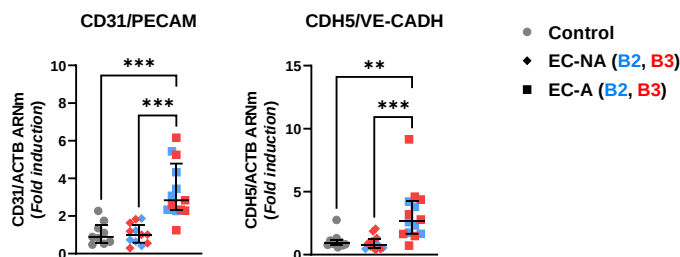


Figura 39. El tejido ileal afecto de pacientes con EC muestra un aumento en la expresión de genes relacionados con el compartimento vascular/endotelial. El mapa de calor muestra el número normalizado de cuentas obtenido en el estudio de secuenciación para cada uno de los genes incluidos en los términos GO relativos a la modulación del compartimento vascular (relacionados arriba) en muestras ileales afectas (EC-A) y no afectas (EC-NA) de los pacientes con EC.

Marcadores célula endotelial



Regulación de la función endotelial y la angiogénesis

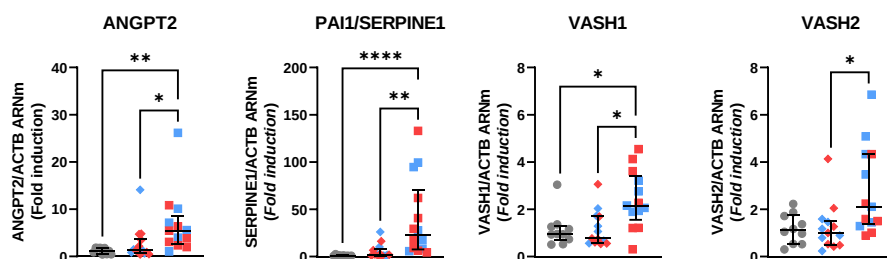


Figura 40. Las muestras ileales afectas de pacientes con EC muestran un incremento en la expresión génica de marcadores endoteliales y de mediadores de la función endotelial y la angiogénesis. Expresión de ARNm (expresada como *fold induction* frente a β -actina) en tejido ileal de pacientes control, y en tejido no afecto y afecto de pacientes con EC (EC-NA y EC-A, respectivamente). Se representan los datos individuales (EC estenótica o B2: azul; EC penetrante o B3: rojo), la mediana y el rango intercuartil (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ y **** $P < 0.0001$; Kruskal-Wallis + Dunn test).

3.3. Compartimento epitelial

Con la finalidad de tener un indicador de los potenciales cambios en el compartimento epitelial en los tres grupos de muestras ileales, analizamos la expresión de CDH1, la cadherina propia de las células epiteliales, obteniéndose una disminución significativa en las muestras afectas respecto de las no afectas (Figura 41).

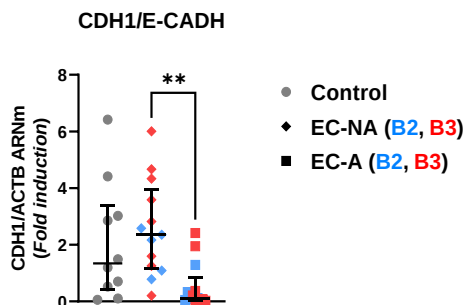


Figura 41. Las muestras ileales afectas de pacientes con EC muestran una reducción en la expresión génica del marcador epitelial CDH1. Expresión de ARNm (expresada como *fold induction* frente a β -actina) en tejido ileal de pacientes control, y en tejido no afecto y afecto de pacientes con EC (EC-NA y EC-A, respectivamente). Se representan los datos individuales (EC estenótica o B2: azul; EC penetrante o B3: rojo), la mediana y el rango intercuartil (** $P < 0.01$, Kruskal-Wallis + Dunn test).

4. Las muestras ileales de pacientes con EC muestran sobreexpresión de integrina $\alpha 11$

Dada la relevancia que, según el análisis de enriquecimiento, tenían las interacciones celulares con la matriz extracelular, y teniendo en cuenta que el colágeno es la proteína más abundante en este medio, analizamos en nuestras muestras la expresión de todos receptores conocidos del colágeno (subunidades α de las integrinas y receptores de dominio discoidina). Como muestra la **Figura 42**, los resultados nos mostraron un aumento en la expresión de la ITGA11 en las muestras afectas respecto a las muestras no afectas emparejadas de cada paciente, sin cambios significativos en el resto de receptores.

Receptores de colágeno

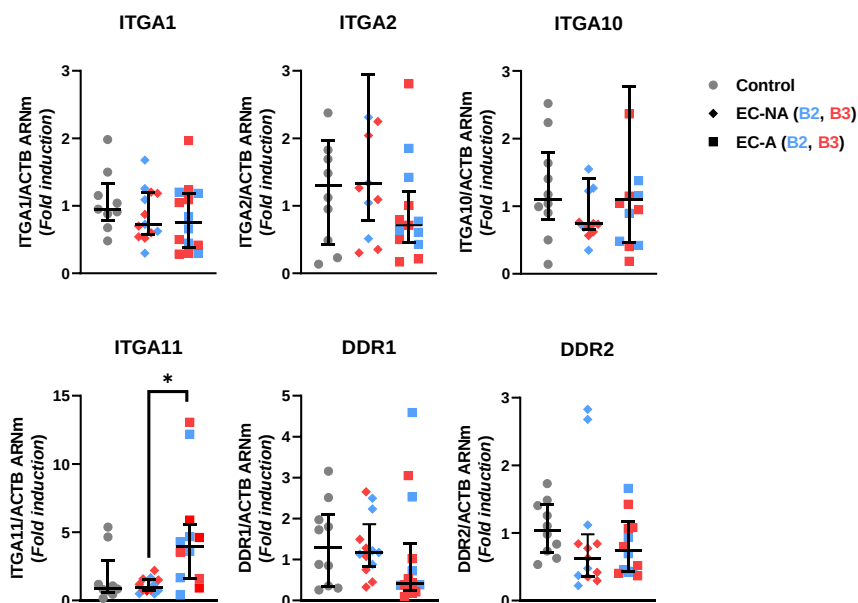


Figura 42. Las muestras ileales afectas de pacientes con EC muestran un incremento en la expresión génica del receptor de colágeno ITGA11. Expresión de ARNm (expresada como *fold induction* frente a β -actina) en tejido ileal de pacientes control, y en tejido no afecto y afecto de pacientes con EC (EC-NA y EC-A, respectivamente). Se representan los datos individuales (EC estenótica o B2: azul; EC penetrante o B3: rojo), la mediana y el rango intercuartil (* $P < 0.05$, Kruskal-Wallis + Dunn test).

El análisis de la expresión proteica de dicha integrina mediante WB mostró su sobreexpresión en muestras de la parte afecta de pacientes con EC respecto a los tejidos control (**Figura 43**).

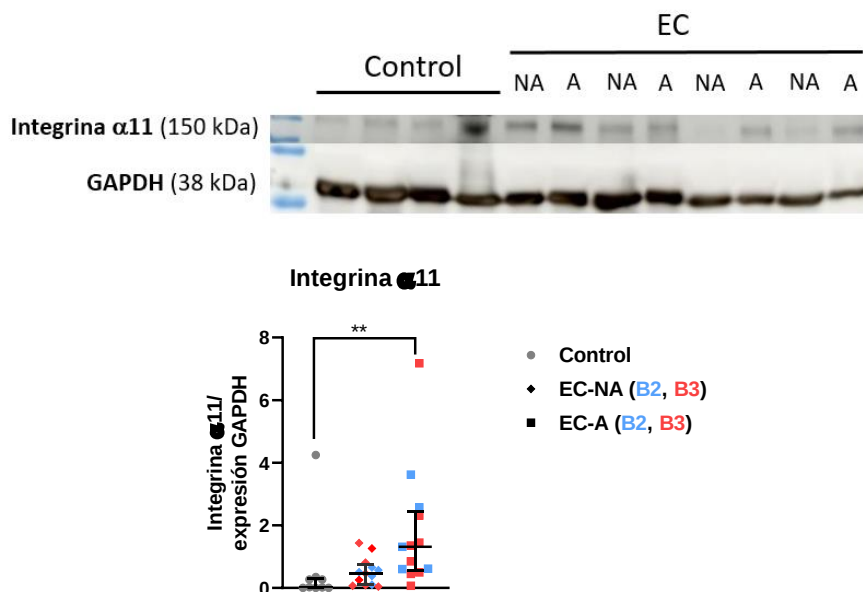


Figura 43. Las muestras ileales afectas de pacientes con EC muestran mayor expresión proteica de la integrina $\alpha 11$. Imagen representativa del análisis por WB de integrina $\alpha 11$ en tejido ileal de pacientes control, y en tejido no afecto y afecto de pacientes con EC (EC-NA y EC-A, respectivamente). Los gráficos muestran la cuantificación de la expresión de la proteína referida a la expresión de GAPDH. Se representan los datos individuales (EC estenótica o B2: azul; EC penetrante o B3: rojo), la mediana y el rango intercuartil (** $P < 0.01$; Kruskal-Wallis + Dunn tests).

Por último, los estudios de IHQ que aparecen en la **Figura 44** detectaron integrina $\alpha 11$ en el endotelio vascular, tanto en la parte afecta como no afecta de los pacientes de EC.

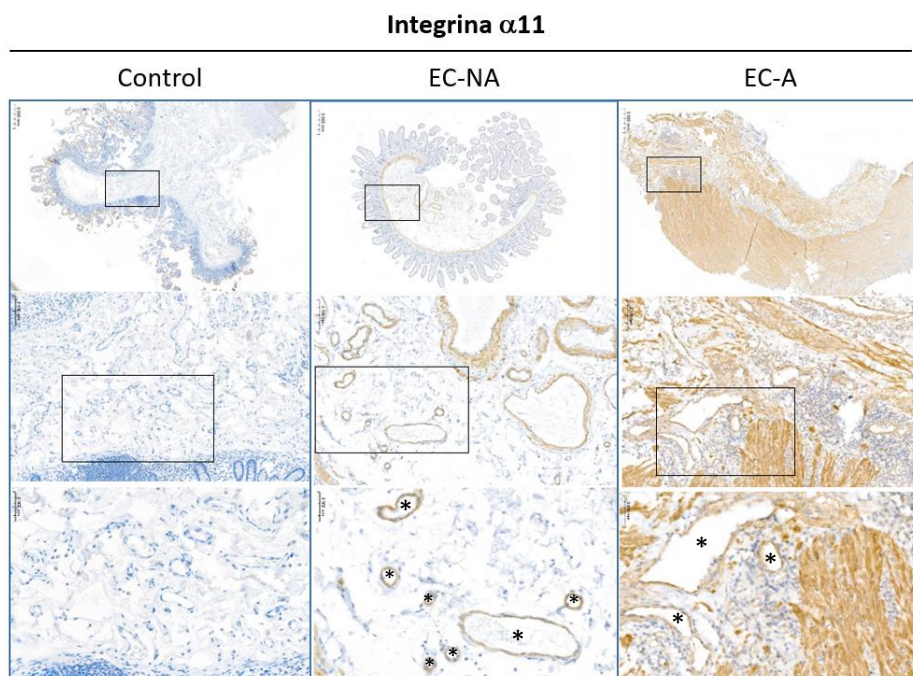


Figura 44. Inmunotinción de la integrina $\alpha 11$ en el tejido ileal de pacientes control y tejido ileal afecto y no afecto de pacientes con EC. Imágenes representativas que muestran su presencia en el endotelio de los vasos presentes en el tejido ileal no afecto y afecto de pacientes con EC (EC-NA y EC-A, respectivamente) (*).

5. La expresión de la integrina $\alpha 11$ y de Notch3 correlaciona con los indicadores de expansión de los compartimentos vascular y mesenquimal y con la reducción epitelial

Con la finalidad de detectar si existía una asociación entre los cambios detectados en relación a la expresión de las moléculas señalizadoras, ruta Notch e ITGA11, y las modificaciones estructurales que se deducían de los resultados anteriores (aumento de MEC y vasculatura, reducción del epitelio), realizamos un análisis de correlación con los genes representativos de cada compartimento (**Figura 45**). Observamos que la expresión de ITGA11 mostraba una correlación positiva con ligandos y receptores de la vía Notch, siendo especialmente significativa en el caso de DLL4 y NOTCH3. La expresión de esta integrina también

se correlacionó positivamente con la de marcadores del compartimento endotelial y de componentes de la matriz extracelular, y negativamente con el nivel del marcador epitelial CDH1. Curiosamente, un patrón semejante de correlación se observó con la expresión de NOTCH3 y DLL4.

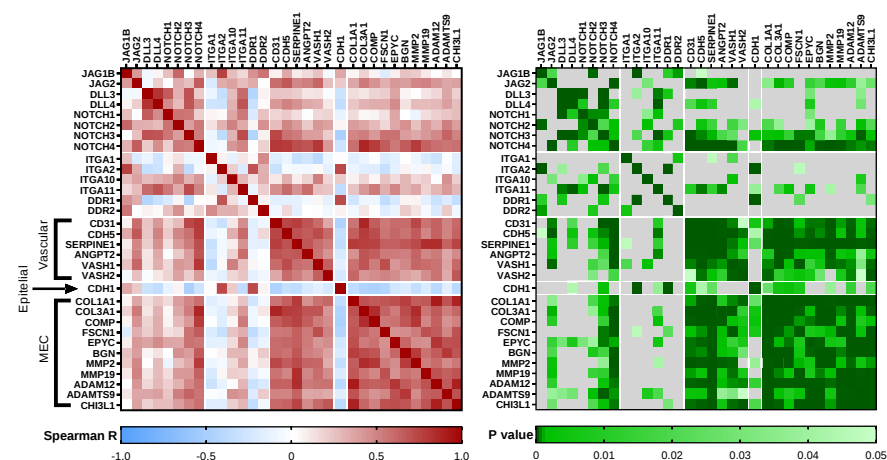


Figura 45. La expresión génica de la integrina $\alpha 11$ muestra una correlación positiva y significativa con la vía de señalización Notch, con los marcadores endoteliales/vasculares y con componentes de la matriz extracelular, y negativa con el marcador epitelial. La primera matriz muestra el nivel de correlación (R de Spearman) y la segunda indica el grado de significatividad (P valor) de dichas correlaciones.

SEGUNDA COHORTE

Repetimos algunos de estos análisis en una segunda cohorte de pacientes con EC y, como se muestra en la **Figura 46**, los resultados obtenidos corroboraron la sobreexpresión de marcadores endoteliales y de ITGA11 en las muestras afectas en relación a sujetos control. Adicionalmente, mostraron incrementos significativos en la expresión de ITGA10 y DDR2, así como una reducción en la expresión de DDR1.

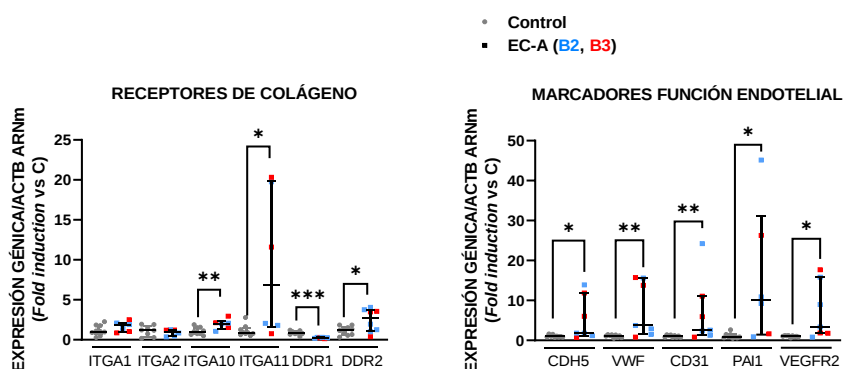


Figura 46. Las muestras ileales afectas de pacientes con EC muestran un incremento en la expresión génica de marcadores endoteliales y de mediadores de la función endotelial y la angiogénesis. Expresión de ARNm (expresada como *fold induction* frente a β -actina) en tejido ileal de pacientes control, y en tejido afecto de pacientes con EC (EC-A). Se representan los datos individuales (EC estenótica o B2: azul; EC penetrante o B3: rojo), la mediana y el rango intercuartil (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$; Student's t-test o Mann Whitney test, según corresponda).

Como en la cohorte 1, el estudio de correlación mostró una asociación positiva y significativa entre la expresión de ITGA11 y la de los marcadores endoteliales (**Figura 47**).

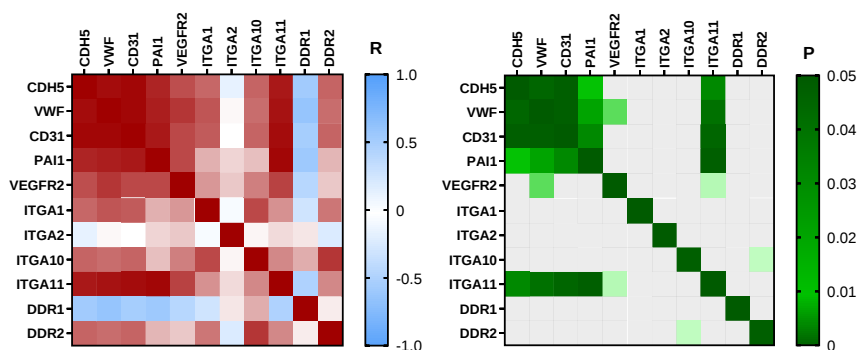


Figura 47. La expresión génica de la integrina $\alpha 11$ muestra una correlación positiva y significativa con la expresión de marcadores endoteliales en las muestras ileales de la segunda cohorte de pacientes con EC. La primera matriz muestra el grado de correlación entre la expresión de los distintos genes (R de Spearman) y la segunda el grado de significatividad de dichas correlaciones (P valor).

Los cambios en expresión génica se trasladaron a la expresión de proteínas, y las muestras ileales de pacientes con EC presentaron niveles aumentados de integrina $\alpha 11$ y expresión reducida de receptor con dominio discoidina 1 (DDR1), con respecto a los tejidos ileales control (**Figura 48**).

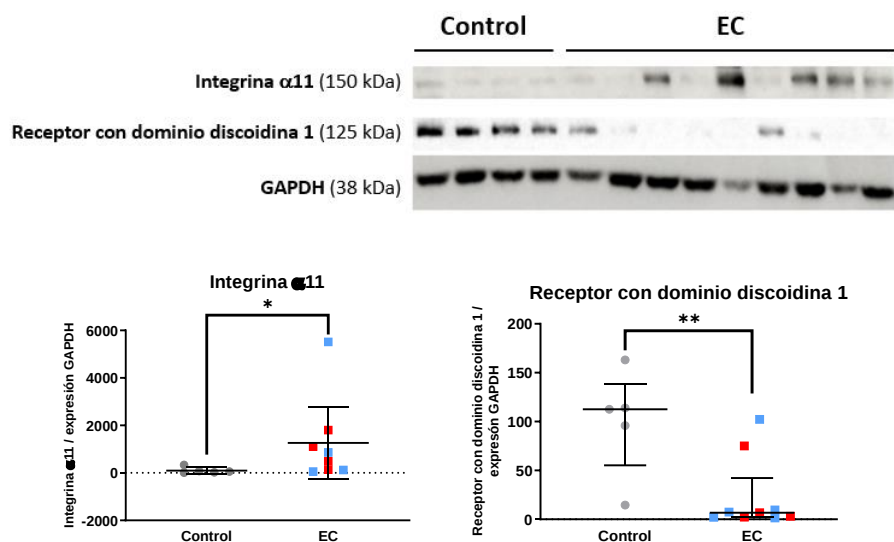


Figura 48. Las muestras ileales afectas de pacientes con EC muestran un incremento en la expresión proteica de integrina $\alpha 11$ y una reducción en la del receptor con dominio discoidina 1. Imagen correspondiente al análisis por WB de las proteínas integrina $\alpha 11$ y DDR1 en tejido ileal de pacientes control y en tejido afecto de pacientes con EC. Los gráficos muestran la cuantificación de la expresión de ambas proteínas referida a la expresión de GAPDH y representada como porcentaje relativo al nivel observado en muestras control. Se representan los datos individuales (EC estenótica o B2: azul; EC penetrante o B3: rojo), la mediana y el rango intercuartil (* $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$; Mann Whitney test).

6. La expresión de integrina $\alpha 11$ correlaciona con los indicadores de expansión de los compartimentos vascular y mesenquimal en modelos murinos de fibrosis intestinal

Tras observar que la integrina $\alpha 11$ cambia su patrón de expresión acompañando a las alteraciones estructurales que se observan en las lesiones provocadas por la EC, quisimos testar si esta asociación ocurría de forma semejante en el proceso de fibrogénesis en el ratón.

En primer lugar, utilizamos el modelo de fibrosis intestinal por trasplante heterotópico. Con los fragmentos fibróticos extraídos de los ratones receptores se realizó un análisis de expresión génica y, posteriormente, un análisis de

correlación de Pearson. En la **Figura 49**, se puede observar una sobreexpresión de la *Itga11*, así como, de los marcadores endoteliales (*Cdh5*, *Vwf* y *Pecam1/Cd31*) en las muestras fibróticas respecto a las muestras control (como ocurría en las muestras ileales de la parte afecta en los pacientes con EC). Se observó también un aumento de la expresión de todos los marcadores mesenquimales analizados (*Cdh2*, *Fgfr1*, *Col4a1* y *Fn1*). Además, el *Ddr1* mostró una expresión reducida respecto a las muestras control.

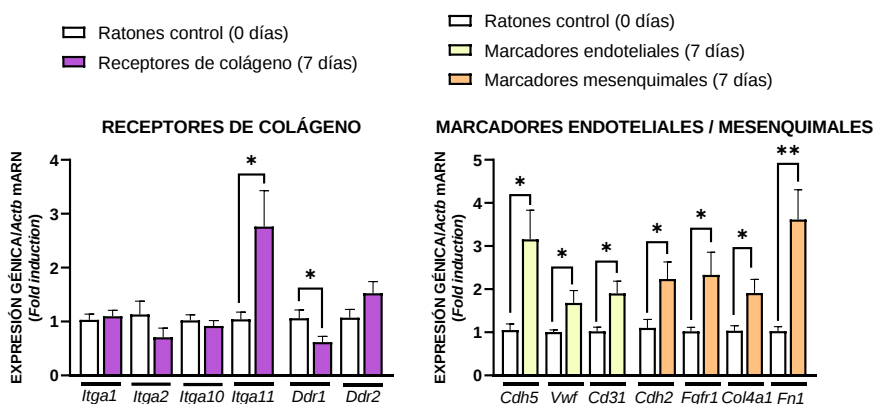


Figura 49. El tejido colónico fibrótico de ratón (modelo de trasplante heterotópico) muestra un incremento en la expresión génica de integrina $\alpha 11$, de marcadores endoteliales y de marcadores mesenquimales. Expresión de ARNm (expresada como *fold induction* frente a β -actina) de distintos genes en muestras colónicas sin trasplantar (control 0d) y muestras extraídas siete días tras el injerto (7d). Las gráficas representan la media $\pm$ SEM (N = 6-7) (* $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$, Student's t-test).

El estudio de correlación por su parte mostró una correlación positiva y significativa de la expresión de *Itga11* y *Ddr2* con los genes endoteliales y mesenquimales. En cambio, el *DDR1* mostró una correlación negativa con estos marcadores, pero solo fue significativa en el caso de *Fn1* (**Figura 50**). Parece, por tanto, que los cambios descritos en las muestras de EC se manifiestan de forma semejante en este modelo de fibrosis, lo que indica que pueda ser un mecanismo

universal y valida este modelo murino para estudiar la relevancia de este fenómeno en la fibrosis intestinal humana.

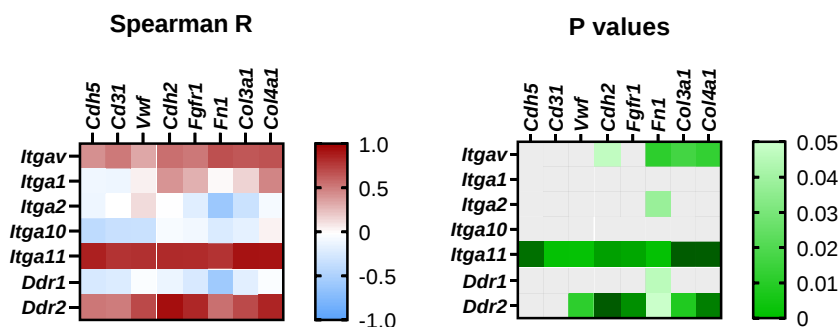


Figura 50. La expresión génica de la integrina $\alpha 11$ muestra una correlación significativa y positiva, con la expresión de marcadores endoteliales y mesenquimales, en muestras intestinales provenientes del modelo murino de fibrosis por trasplante heterotópico. La primera matriz muestra el grado de correlación entre la expresión de los distintos genes (R de Spearman) y la segunda el grado de significatividad (P valor) de dichas correlaciones.

En el modelo de colitis crónica por administración oral de DSS, la expresión de *Itga11* mostró una tendencia al alza que, si bien no llegó a ser significativa, también mostró una correlación positiva y significativa con la expresión del marcador endotelial *Cdh5* (**Figura 51**).

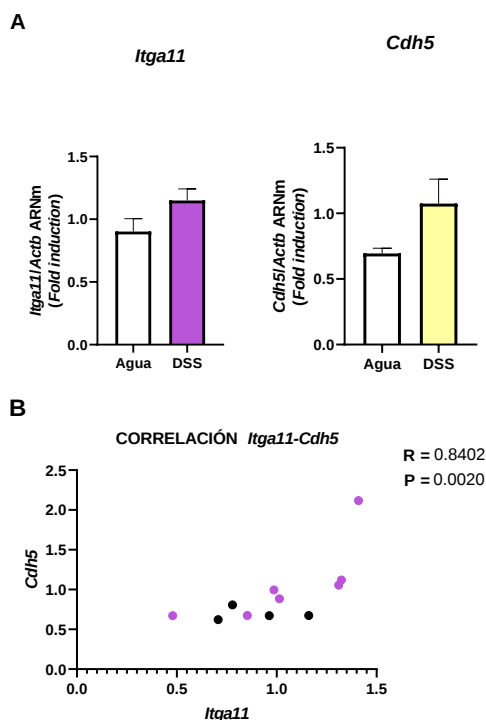


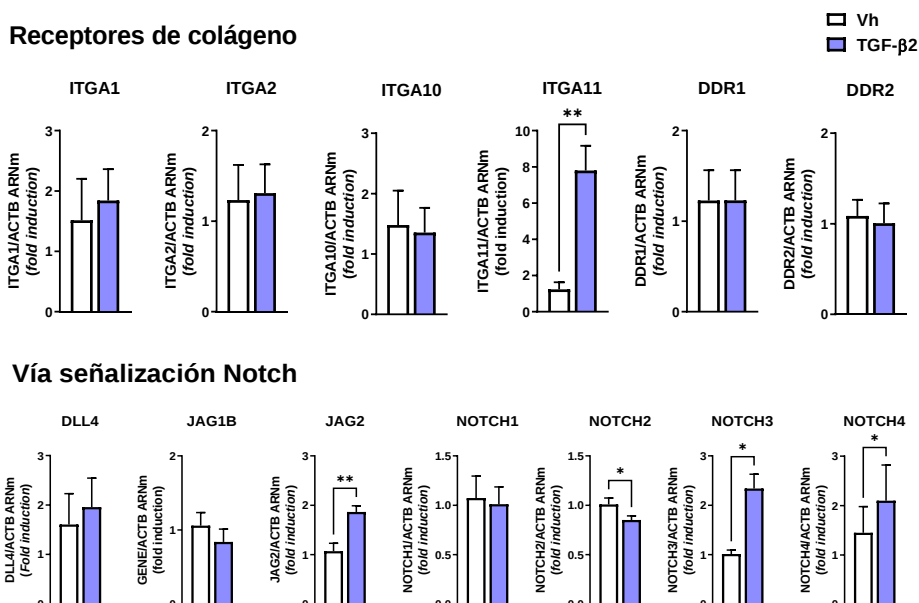
Figura 51. La expresión génica de *Itga11* y de *Cdh5* muestran una correlación positiva y significativa en el modelo murino de colitis crónica inducida por DSS. (A) Expresión de ARNm (expresada como *fold induction* frente a β -actina) en muestras colónicas de ratones que recibieron agua (puntos negros) o DSS (puntos morados). Las gráficas representan la media $\pm$ SEM (N = 4-7). **(B)** La R muestra el grado de correlación (R de Spearman) entre la expresión de ambos genes y la P el grado de significatividad (P valor) de dicha correlación.

7. Influencia de la ruta Notch y de la integrina $\alpha 11$ en la función endotelial

La sobreexpresión de Notch 3 en el endotelio vascular junto con la asociación de esta ruta de señalización con los términos GO relativos a la regulación vascular / endotelial, nos llevaron a estudiar su influencia sobre la célula endotelial y su relación con la expresión de la integrina $\alpha 11$.

7.1. El TGF- β 2 aumenta la expresión de Notch3 y de la integrina α 11 en HUVEC e induce la transición endotelio-mesenquimal

Con el objetivo de imitar el ambiente fibrogénico, tratamos células endoteliales primarias (HUVEC) con TGF- β 2 como principal regulador del proceso fibrótico. Observamos que las células tratadas con esta citocina mostraron un aumento en la expresión de NOTCH3 y de ITGA11. En paralelo, se incrementó la expresión de NOTCH4 y JAG2, y disminuyó la de NOTCH2. Estos resultados se acompañaron de cambios indicativos de transición hacia un fenotipo mesenquimal como la sobreexpresión de los marcadores CDH2 (N-CADHERINA) y FN1, y del factor de transcripción SNAI1. Por último, también se observó un aumento en la expresión de moléculas propias de las células endoteliales como CDH5 (VE-CADHERINA) y PAI1 (**Figura 52**).



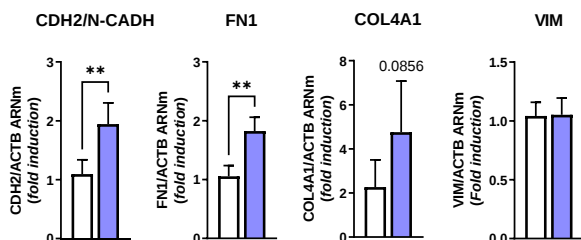
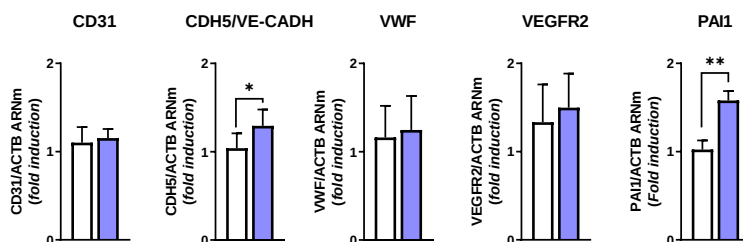
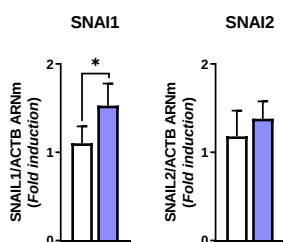
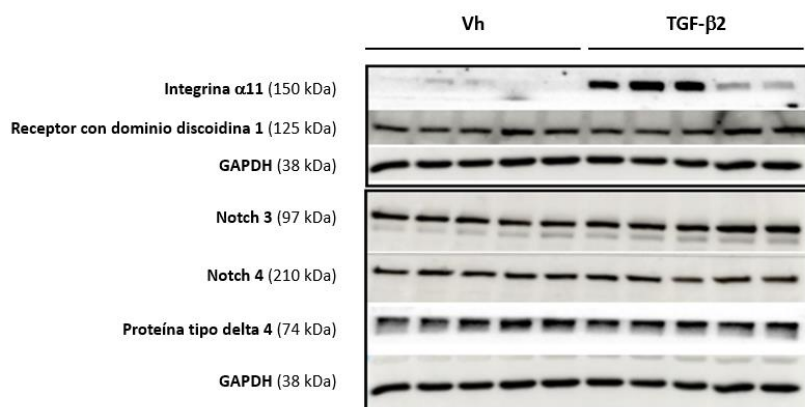
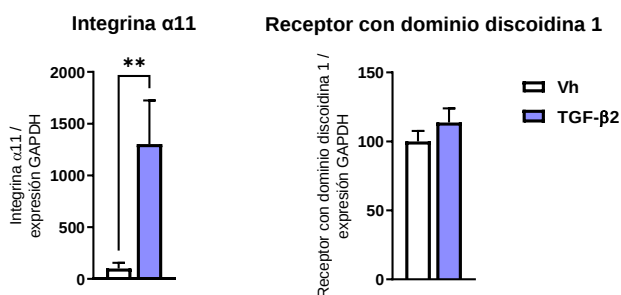
Marcadores mesenquimales**Marcadores endoteliales****Factores de transcripción SNAIL**

Figura 52. El TGF-β2 provoca una activación de la vía de señalización Notch asociada a un aumento en la expresión de ITGA11 y de marcadores mesenquimales (CDH2 y FN1) en HUVEC. Expresión de ARNm (expresada como *fold induction* frente a β-actina) de distintos genes en HUVEC tratadas con TGF-β2 (1 ng/ml, 48h) o su vehículo (N = 5). Los resultados se expresan como la media ± SEM y las diferencias significativas se muestran mediante *P<0.05, **P<0.01 vs Vehículo (Student's t test).

Observamos igualmente que el tratamiento con TGF-β2 incrementaba la expresión proteica de Notch3 y de integrina α11 en HUVEC sin afectar los niveles de la proteína tipo delta 4 (DLL4), Notch 4 o el receptor con dominio discoidina 1 (Figura 53).



Receptores de colágeno



Vía señalización Notch

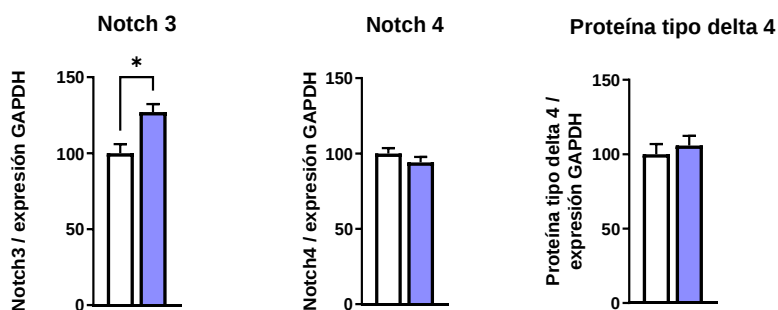
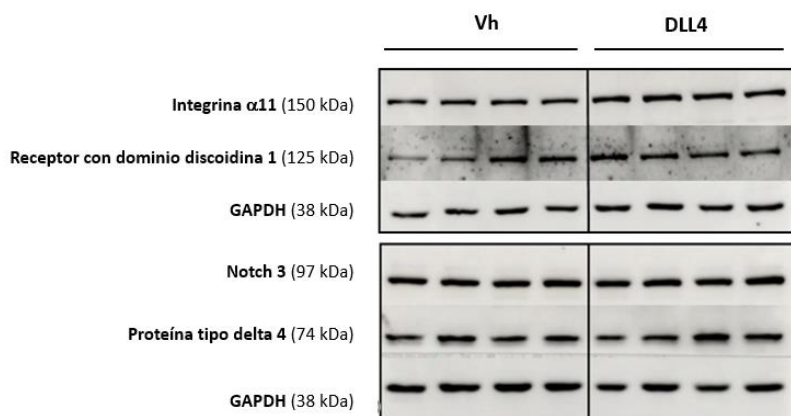


Figura 53. El TGF-β2 aumenta la expresión proteica de Notch 3 y de integrina α11 en HUVEC. Imagen correspondiente al análisis por WB de las proteínas Notch 3, Notch 4, proteína tipo delta 4, integrina α11 y receptor con dominio discoidina 1 en HUVEC tratadas con TGFβ2 (1ng/ml, 48h) o su vehículo (N=5). Los gráficos muestran la cuantificación de la expresión de las distintas proteínas referida a la expresión de GAPDH y representada como porcentaje relativo al nivel observado en HUVEC tratadas con vehículo. Las barras en las gráficas

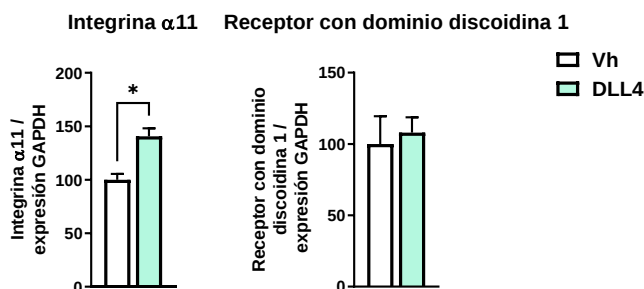
representan la media $\pm$ SEM y las diferencias significativas se muestran mediante * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs vehículo (Mann-Whitney test).

7.2. El DLL4 aumenta la expresión de la integrina $\alpha 11$ y promueve la migración celular y la formación de tubos en HUVEC

Con el objetivo de estudiar la posible aportación de la vía Notch a la activación endotelial durante la fibrosis tratamos las células HUVEC con DLL4. Vimos que este ligando Notch aumentaba la expresión proteica de la integrina $\alpha 11$ sin modificar el nivel de Notch 3, la proteína tipo delta 4 o el receptor con dominio discoidina 1 (**Figura 54**).



Receptores de colágeno



Vía señalización Notch

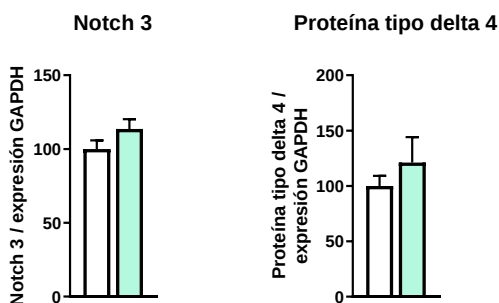


Figura 54. El DLL4 aumenta la expresión proteica de la integrina α11 en HUVEC. Imagen relativa al análisis por WB de las proteínas Notch3, Notch4, proteína tipo delta 4, integrina α11 y receptor con dominio discoidina 1 en HUVEC tratadas con DLL4 (1μg/ml, 24h) o su vehículo (N=4). Los gráficos muestran la cuantificación de la expresión de las distintas proteínas referida a la expresión de GAPDH y representada como porcentaje relativo al nivel observado en HUVEC tratadas con vehículo. Las barras en las gráficas representan la media ± SEM y las diferencias significativas se muestran mediante *P<0.05 vs vehículo (Student's t test).

Tras observar que el DLL4 inducía la expresión proteica de la integrina $\alpha 11$, analizamos si ello se acompañaba de una transición hacia el fenotipo mesenquimal como observamos en respuesta al TGF- $\beta 2$. En este caso no detectamos cambios significativos en la expresión de marcadores de fenotipo mesenquimal o de los factores de transcripción implicados en esta transición (Figura 55).

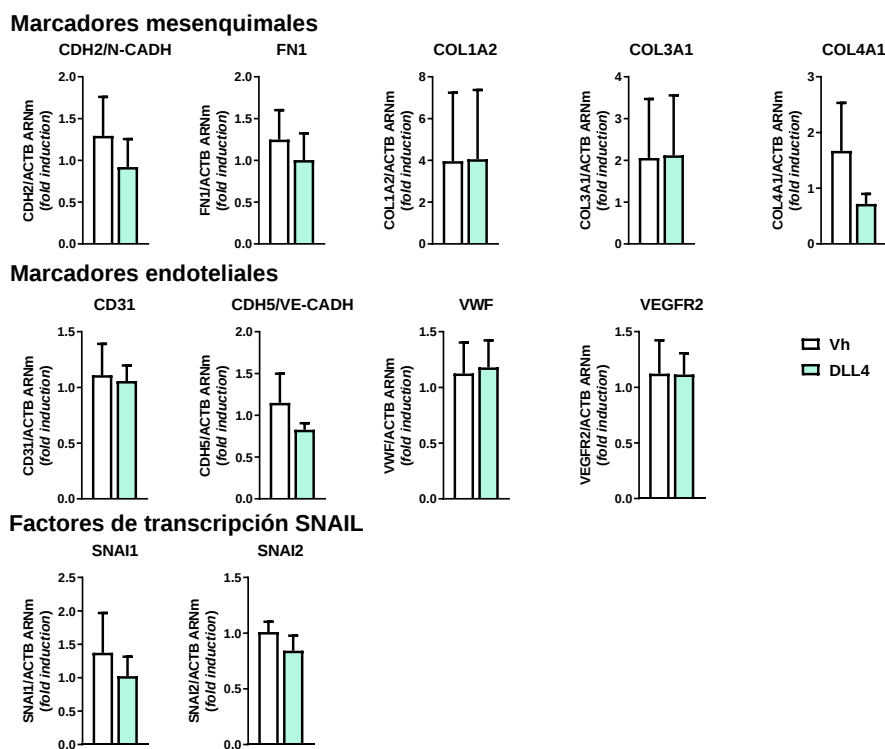


Figura 55. A nivel de expresión génica, el ligando DLL4 no induce EndoMT en HUVEC. Expresión de ARNm (expresada como *fold induction* frente a β -actina) de distintos genes en HUVEC tratadas con vehículo (N = 4) y HUVEC tratadas con DLL4 (1 μ g/ml, 24h) (N = 4). Los resultados se expresan como la media $\pm$ SEM.

Testamos seguidamente si el ligando DLL4 modificaba la habilidad de las células endoteliales para migrar y formar tubos, como indicadores de un proceso angiogénico.

La capacidad migratoria de las HUVEC se evaluó midiendo su capacidad para reparar una herida formada sobre la monocapa celular (**Figura 56**).

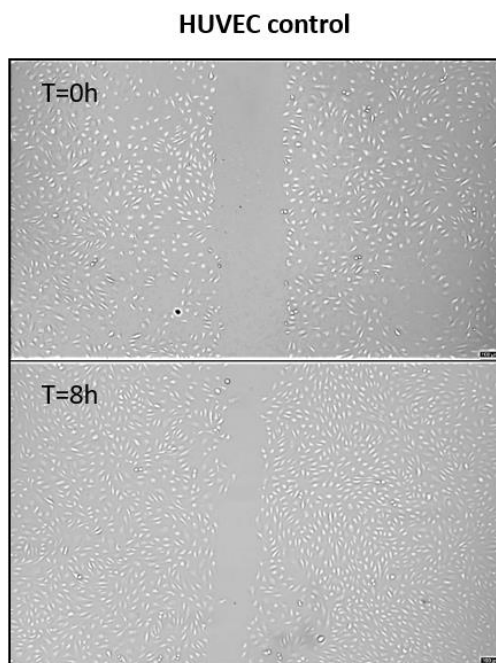


Figura 56. Fotografías del ensayo de migración en HUVEC. Fotos representativas del área de la herida en HUVEC control. La primera imagen muestra la herida recién generada (T=0h). La segunda imagen se tomó transcurridas 8 horas tras la realización de la herida.

Los resultados nos mostraron que el DLL4 provocaba un cierre más temprano de la herida, lo que era indicativo de un aumento de la migración celular (**Figuras 57 B**). Además, mediante los estudios de inmunofluorescencia, pudimos observar que la integrina se expresa de forma bastante uniforme en las HUVEC, sin que pudiéramos apreciar un cambio significativo en su localización celular por el tratamiento con DLL4 (**Figura 57 A**).

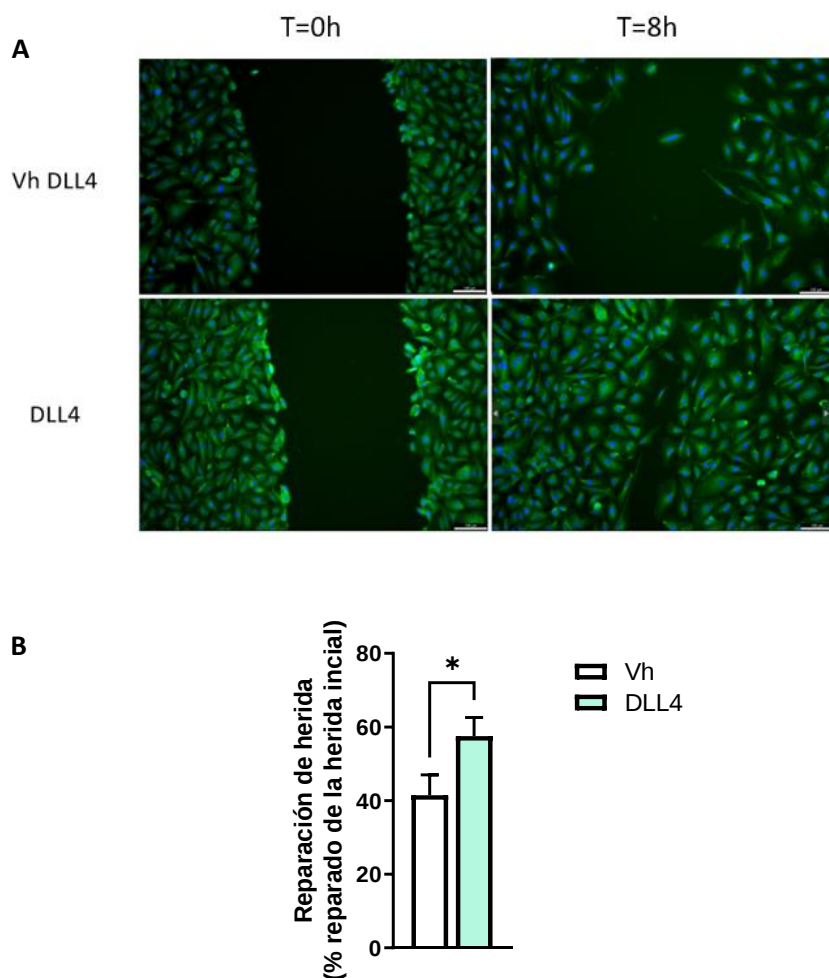


Figura 57. El DLL4 aumenta la migración celular en HUVEC. (A) Imágenes representativas de la inmunotinción (ICQ) de la integrina $\alpha 11$ en HUVEC utilizadas para el ensayo de cicatrización de heridas. Las HUVEC fueron tratadas con DLL4 (1 μ g/ml, 8h) o con su vehículo. **(B)** Se realizaron experimentos de cicatrización de heridas en HUVEC control y HUVEC tratadas con DLL4 (1 μ g/ml, 8h). Tras generar la herida y añadir el tratamiento, se obtuvieron imágenes a tiempo 0 y tras 8 horas de tratamiento. El gráfico representa el porcentaje del área cerrada a las 8 h respecto al área inicial de la herida (N = 7). Las barras en el gráfico representan la media $\pm$ SEM y la diferencia significativa con el grupo de control se muestra por *P < 0,05 vs vehículo (Student's t test).

Por último, realizamos un estudio de formación espontánea de capilares en una matriz tridimensional como aproximación al análisis de la capacidad angiogénica. Como ocurrió en la migración celular para el cierre de la herida, el DLL4 estimuló el proceso de formación de túbulos endoteliales en HUVEC, aumentando los tres parámetros analizados (nodos, ramificaciones y cruces) (Figura 58).

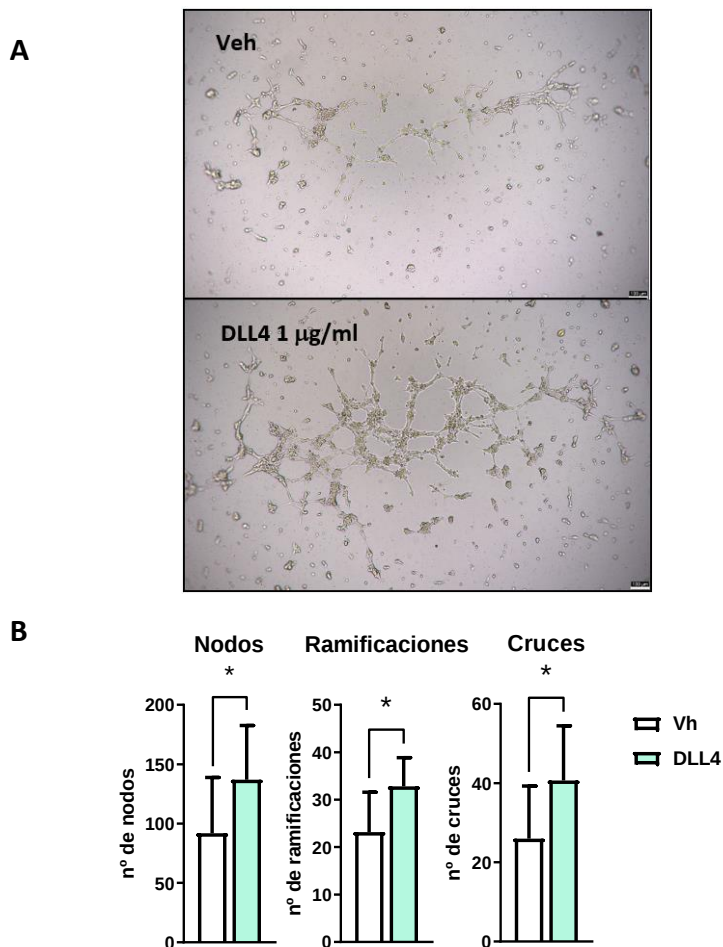


Figura 58. El DLL4 provoca un aumento en la formación de estructuras tubulares en HUVEC. (A) Imágenes representativas del ensayo de formación de tubos en HUVEC tratadas con DLL4 (1µg/ml, 7h) o con su vehículo. (B) Número de nodos, ramificaciones y cruces después de 7 h de tratamiento (N = 6). La medición de estos parámetros indicadores de angiogénesis se realizó utilizando el macro “AngiogenesisAnalyzer” disponible para ImageJ. El gráfico representa el número de nodos, ramificaciones y uniones formadas, tomando como referencia la angiogénesis basal del control (Veh). Los resultados se expresan como la media

± SEM y las diferencias significativas se muestran mediante *P<0.05 vs vehículo (Student's t test).

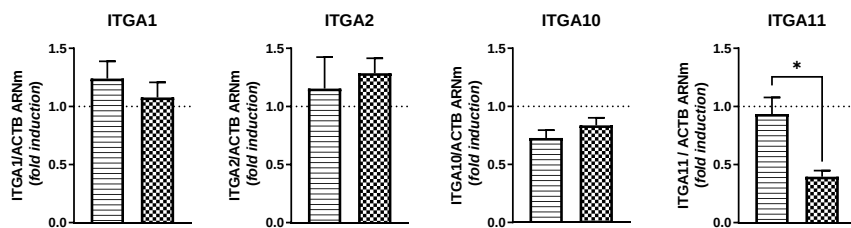
7.3. La integrina $\alpha 11$ media la migración celular inducida por DLL4 en HUVEC

Para testar si la señal migratoria generada por la vía de señalización DLL4-Notch está mediada por la integrina $\beta 1\alpha 11$, silenciamos la subunidad alfa de este receptor en HUVEC para después realizar el ensayo de migración celular.

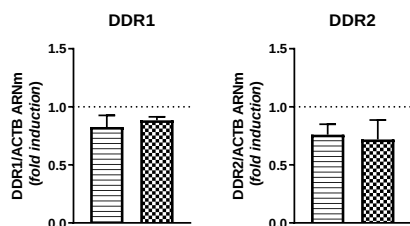
En primer lugar, confirmamos que el proceso de silenciamiento inhibía en efecto la expresión de ITGA11, sin modular la del resto de receptores de colágeno. Curiosamente, ello se acompañó de una disminución en la expresión de DLL4 y de NOTCH3 indicando una regulación bidireccional entre ambas vías de señalización (**Figura 59**).

Receptores de colágeno

Integrinas

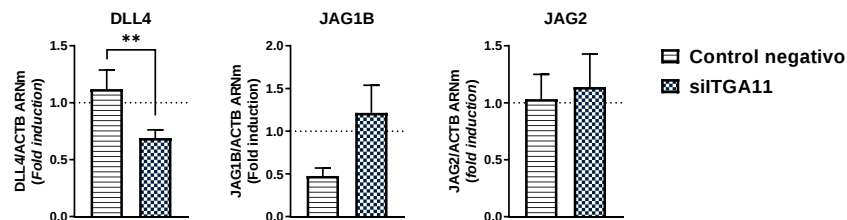


DDR



Vía señalización Notch

Ligandos Notch



Receptores Notch

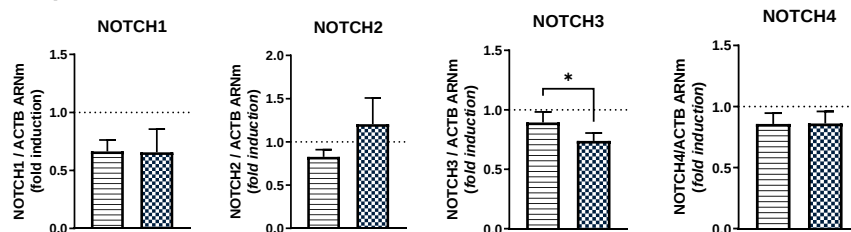


Figura 59. El silenciamiento de ITGA11 se acompaña de una disminución en la expresión del ligando DLL4 y del receptor NOTCH3 en HUVEC. Expresión de ARNm (expresada como *fold induction* frente a β -actina) en HUVEC control (mock), transfectadas con un siARN no dirigido (30 nM, 16h, control negativo) y transfectadas con siITGA11 (30 nM, 16h) ($N \geq 3$). Los

resultados se expresan como la media $\pm$ SEM, la línea punteada representa la expresión de las HUVEC control *mock* y las diferencias significativas se muestran mediante * $P < 0.05$ o ** $P < 0.01$ vs C- (Student's t test).

En segundo lugar, se repitió el estudio en células tratadas con DLL4 confirmando la eficacia del silenciamiento y una reducción paralela en la expresión de NOTCH3 (**Figura 60**).

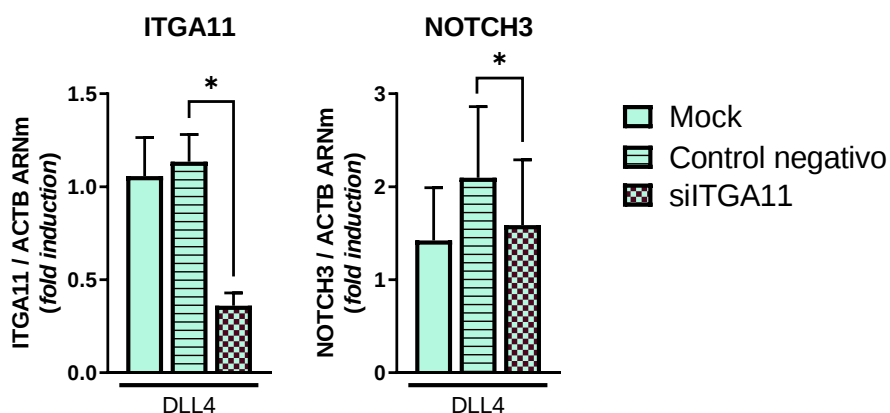


Figura 60. El silenciamiento de ITGA11 se acompaña de una disminución en la expresión del receptor NOTCH3 en HUVEC tratadas con DLL4. Expresión de ARNm (expresada como *fold induction* frente a β -actina) en HUVEC control (*mock*), transfectadas con un siARN no dirigido (30 nM, 16h, control negativo) y transfectadas con siITGA11 (30 nM, 16h). Tras la transfección las HUVEC fueron tratadas con DLL4 (1 μ g/ml, 24h) (N = 4). Los resultados se expresan como la media $\pm$ SEM y las diferencias significativas se muestran mediante * $P < 0.05$ vs el grupo indicado (RM-ANOVA + Tukey test).

Finalmente, pudimos observar que la ausencia de la integrina bloquea el efecto estimulante del DLL4 en el cerramiento de la herida (**Figura 61**), lo que indicaría que la integrina $\alpha 11$ media la migración inducida por este ligando Notch.

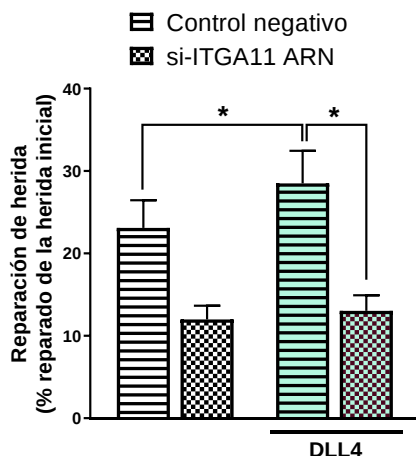


Figura 61. El ligando DLL4 aumenta la migración de las células endoteliales a través de la integrina $\alpha 11$. Se realizaron experimentos de cicatrización de heridas en HUVEC tratadas con DLL4 (1 μ g/ml, 10h) o su vehículo. Previamente las HUVEC fueron transfectadas con un siARN no dirigido (30 nM, 16h, control negativo) o con el siARN específico si-ITGA11 (30 nM, 16h). Tras generar la herida y añadir el tratamiento, se obtuvieron imágenes a tiempo 0 y tras 10 horas de tratamiento. El gráfico representa el porcentaje del área cerrada a las 10 h respecto al área inicial de la herida (N = 8). Las barras en el gráfico representan la media $\pm$ SEM y la diferencia significativa con el grupo de control se muestra por *P < 0.05 vs el grupo indicado (RM-ANOVA + Tukey test).

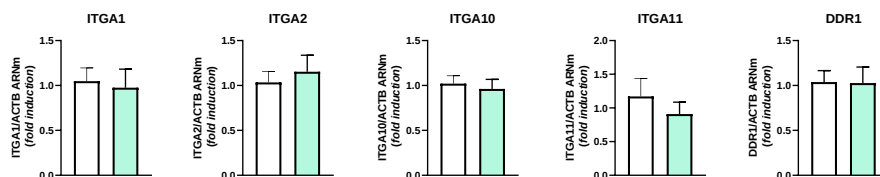
8. Efecto del DLL4 en otros tipos celulares implicados en la fibrosis intestinal

Para finalizar este bloque de resultados, y tras observar el efecto del DLL4 en células endoteliales, analizamos si este ligando afectaba de forma similar la actividad de otros tipos celulares importantes en la inflamación y la fibrosis intestinales como las células epiteliales y los fibroblastos.

8.1. El DLL4 no afecta la expresión de receptores de colágeno o citocinas en células epiteliales intestinales

El tratamiento con DLL4 no modificó la expresión de receptores de colágeno o de citocinas en las dos líneas celulares empleadas (HCoEpiC, **Figura 62**; HT29, **Figura 63**).

Receptores colágeno



Citocinas

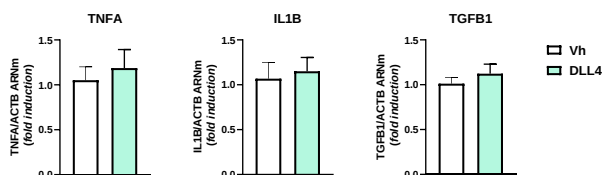
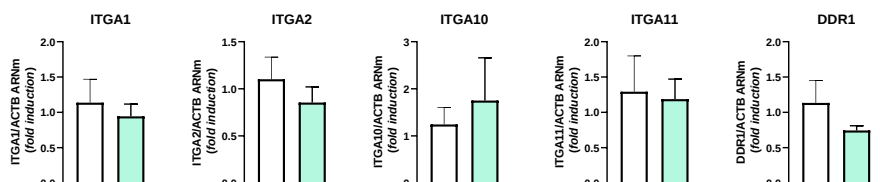


Figura 62. El DLL4 no modifica la expresión de receptores de colágeno o de citocinas en células epiteliales HCoEpiC. Expresión de ARNm (expresada como *fold induction* frente a β -actina) de distintos genes en HCoEpiC tratadas con DLL4 (1 μ g/ml, 24h) o su vehículo (N = 6). Los resultados se expresan como la media $\pm$ SEM.

Receptores colágeno



Citocinas

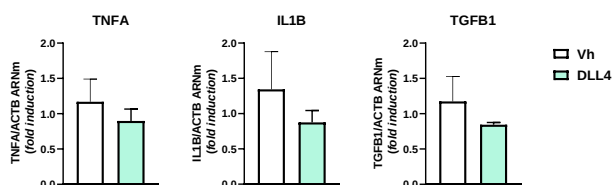
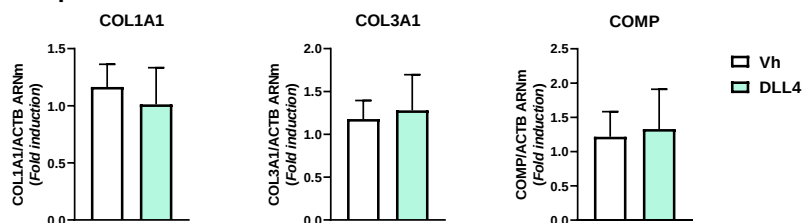


Figura 63. El DLL4 no modifica la expresión de receptores de colágeno o de citocinas en células epiteliales HT29. Expresión de ARNm (expresada como *fold induction* frente a β -actina) de distintos genes en HCoEpiC tratadas con DLL4 (1 μ g/ml, 24h) o su vehículo (N = 5). Los resultados se expresan como la media $\pm$ SEM.

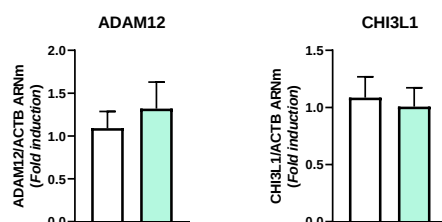
8.2. El DLL4 no afecta a la actividad fibrogénica de los fibroblastos intestinales

El tratamiento con DLL4 tampoco modificó la expresión génica de proteínas de la MEC en fibroblastos intestinales (HSIF), si bien incrementó la de la citocina neutrofílica IL8 (**Figura 64**).

Componentes MEC



Enzimas MEC



Citocinas

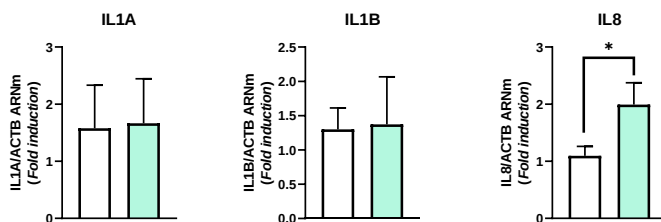


Figura 64. El DLL4 no afecta la expresión de marcadores relacionados con la fibrosis en fibroblastos intestinales. Expresión de ARNm (expresada como *fold induction* frente a β -actina) de distintos genes en HSIF tratados con DLL4 (1 μ g/ml, 24h) o su vehículo (N $\geq$ 4). Los resultados se expresan como la media $\pm$ SEM y las diferencias significativas se muestran mediante *P<0.05 vs vehículo (Student's t test).

9. Estudio de secuenciación de miARN en muestras de pacientes con EC

Paralelamente al análisis de ARNm, realizamos un estudio de secuenciación de miARN en el que encontramos 862 significativamente regulados a la baja ($FDR < 0,05$) y 67 miARN significativamente regulados al alza ($FDR < 0,05$) en muestras afectas de pacientes con EC en comparación con las muestras no afectas. El diagrama de Escalado Multidimensional muestra la separación de muestras afectas y no afectas (**Figura 65**).

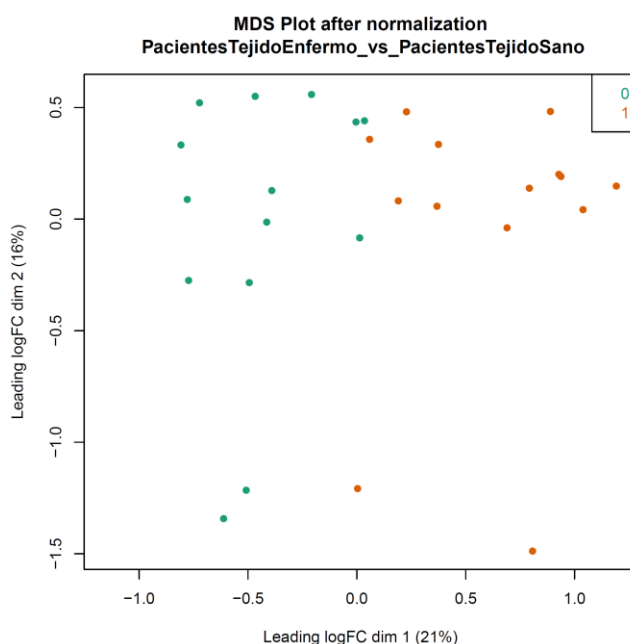


Figura 65. Existe una expresión diferencial de miARN en las muestras ileales de la parte afectada de pacientes con EC respecto a las muestras ileales de la parte no afectada emparejada del mismo paciente. En el diagrama de Escalado Multidimensional se observa que los pacientes se agrupan en dos poblaciones, los puntos verdes representan las muestras de tejido sano y los puntos rojos corresponden a las muestras de la parte ileal afectada.

De entre los miARN que mostraban una reducida expresión en las lesiones de la EC, elegimos los 60 que mostraban una inhibición más significativa. La **Figura 66** muestra su expresión en los tres grupos experimentales y la **Figura 67**

los valores obtenidos al correlacionar dicha expresión con la de los genes incluidos en los términos GO relativos a la función vascular.

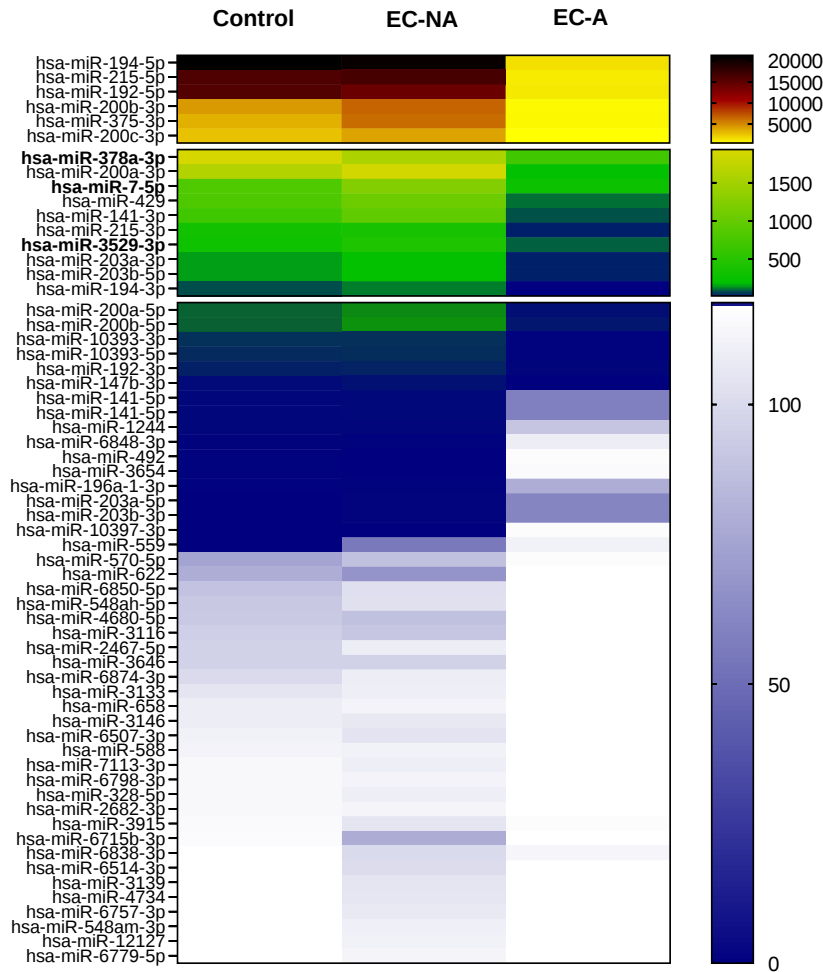


Figura 66. miARN cuya expresión en el tejido afecto se reduce de forma más significativa. El mapa de calor muestra el número normalizado de cuentas obtenido en el estudio de secuenciación para cada uno de los miARN en muestras ileales de pacientes control y en muestras afectas (EC-A) y no afectas (EC-NA) de los pacientes con EC.

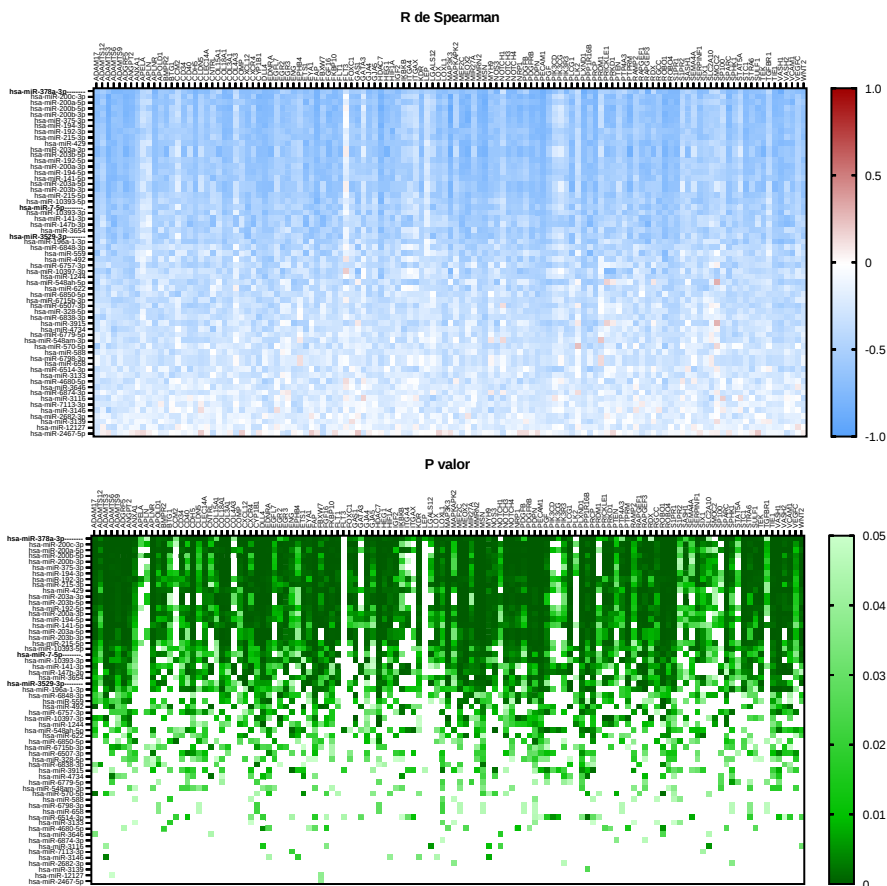


Figura 67. Los miARN miR-378a-3p, miR-7-5p y miR-3529-3p mostraron una correlación negativa y significativa con muchos de los genes incluidos en los términos GO relacionados con la regulación vascular/endotelial. La primera matriz muestra los valores de R obtenidos en el estudio de correlación de Spearman para cada combinación y la segunda matriz indica la significatividad de cada una de estas correlaciones (P valor).

Los resultados mostraron una correlación negativa de casi todos los miARN analizados con un número variable de genes relacionados con la función endotelial en la EC. De entre todos ellos, centramos nuestra atención en los miARN miR-378a-3p, miR-7-5p y miR-3529-3p, por cumplir tres requisitos: estar entre los miARN de mayor expresión en el tejido control y no afecto, mostrar una reducción muy significativa en el tejido afecto respecto del no afecto y, finalmente, mostrar un elevado grado de correlación con la mayoría de genes

asociados a la regulación del compartimento vascular. Asimismo, tuvimos en cuenta la función de estos miARN, especialmente en el caso de miR-378a-3p, que se había involucrado en la regulación de la angiogénesis y la fibrosis en otros territorios (234, 235). La reducción de miR-378a-3p en las muestras ileales afectas se confirmó analizando su expresión mediante qPCR-TaqMan (Figura 68).

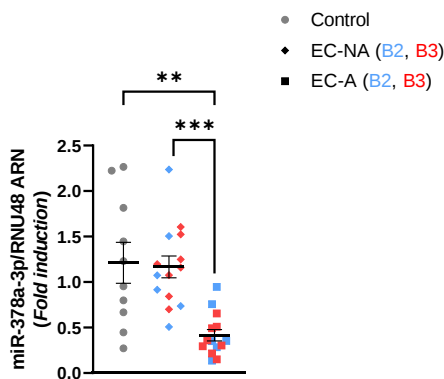


Figura 68. El miR-378a-3p se encuentra reducido en muestras ileales de la parte afectada de pacientes con EC. Expresión del miARN miR-378a-3p (expresada como *fold induction* frente a RNU48) en muestras ileales control, muestras ileales no afectas y afectas de pacientes con EC. Se representan los datos individuales (EC estenótica o B2: azul; EC penetrante o B3: rojo), la mediana y el rango intercuartil (** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$; Kruskal-Wallis + Dunn test).

9.1. El TGF- β 2 disminuye la expresión del miR-378a-3p en HUVEC

Con el fin de profundizar en la asociación entre los cambios en la expresión de miARN y las alteraciones vasculares observadas en los tejidos enfermos, analizamos si las células endoteliales sintetizaban los miARN seleccionados y si su expresión variaba en el entorno fibrogénico propiciado por el tratamiento con TGF- β 2 o por tratamiento con el ligando DLL4.

La **Figura 69** muestra que las células endoteliales expresan miR-378a-3p, miR-7-5p y miR-3529-3p y que el tratamiento con TGF- β 2 provoca la disminución significativa del primero.

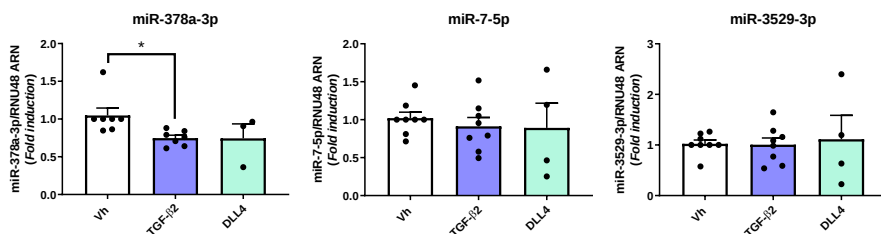
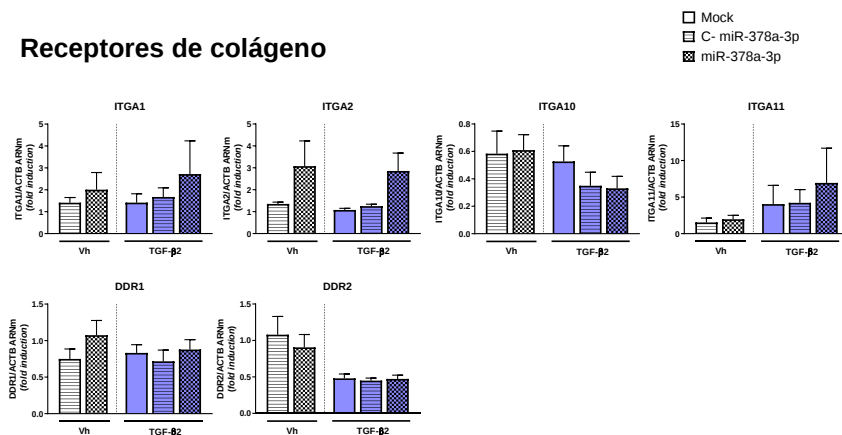


Figura 69. El TGF- β 2 reduce la expresión del miR-378a-3p en HUVEC. Expresión de distintos miARN (expresada como *fold induction* frente a RNU48) en HUVEC tratadas con TGF- β 2 (1ng/ml, 48h) (N $\geq$ 7) o DLL4 (1 μ g/ml, 24h) (N $\geq$ 3). Los resultados se expresan como la media $\pm$ SEM y las diferencias significativas se muestran mediante *P<0.05 vs Vehículo (Student's t-test).

9.2. El miR-378a-3p disminuye la expresión de Notch1 en HUVEC tratadas con TGF- β 2

Por último, quisimos ver si el miR-378a-3p modulaba la vía Notch y la expresión de receptores de colágeno en HUVEC, tanto en presencia del TGF- β 2 como en condiciones basales. La **Figura 70** muestra los resultados que demostraron que el tratamiento con miR-378a-3p tendía a reducir la expresión de NOTCH1 y NOTCH4 (P = 0.0605) especialmente en presencia de TGF- β 2, condición en la cual la síntesis endógena de este miARN está inhibida. Se deduce de estos resultados que ambos genes podrían ser dianas de miR-378a-3p. Asimismo, este miARN también provocó un aumento en la expresión del ligando Notch JAG1B y en el receptor NOTCH2, en HUVEC tratadas con vehículo (**Figura 70**). Este podría ser un efecto indirecto dado que el rol habitual de los miARN es reducir los niveles de los ARNm con los que interaccionan directamente.

Receptores de colágeno



Vía señalización Notch

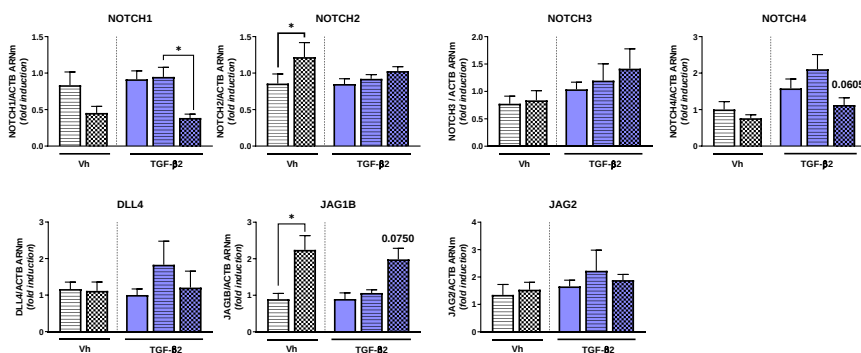


Figura 70. El miR-378a-3p reduce la expresión de NOTCH1 y NOTCH4 en HUVEC tratadas con TGF-β2. Expresión de ARNm (expresada como *fold induction* frente a β-actina) de distintos genes en HUVEC control (mock), transfectadas con miR-378a-3p (30 nM, 16h) o su control negativo (30 nM, 16h). Tras la transfección las HUVEC fueron tratadas con TGF-β2 (1ng/ml, 48h) o su vehículo (N =4). Los resultados se expresan como la media ± SEM y las diferencias significativas se muestran mediante *P<0.05 vs control negativo (Student's t-test para las células tratadas con Vehículo y ANOVA + Tukey test para las tratadas con TGF-β2).

10. Papel del receptor SUCNR1 en la inflamación

Como se ha apuntado en la introducción, el succinato aumenta su concentración en diversas enfermedades inflamatorias, incluyendo la EII. Este metabolito puede modular el proceso inflamatorio a través de varios mecanismos intracelulares y mediante la activación de su receptor SUCNR1, cuya expresión vimos incrementada en la EC (218). Nuestro objetivo en el presente estudio fue analizar si contribuía a la extravasación de células leucocitarias y, por tanto, a la formación y mantenimiento de la respuesta inflamatoria.

10.1. SUCNR1 se expresa en las células endoteliales del tejido ileal de pacientes con EC

Se realizaron experimentos dirigidos a analizar la expresión del receptor SUCNR1 en resecciones ileales de pacientes enfermos de Crohn. Confirmamos resultados previos (218) al detectar un incremento en la expresión génica de SUCNR1 en el tejido afecto por la EC (Figura 71). Realizamos entonces un estudio inmunohistoquímico para analizar el patrón de expresión de SUCNR1 en este tejido y, como se observa en la Figura 72, se detectó su presencia en el endotelio vascular y en células inflamatorias.

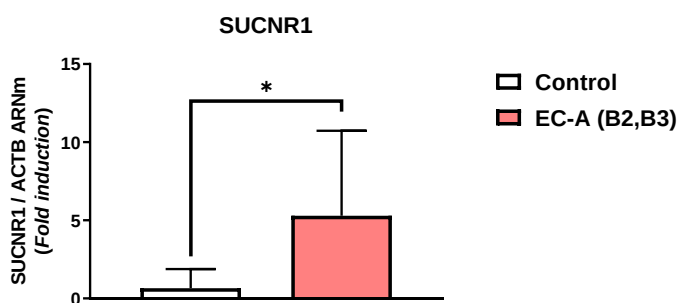


Figura 71. SUCNR1 se encuentra sobreexpresado en muestras afectas de pacientes con EC respecto los ileon control. Expresión de ARNm (expresada como *fold induction* frente a β -actina) de SUCNR1 en muestras ileales control (N = 9) y muestras ileales afectas de pacientes con EC (N = 7). Los resultados se expresan como la media $\pm$ SEM y las diferencias significativas se muestran mediante * $P < 0.05$ vs el grupo control (Mann Whitney test).

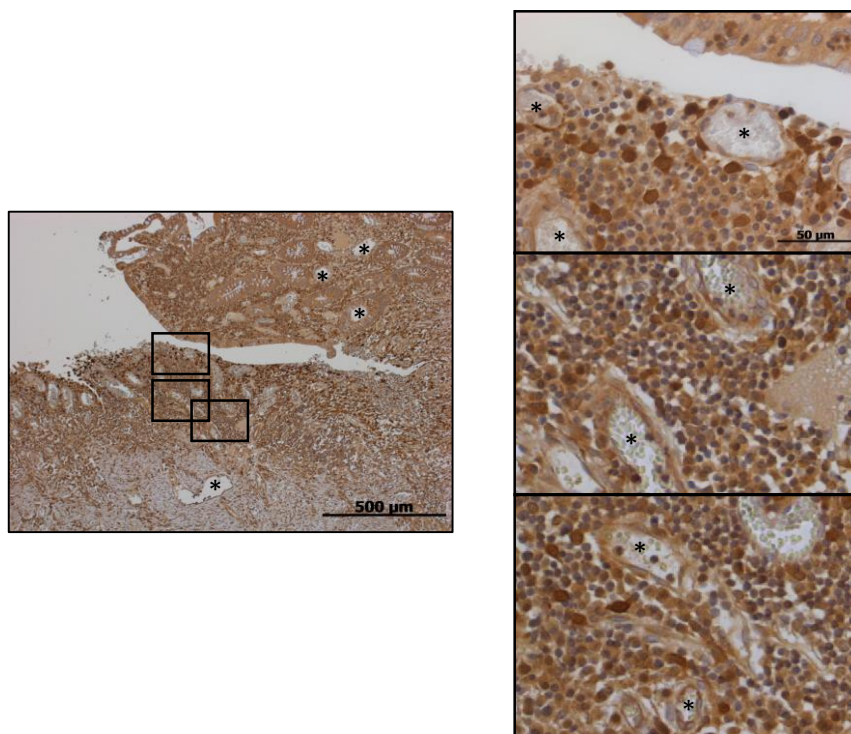


Figura 72. Inmunotinción de SUCNR1 en el tejido ileal afecto de pacientes con EC. Se detectó SUCNR1 en el endotelio vascular (*) y en células leucocitarias infiltradas en el tejido ileal afecto de pacientes con EC.

10.2. El receptor SUCNR1 media las interacciones leucocito-endotelio inducidas por $\text{TNF}\alpha$ *in vivo* e *in vitro*

En primer lugar, se analizó la implicación de SUCNR1 en un modelo murino de inflamación aguda. En el experimento se utilizaron ratones macho carentes de SUCNR1 ($\text{SUCNR1}^{-/-}$) y de la correspondiente cepa salvaje (WT). Los tratamientos utilizados fueron $\text{TNF}\alpha$ (intraperitoneal, i.p.), succinato (intraescrotal) o la combinación de ambos tratamientos.

Los experimentos de microscopía intravital mostraron que el estímulo sobre el rodamiento y la adhesión leucocitarias inducido por $\text{TNF}\alpha$ (500 ng, i.p.) se

redujo significativamente en ratones *Sucnr1*^{-/-}. La inyección intraescrotal de succinato (1 mM) tendió a aumentar las interacciones endoteliales leucocitarias en las vénulas locales de ratones WT, pero sin alcanzar significación estadística. La administración del metabolito no afectó significativamente los efectos del TNF α en los ratones de cepa salvaje, y la respuesta obtenida por esta combinación de TNF más succinato se redujo significativamente por la ausencia de SUCNR1, aunque, en el caso de la adhesión leucocitaria, solo se observó una prevención parcial (**Figura 73**).

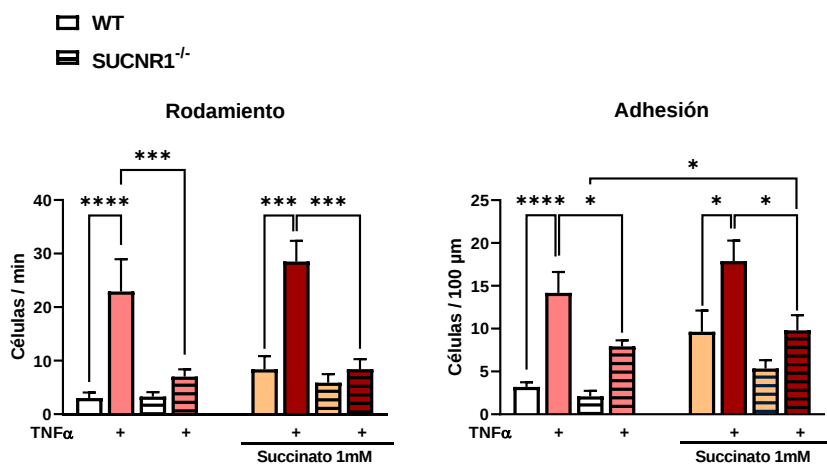


Figura 73. SUCNR1 media las interacciones leucocito-endothelio inducidas por TNF α *in vivo*.

El rodamiento y la adhesión leucocitarias se analizaron por microscopía intravital en el tejido cremastérico de ratones de cepa salvaje (WT) y ratones carentes de SUCNR1 (*SUCNR1*^{-/-}) tratados con succinato (1mM, intraescrotal), TNF α (500ng, i.p) o la combinación de TNF α más succinato (N $\geq$ 8). Las barras en las gráficas representan la media $\pm$ SEM y las diferencias significativas se muestran mediante *P<0.05, ***P<0.001, ****P<0.0001 vs el grupo indicado (ANOVA+ Tukey test).

Al analizar la expresión génica de citocinas proinflamatorias en los tejidos cremastéricos obtenidos al final del experimento, observamos que el TNF α inducía la expresión de sí mismo y de *Il1b* y que ambas respuestas se prevenían por la carencia de SUCNR1. Sin embargo, la ausencia de este receptor no afectó

de forma significativa los niveles de ambas citocinas cuando se añadía succinato exógeno al tratamiento con TNF α (**Figura 74**).

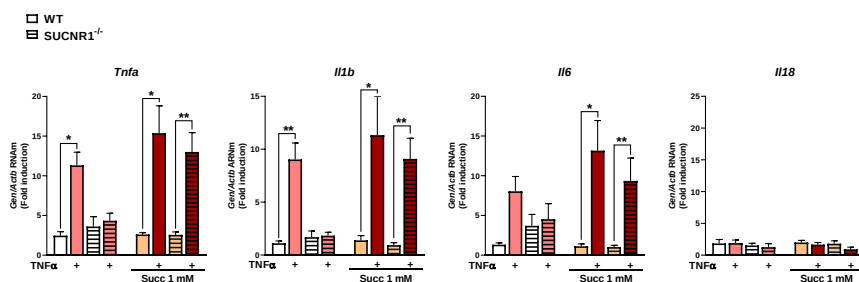


Figura 74. La ausencia de SUCNR1 limita el aumento de expresión de citocinas proinflamatorias inducido por TNF α en el tejido cremastérico de ratón. Expresión de ARNm (expresada como *fold induction* frente a β -actina) de distintos genes en muestras de cremáster de ratones de cepa salvaje (WT) y ratones carentes de SUCNR1 (SUCNR1^{-/-}) tratados con succinato (1mM, intraescrotal), TNF α (500ng, i.p) o la combinación de TNF α más succinato (N $\geq$ 9). Los resultados se expresan como la media $\pm$ SEM y las diferencias significativas se muestran mediante * P<0.05 y **P<0.01 vs el grupo indicado (Kruskal-Wallis + Dunn test).

Seguidamente, y con la finalidad de estudiar si estos efectos podían ser relevantes en humanos, utilizamos un modelo que estudia *in vitro* la interacción entre células leucocitarias y endoteliales humanas en condiciones que simulan el flujo sanguíneo en las vénulas.

Como se observa en la **Figura 75**, el tratamiento de las células endoteliales con TNF α aumenta el número de leucocitos mononucleares en rodamiento y adheridos a la monocapa endotelial, respuesta que se inhibió significativamente en presencia del antagonista del receptor SUCNR1 (NF-56-EJ40).

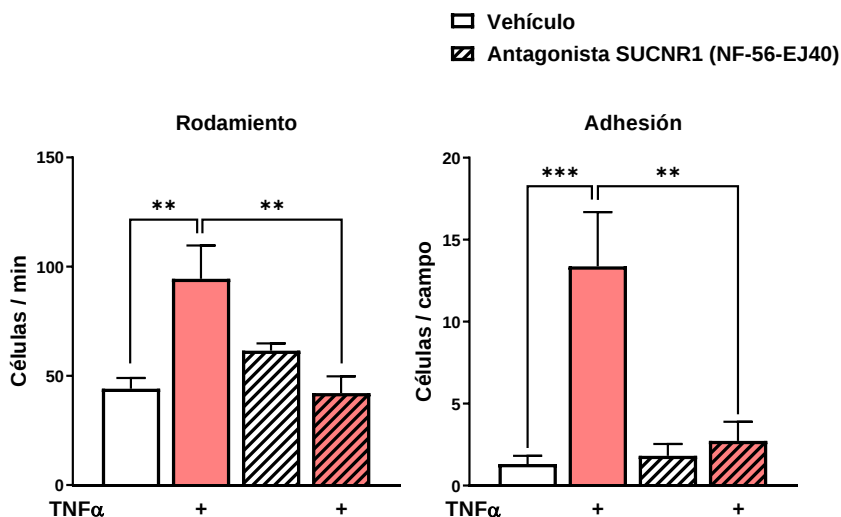


Figura 75. El bloqueo de SUCNR1 inhibe las interacciones leucocito-endorotelio inducidas por TNF α *in vitro*. Las HUVEC se trataron con el antagonista de SUCNR1 (1 μ M) o su vehículo 30 min antes del tratamiento con TNF α (20ng/ml) o su vehículo (N = 7), y el rodamiento y la adhesión de leucocitos mononucleares humanos sobre estas células se analizó 4h más tarde en una cámara de flujo paralelo. Las barras en las gráficas representan la media $\pm$ SEM y las diferencias significativas se muestran mediante **P<0.01, ***P<0.001 vs el grupo indicado (ANOVA + Tukey test).

Por último, se analizaron los efectos de concentraciones elevadas de succinato proporcionado exógenamente sobre las interacciones leucocito-endorotelio. Como se observa en la **Figura 76**, el metabolito indujo un incremento en el rodamiento similar al del TNF α . También incrementó de forma significativa la adhesión leucocitaria, si bien la intensidad del efecto fue muy inferior a la de la citocina. Por último, los efectos de la combinación de ambos tratamientos no superaron a los inducidos por el TNF α solo.

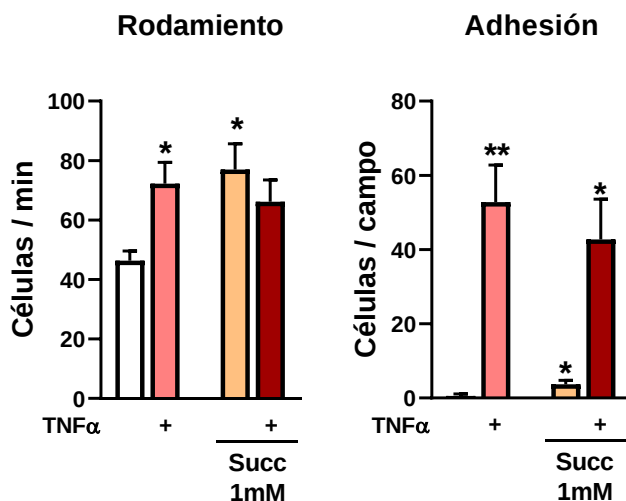


Figura 76. El succinato exógeno provoca un aumento del rodamiento en HUVEC y PBMCs de donantes sanos. Las HUVEC se trataron con succinato (1mM), TNFα (20ng/ml) o la combinación de TNFα más succinato ($N \geq 8$), y el rodamiento y la adhesión de leucocitos mononucleares humanos sobre estas células se analizó 4h más tarde en una cámara de flujo paralelo. Las barras en las gráficas representan la media $\pm$ SEM y las diferencias significativas se muestran mediante * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Vh (ANOVA + Tukey test).

10.3. La ausencia de SUCNR1 reduce la activación de la vía de señalización NF-κB inducida por TNFα

Dado que la acción proinflamatoria del TNFα depende en parte de la activación de la ruta del NF-κB, analizamos la expresión de los componentes de esta vía en nuestros modelos de inflamación.

En primer lugar, nos centramos en las muestras de cremáster de ratón donde en efecto vimos que los ratones SUCNR1^{-/-} tratados con TNFα muestran niveles significativamente inferiores del factor de transcripción NF-κB y de su forma fosforilada en relación a los ratones de cepa salvaje (**Figura 77**).

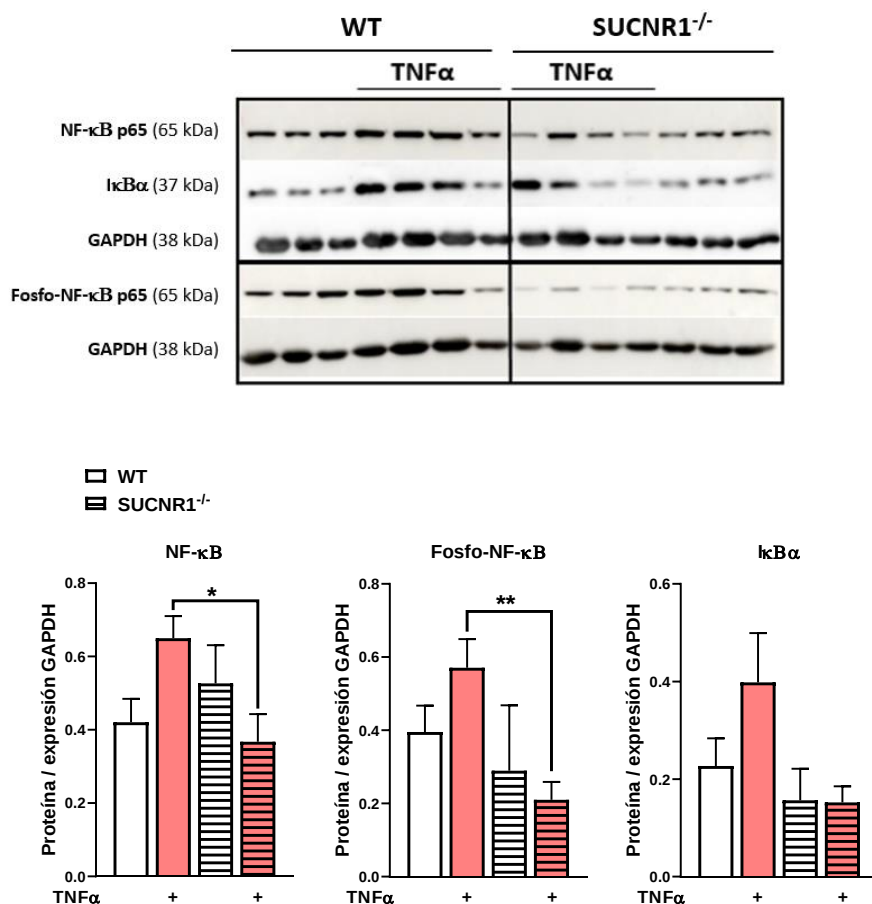


Figura 77. La ausencia de SUCNR1 reduce la activación de la vía de señalización NF-κB inducida por TNFα en muestras de cremáster de ratón. Imagen representativa del análisis por WB de las proteínas NF-κB p65, NF-κB p65 fosforilada e IκBα en muestras de cremáster de ratones de cepa salvaje (WT) y ratones carentes de SUCNR1 (SUCNR1^{-/-}) tratados con TNFα (500ng, i.p) (N = 8) o su vehículo (N = 6) durante 4h. El gráfico muestra la expresión de dichas proteínas frente a GAPDH. Las barras en las gráficas representan la media ± SEM y las diferencias significativas se muestran mediante *P<0.05, **P<0.01 vs el grupo indicado (ANOVA + Tukey test).

Asimismo, estos ratones presentaron una menor expresión de otras proteínas señalizadoras de carácter proinflamatorio como ERK-1/2 o la MAP quinasa p38 beta (**Figura 78**).

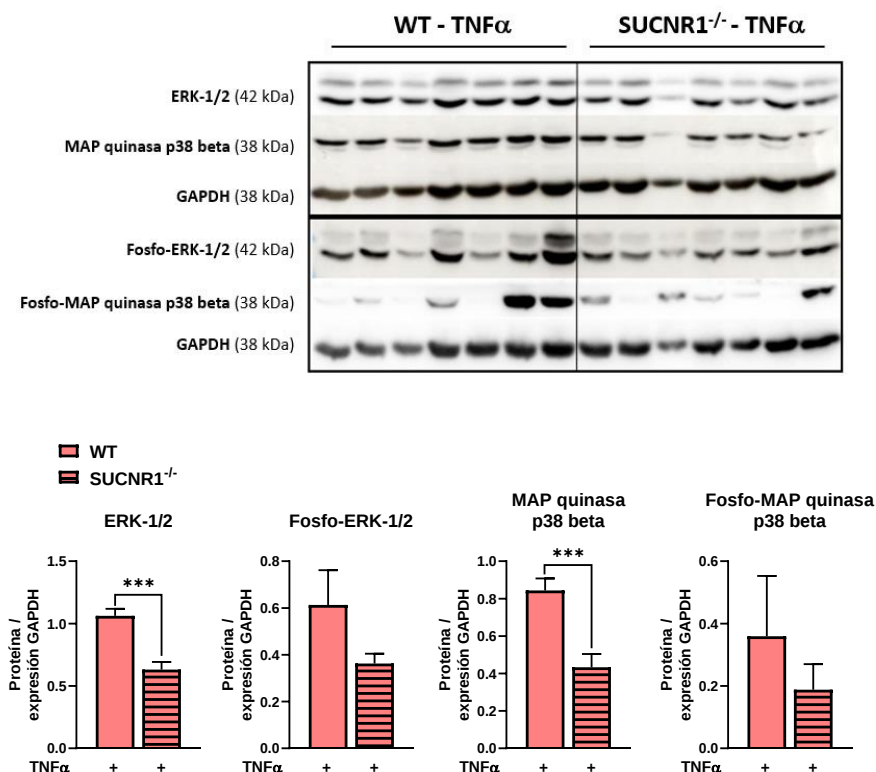


Figura 78. La ausencia de SUCNR1 provoca una atenuación de otras vías de señalización mediadas por el TNFα en el tejido cremastérico de ratón. Imagen representativa del análisis por WB de las proteínas ERK-1/2, ERK-1/2 fosforilada, MAP quinasa p38 beta y MAP quinasa p38 beta fosforilada en muestras de cremáster de ratones de cepa salvaje (WT) y ratones carentes de SUCNR1 (SUCNR1^{-/-}) tratados con TNFα (500ng, i.p) durante 4h (N = 7). El gráfico muestra la expresión de dichas proteínas frente a GAPDH. Las barras en las gráficas representan la media ± SEM y las diferencias significativas se muestran mediante ***P<0.001 vs WT-TNF (Student's t-test).

Analizamos en paralelo las HUVEC tratadas con TNFα en presencia y ausencia del antagonista del SUCNR1 y, como se muestra en la **Figura 79**, el bloqueo del receptor redujo la expresión proteica del NF-κB total.

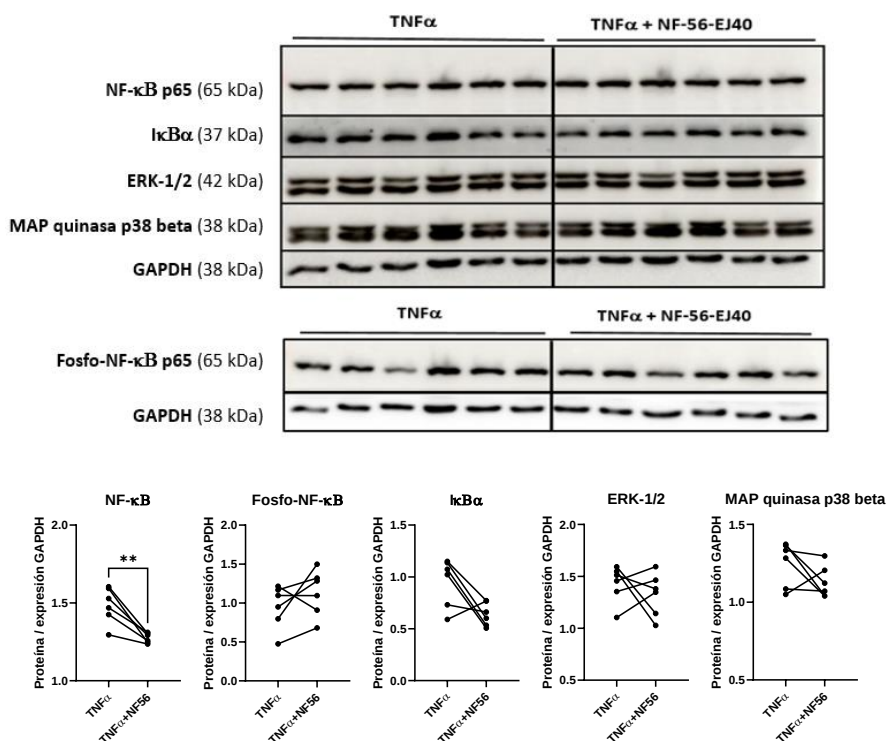


Figura 79. El bloqueo del receptor SUCNR1 reduce la expresión proteica de NF-κB inducida por TNFα en HUVEC. Imagen correspondiente al análisis por WB de las proteínas NF-κB p65, NF-κB p65 fosforilada, IκBα, ERK-1/2 y la MAP quinasa p38 beta en HUVEC tratadas con el antagonista del receptor de succinato NF-56-EJ40 (1μM) 30 minutos antes del estímulo con TNFα (20 ng/ml, 4h) (N = 6). El gráfico muestra la expresión de dichas proteínas frente a GAPDH. Las barras en las gráficas representan la media ± SEM y las diferencias significativas se muestran mediante **p<0.01 vs HUVEC tratadas con el vehículo del antagonista (Student's t-test).

Por otro lado, vimos que el tratamiento con TNFα o con succinato tendieron a aumentar NFκB y fosfo-NFκB pero sin alcanzar significancia estadística, mientras que las células tratadas con ambos a la vez mostraron niveles significativamente reducidos de IκBα en comparación con las células tratadas con TNFα sólo (Figura 80).

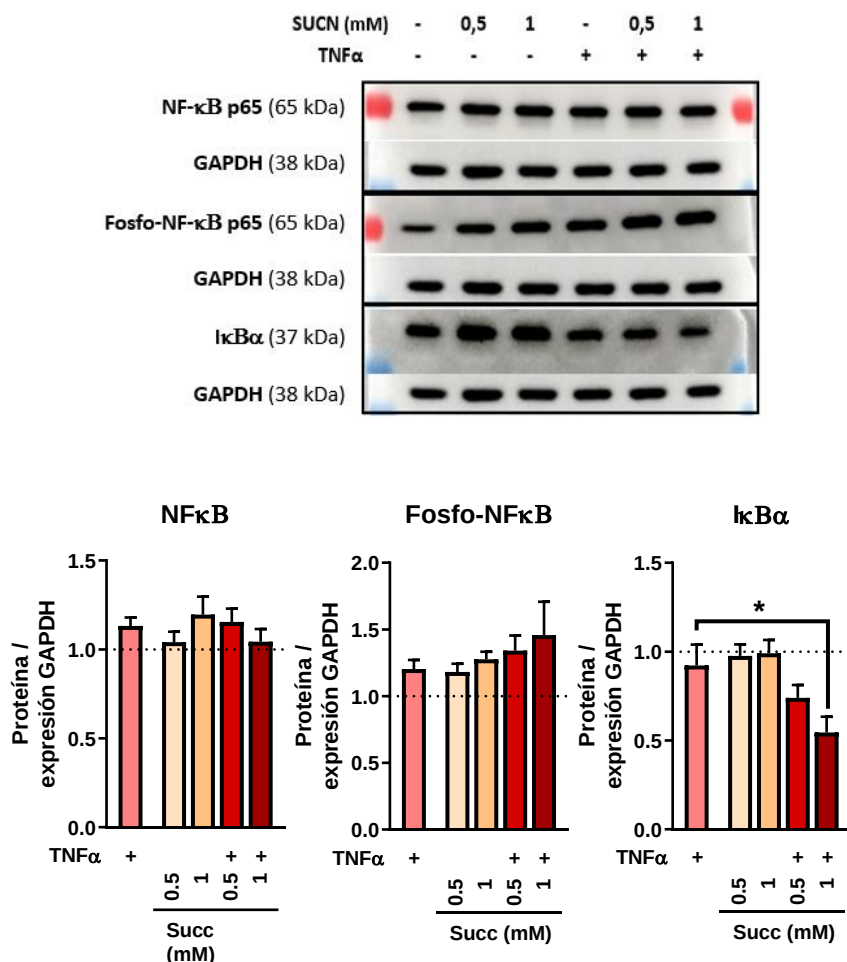


Figura 80. Efectos del tratamiento con TNF α , succinato o la combinación de ambos sobre la vía NF- κ B en HUVEC. Imagen representativa del análisis por WB de las proteínas NF- κ B p65, NF- κ B p65 fosforilada e I κ B α en HUVEC tratadas con succinato a distintas concentraciones (0.5mM y 1mM), TNF α (20ng/ml) o la combinación de succinato más TNF α durante 4h (N = 12). El gráfico muestra la expresión de dichas proteínas frente a GAPDH y referida al nivel de expresión detectada en células tratadas con vehículo (línea punteada). Las barras en las gráficas representan la media $\pm$ SEM, la línea punteada representa la expresión en HUVEC tratadas con vehículo y las diferencias significativas se muestran mediante *P<0.05 vs el grupo indicado (ANOVA + Tukey test).

10.4. El succinato exógeno modifica la expresión de E-selectina en HUVEC

Finalmente, analizamos la expresión de las moléculas de adhesión que median las interacciones leucocito-endotelio mediante citometría de flujo. Como se muestra en la **Figura 81**, la expresión superficial de E-selectina en HUVEC aumentó significativamente con el tratamiento con succinato en condiciones control. Por el contrario, el succinato redujo significativamente la expresión de E-selectina en células tratadas con TNF α (**Figura 81**). Ninguno de estos tratamientos modificó la expresión de VCAM1 o ICAM1 en células endoteliales (**Figura 81**), ni la expresión de moléculas de adhesión leucocitaria en PMN, monocitos o linfocitos humanos (**Figuras 82 y 83**).

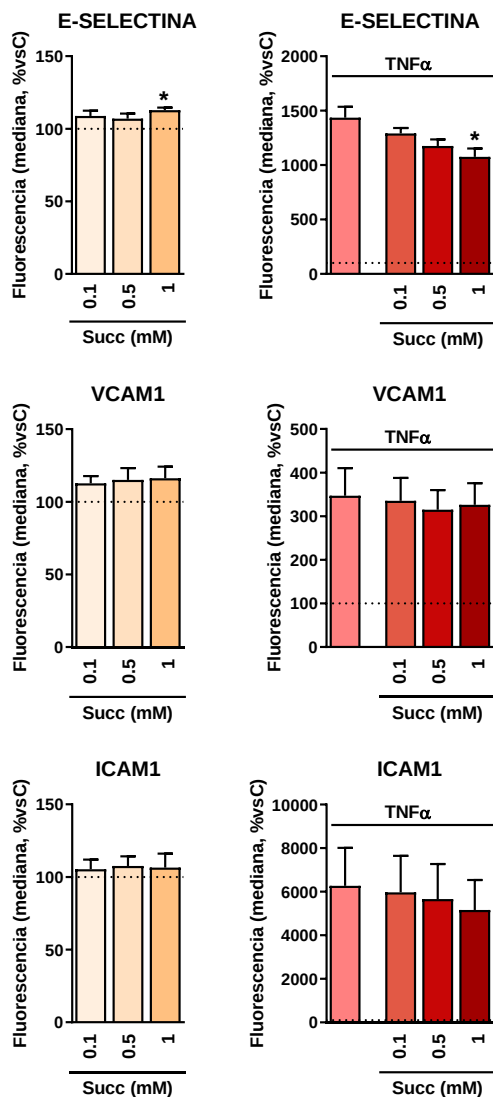


Figura 81. El succinato modifica la expresión de E-selectina en HUVEC. Se trataron las HUVEC con succinato a distintas concentraciones (0.1mM, 0.5mM y 1mM), TNFα (20ng/ml) o la combinación de succinato más TNFα (N = 3). Se analizó la expresión de las moléculas de adhesión mediante citometría de flujo. Las gráficas muestran los resultados como la media ± SEM, la línea punteada representa la expresión en HUVEC tratadas con vehículo y las diferencias significativas se muestran mediante *P<0.05 vs vehículo (HUVEC tratadas solo con succinato) o vs TNFα (HUVEC tratadas con la combinación TNFα + succ) (ANOVA + Tukey test).

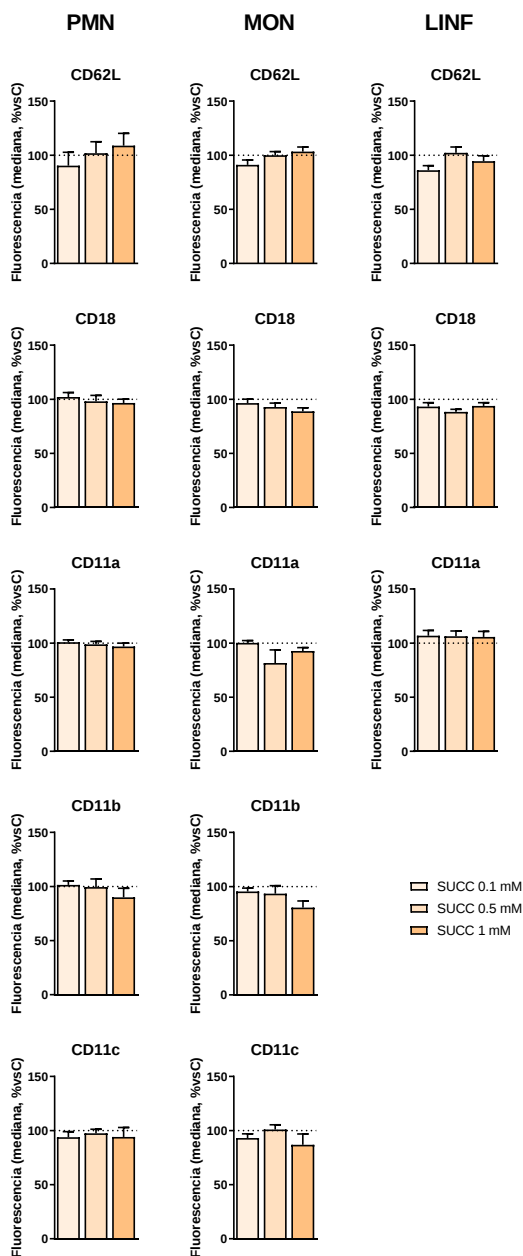


Figura 82. El succinato no modifica la expresión de las moléculas de adhesión en leucocitos de donantes sanos. La sangre entera se trató con succinato a distintas concentraciones (0.1mM, 0.5mM y 1mM) durante 4h (N ≥ 5). Se analizó la expresión de las moléculas de adhesión mediante citometría de flujo. Las gráficas muestran los resultados como la media ± SEM y la línea punteada representa la expresión en leucocitos tratados con vehículo.

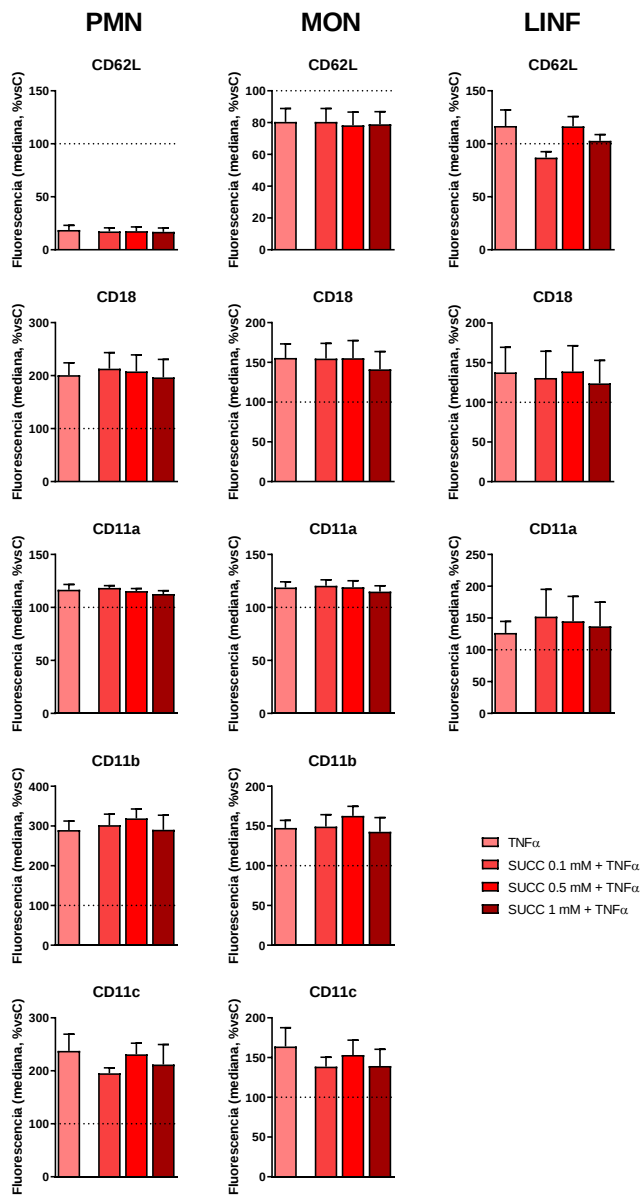


Figura 83. La combinación de succinato y TNF α no modifica la expresión de las moléculas de adhesión en leucocitos de donantes sanos. La sangre entera se trató con la combinación de succinato a distintas concentraciones (0.1mM, 0.5mM y 1mM) y TNF α (20ng/ml) durante 4h (N $\geq$ 6). Se analizó la expresión de las moléculas de adhesión mediante citometría de flujo. Las gráficas muestran los resultados como la media $\pm$ SEM y la línea punteada representa la expresión en leucocitos tratados con vehículo.



DISCUSIÓN

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) supone un gran reto médico y científico, debido principalmente a la etiología multifactorial y a la complejidad de sus manifestaciones clínicas. Su carácter crónico implica la aparición de episodios inflamatorios recurrentes, daño tisular progresivo y el desarrollo de complicaciones como estenosis y fístulas, que afectan significativamente a la calidad de vida de los pacientes. Además, su incidencia y prevalencia están en constante aumento, llegando a ser la segunda enfermedad inflamatoria crónica más común en el mundo, solo por detrás de la artritis reumatoide (12). Frente a todo esto, seguimos careciendo de opciones terapéuticas que eviten la progresión de la enfermedad en un número importante de pacientes.

La falta de terapias específicas se explica en gran medida por el desconocimiento de los factores causales. Parece que la enfermedad deriva de una combinación de circunstancias, pero no se han identificado elementos etiológicos clave cuyo bloqueo farmacológico permita controlar la enfermedad y frenar su evolución. Por todo ello, sigue siendo necesario un mayor conocimiento de los mecanismos que llevan a la disfunción intestinal. Con este objetivo, el presente estudio se inició con un análisis global de la actividad transcripcional del tejido intestinal afecto de pacientes de Crohn y su comparación con el tejido no afecto o tejidos control. Los resultados de este análisis que, a diferencia de la mayoría de los publicados, incluía todo el grosor de la pared intestinal y era por tanto reflejo de toda la alteración estructural que se presenta con la cronicidad de la enfermedad, sirvió de guía para el estudio de potenciales mecanismos etiopatogénicos implicados en las complicaciones de la EC mediante aproximaciones experimentales.

A continuación, se discuten los principales resultados obtenidos.

1. Notch - integrinas

El estudio transcriptómico reveló alteraciones significativas en el perfil de expresión génica en las muestras ileales afectas en comparación con el de los tejidos no afectos de los mismos pacientes de Crohn. En concreto, se identificaron cerca de 5000 genes expresados de manera diferencial. El análisis de enriquecimiento de ontología genética (GO) reflejó que este perfil de expresión génica estaba muy probablemente asociado con los cambios en la arquitectura tisular provocados por la enfermedad. Así, muchos de los términos más significativamente sobrerrepresentados se referían a alteraciones de la organización de la matriz extracelular (MEC), de la angiogénesis y de la estructura epitelial, junto a la acumulación leucocitaria. Entremezclados con estos factores estructurales, y de forma lógica, aparecían con frecuencia términos relacionados con la interacción física de las células con su entorno. Con el objetivo de detectar los elementos moleculares que pudieran estar implicados en la génesis de estas alteraciones, analizamos los genes referidos en todos estos términos y encontramos componentes de la ruta de señalización Notch como elemento común a muchos de ellos.

Un análisis más detallado del funcionamiento de la vía Notch en estos tejidos nos permitió confirmar que las muestras ileales afectas de pacientes con EC muestran una activación de la ruta Notch que se concreta en una sobreexpresión de Notch3, receptor que se detecta en el endotelio vascular, en el musculo liso y en células de la lámina propia. Asimismo, corroboramos los resultados de la secuenciación respecto a las alteraciones de los distintos compartimentos tisulares. Los estudios de RT-PCR evidenciaron que los tejidos dañados en efecto mostraban: a) expansión del compartimento mesenquimal (sobreexpresión de componentes de la MEC como colágenos, glicoproteínas o proteoglicanos y de enzimas remodeladoras de la misma); b) expansión del compartimento vascular / endotelial (aumento en la expresión génica de marcadores endoteliales y de genes relacionados con angiogénesis y función endotelial); y c) reducción del

compartimento epitelial (menor expresión del principal marcador de célula epitelial). Todos estos cambios en la arquitectura tisular necesariamente implican alteraciones de la interacción de las células locales con su entorno, y sabemos que la interacción de los componentes de la MEC con las células a las que envuelve puede regular tanto su movimiento y ubicación como su funcionamiento más global mediante la modulación de su señalización intracelular (169, 170). De hecho, en la actualidad se asume que la MEC es un elemento esencial en la regulación de la respuesta de las células locales al daño tisular y que su acumulación parece clave en el mantenimiento de una fibrogénesis activa (170). Por todo ello, analizamos el patrón de expresión de los receptores del principal componente de la MEC intestinal, que es el colágeno. Dicho análisis mostró una sobreexpresión específica de la integrina $\alpha 11$ en muestras afectas respecto a las no afectas y a los controles. Además, el estudio histológico localizó la integrina predominantemente en el endotelio vascular y la lámina propia, y mostró su abundante expresión en la zona fibrótica de las muestras afectas. Los resultados indicaban, por tanto, que las alteraciones estructurales del tejido intestinal de pacientes de Crohn complicados por la aparición de estenosis y/o fístulas se acompañaba de una sobreexpresión del receptor Notch3 y de la integrina $\alpha 11$. El último paso en el estudio de estas muestras patológicas fue analizar si estos fenómenos estaban relacionados. Para ello, realizamos un estudio de correlación con los datos de expresión génica y observamos que, en efecto, existía una correlación positiva y significativa entre el nivel de expresión de ITGA11 y NOTCH3 y, de ambos genes con los marcadores de la MEC y de células endoteliales. En paralelo, se relacionaban negativamente con el marcador epitelial. Estos resultados apuntaban a un papel activo de estos dos genes en la expansión mesenquimal y vascular y en la reducción del compartimento epitelial en estos pacientes.

Es indudable el papel de la ruta Notch en la regulación fisiológica de la integridad del epitelio intestinal (236). Evidencias previas han descrito

alteraciones en esta ruta en la EI y estudios mecanísticos han hipotetizado su relevancia en la alteración de la composición celular del epitelio y la consecuente alteración de la función barrera (162). En algunos casos, la disfunción intestinal se ha atribuido a la desregulación de la ruta Notch en células inmunes (237, 238). Nuestro estudio analiza su relevancia en el compartimento vascular.

Intentando inferir el papel de la alteración de la ruta Notch a este nivel, hemos estudiado sus efectos sobre las células endoteliales. Hemos demostrado que su exposición al mediador fibrogénico e inductor de EndoMT TGF- β 2 imita la situación observada en los pacientes con EC, ya que la expresión de NOTCH3 aumenta y esto se acompaña de una sobreexpresión de ITGA11. El tratamiento con DLL4 eleva igualmente la expresión endotelial de esta integrina. Ello no se asocia a EndoMT, pero sí a una mayor migración celular que, de acuerdo con los experimentos de silenciamiento, depende de la inducción de ITGA11. Estos resultados y la asociación entre la expresión de ITGA11 y de marcadores endoteliales/vasculares en pacientes con EC y en el modelo murino de fibrosis intestinal sugieren que este mecanismo contribuye a la angiogénesis anormal que se observa en las lesiones intestinales. Así, la integrina α 11, cuyo papel se ha ceñido hasta ahora a la regulación del funcionamiento de los fibroblastos (181), parece mediar los efectos vasculares de la señalización Notch y contribuir a la angiogénesis en la EC al desempeñar un papel similar a las integrinas α 1 y α 2 en heridas y tumores (239). Es importante destacar que este aumento de la angiogénesis, lejos de beneficiar la integridad de la mucosa, se asocia a una reducción paradójica de la perfusión sanguínea (240, 241) y establece un bucle con la inflamación, donde cada proceso favorece al otro (242-244). Su relevancia en la fibrogénesis intestinal es mucho menos conocida, si bien la expansión del compartimento endotelial puede contribuir a la progresión de la fibrosis por mecanismos variados (245). De hecho, las estrategias que previenen la fibrosis intestinal se asocian a una menor angiogénesis (246, 247, 248) y los efectos

vasculares de la disfunción de la ruta Notch se han implicado directamente en la fibrosis hepática (249).

Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la activación de la señalización Notch puede contribuir a los cambios estructurales observados en la pared ileal de los pacientes con EC al actuar sobre las células endoteliales para promover una actividad angiogénica anormal. De acuerdo con ello, la inhibición de la ruta Notch podría prevenir o reducir la alteración estructural de la pared intestinal. Por otro lado, nuestro estudio identifica por primera vez a la integrina- α 11 como mediador de los efectos vasculares de la vía Notch y la identifica también como potencial diana farmacológica. Su bloqueo constituiría una alternativa al control de la ruta Notch, estrategia que se ha mostrado compleja dada la importancia de esta vía en la fisiología de numerosos tejidos y la variabilidad de sus efectos en función del contexto (236).

2. miARN

El papel de los miARN en la regulación de la expresión genética ha sido evidenciado en un gran número de condiciones y patologías (250-253). En la EII se ha demostrado también la implicación de distintos miARN en el progreso de la enfermedad (254). Nuestros resultados pusieron de manifiesto un cambio sustancial en la expresión de miARN en el tejido afecto de pacientes con EC. Tratando de inferir si la menor expresión de alguno de estos miARN era responsable de la sobreexpresión de los genes recogidos en los términos GO relativos a los cambios vasculares, hicimos un estudio de correlación, y obtuvimos asociaciones negativas y significativas con una mayoría de ellos.

Partiendo de esta visión general, seleccionamos tres miARN (miR-378a-3p, miR-7-5p y miR-3529-3p) por cumplir los siguientes requisitos: i) expresión elevada en los tejidos no afectados y control, ii) reducción muy significativa en el tejido afecto, y iii) alto grado de correlación negativa con los genes indicativos

de disfunción vascular. Además, pusimos especial atención en el miR-378a-3p debido a su implicación previa en procesos angiogénicos (234, 255, 256), su papel protector en la fibrosis cardíaca (235), y su desregulación en el cáncer (257, 258). La reducción en su expresión, confirmada por qPCR-TaqMan, ampliaba además evidencias recientes y en el mismo sentido referidas a la mucosa inflamada de pacientes con colitis ulcerosa (259) y a heces de pacientes con EC no complicada (260). Todo ello apuntaba a la desregulación de este miRNA como elemento contribuyente a la EC. Nos interesaba en particular testar su posible implicación en los cambios vasculares y, en este sentido, confirmamos que las células endoteliales expresaban miR-378a-3p y descubrimos que esta expresión se reducía en respuesta al tratamiento con TGF- β 2 como agente inductor del ambiente fibrótico propio de las lesiones intestinales. Para testar si su carencia pudiera ser, en parte, responsable de la mayor actividad de la ruta Notch en estos territorios, suplementamos el medio de cultivo con miR-378a-3p exógeno y ello se tradujo en una reducción en la expresión de NOTCH1, lo que identifica a este gen como su potencial diana, pero no modificó la de NOTCH3, el receptor que se sobreexpresa en las lesiones intestinales. Por tanto, si bien los antecedentes y los estudios de correlación sugieren la implicación de miR-378a-3p en la disfunción vascular asociada a la EC complicada, no parece probable que lo haga mediante la modulación del eje de señalización Notch3 - integrina α 11 descrito en el apartado anterior.

3. SUCNR1

Desde 2004 el receptor SUCNR1 ha sido estudiado y clasificado como un receptor involucrado en la señalización celular, homeostasis y procesos metabólicos (190, 191, 198, 201, 205). Principalmente es activado por el succinato, un metabolito que se acumula en situaciones de hipoxia e inflamación (190, 194). De hecho, el succinato se ha asociado con afecciones inflamatorias como la artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, aterosclerosis e

infarto de miocardio, obesidad, EHGNA, uveítis, neuroinflamación (SNC) o cáncer, donde se registraron niveles elevados de este metabolito (261). Además, en la EC hemos observado una sobreexpresión de SUCNR1 (194, 218). La mayoría de evidencias que implican esta vía en el proceso inflamatorio se refieren a la regulación de la acción macrofágica. Sin embargo, analizando el patrón de expresión de SUCNR1 en las muestras intestinales procedentes de enfermos de Crohn observamos su presencia en células endoteliales y, dado el papel esencial de este tipo celular en la captación y acumulación de leucocitos y, por tanto, en la formación del foco inflamatorio, nos interesó estudiar si su funcionamiento se veía modulado por la vía succinato-SUCNR1. Para ello, analizamos *in vivo* si las interacciones leucocito-endotelio provocadas por una citocina común y con un papel esencial en la EII, como es el $\text{TNF}\alpha$, se veían afectadas por la carencia del receptor de succinato. Los estudios de microscopía intravital indicaron que la activación de SUCNR1 contribuye de forma significativa al rodamiento y adhesión leucocitarias inducidas por $\text{TNF}\alpha$, ya que ambos parámetros se vieron reducidos en ratones carentes en el receptor. Estos resultados implican que el $\text{TNF}\alpha$, de algún modo, provoca la liberación de succinato. Según antecedentes previos, este efecto metabólico del TNF puede ser consecuencia de la inhibición de la cadena de transporte de electrones (262-265), y de un aumento de la glutaminólisis que alimentaría el ciclo de Krebs con el α -cetoglutarato resultante (266). La inhibición de las interacciones leucocito-endotelio se acompañó de una reducción de la expresión de citocinas inflamatorias y una menor actividad de la vía de señalización NF- κ B, así como de niveles reducidos de otras proteínas implicadas en la señalización intracelular que median la inflamación, como las proteínas MAPK, ERK-1/2 y P38. Cuando los niveles locales de succinato se incrementaron exógenamente por la inyección intraescrotal de una alta concentración de este mediador, la reacción inflamatoria tendió a ser más intensa y mostró menor dependencia de SUCNR1. En particular, encontramos que parte de la respuesta de adhesión de los leucocitos y la

regulación positiva de la expresión de TNFA o IL1B no requería de la presencia de este receptor, lo que apuntaría a los efectos mitocondriales o citosólicos del succinato (190, 209) como mediadores de la respuesta inflamatoria cuando se agregan altos niveles de succinato a los tejidos bajo la influencia de dosis inflamatorias de TNF α .

Los estudios *in vitro* con células humanas en una cámara de flujo paralelo que imita la situación vascular *in vivo*, mostraron resultados parecidos. Así, el bloqueo farmacológico de SUCNR1 redujo significativamente las interacciones leucocito-endotelio inducidas por el tratamiento de las células endoteliales (HUVEC) con TNF α , y este efecto se acompañó también de una reducción en la vía de señalización NF- κ B. Por tanto, la respuesta observada en ratón parece ser relevante en humanos. Se apuntala la idea de que la liberación de succinato y el estímulo de SUCNR1 pueden favorecer la formación de un foco inflamatorio en respuesta al TNF α y se da protagonismo a la célula endotelial en esta respuesta. No obstante, los efectos derivados de la adición exógena de succinato fueron algo más complejos. Observamos que el tratamiento de las células endoteliales con succinato aumentó el rodamiento de leucocitos a valores comparables con los inducidos por el TNF α , efecto que podría deberse al ligero aumento en la expresión de E-selectina detectado por citometría de flujo en HUVEC. Sobre la adhesión leucocitaria, el succinato provocó una elevación significativa, si bien muy inferior a la inducida por TNF α y, de hecho, no afectó la expresión de las moléculas de adhesión endoteliales claves en este proceso (ICAM1, VCAM1). Por último, y de forma un tanto paradójica, la adición de succinato a células tratadas con TNF α limitó el estímulo sobre el rodamiento inducido por cada uno de ellos por separado y, en paralelo, aminó el incremento en los niveles de E-selectina endoteliales provocado por el TNF α . Por tanto, los resultados nos indican que el succinato exógeno ejerce una acción dual sobre la célula endotelial, manifestando un efecto proinflamatorio en solitario pero atenuando la acción

del $\text{TNF}\alpha$. Los dos tratamientos tienden a elevar los niveles de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ y fosfo- $\text{NF-}\kappa\text{B}$, y las células tratadas con la combinación presentan niveles de fosfo- $\text{NF-}\kappa\text{B}$ similares y muestran además una reducción significativa en la expresión del inhibidor de esta vía, la proteína $\text{I}\kappa\text{B}$. Vistos en conjunto, los resultados indicarían que, si bien el estímulo de las vías inflamatorias inducido por $\text{TNF}\alpha$ persiste tras la adición de succinato, las células responden a este metabolito con alguna alteración en la dinámica de las moléculas de adhesión que justificaría en último término un menor rodamiento. A este respecto cabe reseñar que, tras el incremento en su expresión inducidos por el $\text{TNF}\alpha$, la presencia de estas proteínas en la superficie celular puede reducirse por sección y liberación de formas solubles, o mediante su internalización por endocitosis. El primer mecanismo se ha descrito con todas ellas (267), mientras que el segundo es relevante tan solo en el caso de la E-selectina (268, 269), quien muestra una expresión en superficie más transitoria (269, 270). La dinámica de la E-selectina depende de su ubicación en la membrana celular. Su asociación a las balsas lipídicas favorece el rodamiento leucocitario, mientras que su presencia en las fosas recubiertas de clatrina media tanto el rodamiento como su internalización (271). A este respecto, cabe resaltar que el succinato, a concentraciones semejantes a las empleadas en nuestro estudio y tras su transformación por la succinato deshidrogenasa, induce la oxidación de lípidos de membrana, provoca una reorganización de la membrana y reduce el glicocalix en células endoteliales (272). Es posible que junto al efecto deletereo esperable de estas acciones, el efecto desestructurador de la membrana plasmática tenga como efecto colateral una alteración en la distribución, regulación y funcionalidad de la E-selectina.

El análisis global de los resultados nos indica que la activación del receptor SUCNR1 media la activación endotelial y la consecuente acumulación leucocitaria inducidas por $\text{TNF}\alpha$, y la relevancia de esta citocina en la enfermedad

de Crohn y otras muchas enfermedades inflamatorias crónicas recomienda el análisis del receptor SUCNR1 como potencial diana de nuevas terapias antiinflamatorias.



CONCLUSIONES

1. El tejido ileal afecto por la enfermedad de Crohn muestra un transcriptoma diferencial indicativo de acumulación de matriz extracelular e incremento del compartimento vascular, de reducción epitelial, de acumulación de células inflamatorias, y de alteraciones en las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular.
2. El tejido ileal de los pacientes de Crohn presenta un aumento en la expresión de Notch3 y de integrina $\alpha 11$ que se correlaciona con indicadores de expansión endotelial, de fibrosis y de pérdida epitelial.
3. Las proteínas Notch3 e integrina $\alpha 11$ se detectan en el endotelio de los vasos del tejido ileal de pacientes de Crohn y su expresión en células endoteliales aumenta en respuesta al TGF- β .
4. La integrina $\alpha 11$ media la migración de las células endoteliales inducida por DLL4.
5. El tejido ileal afecto por la enfermedad de Crohn presenta un patrón de expresión diferencial de micro-ARN en el que destaca miR-378a-3p por mostrar una reducción muy significativa y un elevado grado de correlación negativa con indicadores de expansión endotelial.
6. La expresión de miR-378a-3p en células endoteliales se reduce en respuesta al TGF- β y su restitución reduce la expresión de NOTCH1 y NOTCH4.
7. El tejido ileal afecto por la enfermedad de Crohn expresa SUCNR1 en el endotelio vascular.
8. La ausencia o bloqueo de SUCNR1 reduce significativamente las interacciones leucocito-endotelio y la activación de la vía NF- κ B inducidas por TNF α , si bien la exposición de las células endoteliales a concentraciones

elevadas de succinato exógeno muestra un patrón complejo de efectos que incluye acciones de carácter antiinflamatorio.

9. La sobreexpresión de Notch3, integrina $\alpha 11$ y SUCNR1 y la reducción de miR-378a-3p detectadas en las lesiones intestinales de los enfermos de Crohn, junto con la influencia que estas moléculas parecen tener sobre la función endotelial, sugieren su contribución a las alteraciones estructurales del tejido intestinal que ocurren con la progresión de la enfermedad y las postulan como nuevas dianas terapéuticas.



BIBLIOGRAFÍA

1. Tontini GE, Vecchi M, Pastorelli L, et al. Differential diagnosis in inflammatory bowel disease colitis: State of the art and future perspectives. *World J Gastroenterol*. 2015;21(1):21-46. doi: 10.3748/wjg.v21.i1.21.
2. Danese S, Fiocchi C. Ulcerative colitis. *N Engl J Med*. 2011;365(18):1713-25.
3. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, et al. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut*. 2006;55(6):749-53.
4. Ordás I, Eckmann L, Talamini M, et al. Ulcerative colitis. *The Lancet*. 2012;380(9853):1606-1619. doi: 10.1016/s0140-6736(12)60150-0.
5. Rieder F, Fiocchi C, Rogler G. Mechanisms, Management, and Treatment of Fibrosis in Patients With Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*. 2017;152(2):340-50 e6.
6. Yoo JH, Holubar S, Rieder F. Fibrostenotic strictures in Crohn's disease. *Intest Res*. 2020;18(4):379-401.
7. Buisson A, Chevaux JB, Allen PB, et al. Review article: the natural history of postoperative Crohn's disease recurrence. *Aliment Pharmacol Ther*. 2012;35(6):625-633. doi:10.1111/j.1365-2036.2012.05002.x
8. Torres J, Mehandru S, Colombel J, et al. Crohn's disease. *The Lancet*. 2017;389(10080):1741-1755.
9. Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *The Lancet*. 2012;380(9853):1590-1605. doi: 10.1016/s0140-6736(12)60026-9.
10. Pariente B, Mary JY, Danese S, et al. Development of the Lémann index to assess digestive tract damage in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2015;148(1):52-63.e3. doi: 10.1053/j.gastro.2014.09.015
11. Pariente B, Cosnes J, Danese S, et al. Development of the Crohn's disease digestive damage score, the Lémann score. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17(6):1415-1422. doi:10.1002/ibd.21506

12. Rohr M, Narasimhulu CA, Sharma D, et al. Inflammatory diseases of the gut. *J Med Food*. 2018;21(2):113-126. doi: 10.1089/jmf.2017.0138.
13. Collaborators GBDIBD. The global, regional, and national burden of inflammatory bowel disease in 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2020;5(1):17-30.
14. Puig L, Ruiz de Morales JG, Dauden E, et al. La prevalencia de diez enfermedades inflamatorias inmunomediadas (IMID) en España. *Revista Española de Salud Pública*. 2020;93:e201903013.
15. Jarmakiewicz-Czaja S, Gruszecka J, Filip R. The Diagnosis of Intestinal Fibrosis in Crohn's Disease-Present and Future. *Int J Mol Sci*. 2024;25(13):6935. doi:10.3390/ijms25136935
16. Kaplan GG. The global chang of IBD: From 2015 to 2025. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;12(12):720-727. doi: 10.1038/nrgastro.2015.150.
17. Ng SC, Shi HY, Hamidi N, Underwood FE, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: A systematic review of population-based studies. *The Lancet*. 2017;390(10114):2769-78. doi: 10.1016/s0140-6736(17)32448-0.
18. Burisch J, Munkholm P. The epidemiology of inflammatory bowel disease. *Scandinavian J Gastroenterol*. 2015;50(8):942-951. doi: 10.3109/00365521.2015.1014407.
19. Ananthakrishnan AN. Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;12(4):205. doi: 10.1038/nrgastro.2015.34.
20. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*. 2012;142(1):46-54.e42. doi: 10.1053/j.gastro.2011.10.001.

21. Borowitz SM. The epidemiology of inflammatory bowel disease: Clues to pathogenesis?. *Front Pediatr.* 2023;10:1103713. doi: 10.3389/fped.2022.1103713
22. Ashton JJ, Beattie RM. Inflammatory bowel disease: Recent developments. *Arch Dis Child.* 2023;109(5):370-376. doi: 10.1136/archdischild-2023-325668.
23. Korolkova OY, Myers JN, Pellom ST, et al. Characterization of Serum Cytokine Profile in Predominantly Colonic Inflammatory Bowel Disease to Delineate Ulcerative and Crohn's Colitides. *Clin Med Insights Gastroenterol.* 2015;8:29-44. doi:10.4137/CGast.S20612
24. Chen P, Zhou G, Lin J, et al. Serum Biomarkers for Inflammatory Bowel Disease. *Front Med (Lausanne).* 2020;7:123. doi:10.3389/fmed.2020.00123
25. Suárez Ferrer C, Abadía Barno M, Martín Arranz E, et al. The use of serum calprotectin as a biomarker for inflammatory activity in inflammatory bowel disease. *Rev Esp Enferm Dig.* 2019;111(10):744-749. doi: 10.17235/reed.2019.5797/2018
26. Kapsoritakis AN, Kapsoritaki AI, Davidi IP, et al. Imbalance of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) - 1 and - 4 serum levels, in patients with inflammatory bowel disease. *BMC Gastroenterol.* 2008;8(1):55. doi: 10.1186/1471-230X-8-55
27. Verspaget HW, Biemond I, Allaart CF, et al. Assessment of plasma fibronectin in Crohn's disease. *Hepatogastroenterology.* 1991;38:231-234.
28. M'Koma AE. Inflammatory Bowel Disease: Clinical Diagnosis and Surgical Treatment-Overview. *Medicina (Kaunas).* 2022;58(5).
29. Radford SJ, Abdul-Aema B, Tench C, et al. Substantial cost savings of ultrasound-based management over magnetic resonance imaging-based management in an inflammatory bowel disease service. *Scand J Gastroenterol.* 2024;59(6):683-689.

30. Stange EF, Travis SP, Vermeire S, et al. European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: Definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis*. 2008;2(1):1-23.
31. Mowat C, Cole A, Windsor A, et al. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut*. 2011;60(5):571-607.
32. Dolinger M, Torres J, Vermeire S. Crohn's disease. *Lancet*. 2024;403(10432):1177-1191. doi:10.1016/S0140-6736(23)02586-2
33. Jefremow A, Neurath MF. Novel Small Molecules in IBD: Current State and Future Perspectives. *Cells*. 2023;12(13):1730.
34. Torres J, Bonovas S, Doherty G, et al. ECCO Guidelines on Therapeutics in Crohn's Disease: Medical Treatment. *J Crohns Colitis*. 2020;14(1):4-22. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjz180
35. Raine T, Bonovas S, Burisch J, et al. ECCO Guidelines on Therapeutics in Ulcerative Colitis: Medical Treatment. *J Crohns Colitis*. 2022;16(1):2-17. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjab178
36. Bettenworth D, Baker ME, Fletcher JG, et al. A global consensus on the definitions, diagnosis and management of fibrostenosing small bowel Crohn's disease in clinical practice. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2024;21(8):572-584. doi:10.1038/s41575-024-00935-y
37. D'Haens GR, van Deventer S. 25 years of anti-TNF treatment for inflammatory bowel disease: lessons from the past and a look to the future. *Gut*. 2021;70(7):1396-405.
38. Honap S, Jairath V, Danese S, Peyrin-Biroulet L. Navigating the complexities of drug development for inflammatory bowel disease. *Nat Rev Drug Discov*. 2024;23(7):546-562. doi:10.1038/s41573-024-00953-0
39. Liu J, Di B, Xu LL. Recent advances in the treatment of IBD: Targets, mechanisms and related therapies. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2023;71-72:1-12.

40. Fudman DI, McConnell RA, Ha C, et al. Modern Advanced Therapies for Inflammatory Bowel Diseases: Practical Considerations and Positioning. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2025;23(3):454-468. doi:10.1016/j.cgh.2024.06.050
41. Lamb CA, Saifuddin A, Powell N, et al. The Future of Precision Medicine to Predict Outcomes and Control Tissue Remodeling in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*. 2022;162(5):1525-1542. doi: 10.1053/j.gastro.2021.09.077
42. Parigi TL, D'Amico F, Abreu MT, et al. Difficult-to-treat inflammatory bowel disease: results from an international consensus meeting. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2023;8(9):853-859. doi:10.1016/S2468-1253(23)00154-1
43. Liu Z, Liu R, Gao H, et al. Genetic architecture of the inflammatory bowel diseases across East Asian and European ancestries. *Nat Genet*. 2023;55(5):796-806. doi:10.1038/s41588-023-01384-0
44. Yamamoto-Furusho JK, Fonseca-Camarillo G. Genetic Markers Associated with Clinical Outcomes in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2015;21:2683-2695.
45. Liu JZ, van Sommeren S, Huang H, et al. Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nat Genet*. 2015;47:979–986. doi: 10.1038/ng.3359
46. Noble AJ, Nowak JK, Adams AT, et al. Defining Interactions Between the Genome, Epigenome, and the Environment in Inflammatory Bowel Disease: Progress and Prospects. *Gastroenterology*. 2023;165(1):44-60.e2. doi: 10.1053/j.gastro.2023.03.238
47. Liang B, Wang Y, Xu J, et al. Unlocking the potential of targeting histone-modifying enzymes for treating IBD and CRC. *Clin Epigenetics*. 2023;15(1):146. doi:10.1186/s13148-023-01562-1

48. Yarani R, Shojaeian A, Palasca O, et al. Differentially Expressed miRNAs in Ulcerative Colitis and Crohn's Disease. *Front Immunol*. 2022;13:865777. doi: 10.3389/fimmu.2022.865777
49. Alfaifi J, Germain A, Heba AC, et al. Deep Dive Into MicroRNAs in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2023;29(6):986-999. doi: 10.1093/ibd/izac250
50. Zhang Y, Li Y. Inflammatory bowel disease: pathogenesis. *World J Gastroenterol*. 2014;20: 91-99.
51. Khalili H, Chan SSM, Lochhead P, et al. The role of diet in the aetiopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018;15(9):525-535.
52. Ananthakrishnan AN, Khalili H, Konijeti GG, et al. A prospective study of long-term intake of dietary fiber and risk of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2013;145(5):970-977.
53. Ananthakrishnan AN, Khalili H, Konijeti GG, et al. Long-term intake of dietary fat and risk of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut*. 2014;63(5):776-784.
54. Mahid SS, Minor KS, Soto RE, et al. Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Mayo Clin Proc*. 2006;81(11):1462-1471.
55. Parkes GC, Whelan K, Lindsay JO. Smoking in inflammatory bowel disease: impact on disease course and insights into the aetiology of its effect. *J Crohns Colitis*. 2014;8(8):717-725.
56. Camara RJ, Ziegler R, Begre S, et al. The role of psychological stress in inflammatory bowel disease: quality assessment of methods of 18 prospective studies and suggestions for future research. *Digestion*. 2009;80(2):129-139.
57. Bonaz BL, Bernstein CN. Brain-gut interactions in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2013;144(1):36-49.

58. Tavares De Sousa H, Magro F. How to evaluate fibrosis in IBD? *Diagnostics*. 2023;13(13). doi: 10.3390/diagnostics13132188.
59. Martini E, Krug SM, Siegmund B, et al. Mend Your Fences: The Epithelial Barrier and its Relationship With Mucosal Immunity in Inflammatory Bowel Disease. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2017;4(1):33-46.
60. Vancamelbeke M, Vermeire S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;11(9):821-834.
61. Zhu M, Song Y, Xu Y, et al. Manipulating Microbiota in Inflammatory Bowel Disease Treatment: Clinical and Natural Product Interventions Explored. *Int J Mol Sci*. 2023;24(13).
62. Rath T, Atreya R, Neurath MF. A spotlight on intestinal permeability and inflammatory bowel diseases. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2023;17(9):893-902. doi:10.1080/17474124.2023.2242772
63. Mehandru S, Colombel JF. The intestinal barrier, an arbitrator turned provocateur in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2021;18(2):83-84. doi:10.1038/s41575-020-00399-w
64. Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(3):141-53. doi: 10.1038/nri3608.
65. Lacroix V, Cassard A, Mas E, et al. Multi-Omics Analysis of Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Diseases: What Benefits for Diagnostic, Prognostic and Therapeutic Tools? *Int J Mol Sci*. 2021;22(20).
66. Seksik P. Microbiote intestinale et MICI [Gut microbiota and IBD]. *Gastroenterol Clin Biol*. 2010;34 Suppl 1:S44-S51. doi:10.1016/S0399-8320(10)70020-8
67. Melhem H, Kaya B, Ayata CK, et al. Metabolite-Sensing G Protein-Coupled Receptors Connect the Diet-Microbiota-Metabolites Axis to Inflammatory Bowel Disease. *Cells*. 2019;8(5).

68. Conte MP, Schippa S, Zamboni I, et al. Gut-associated bacterial microbiota in paediatric patients with inflammatory bowel disease. *Gut*. 2006;55(12):1760-1767.
69. Libertucci J, Dutta U, Kaur S, et al. Inflammation-related differences in mucosa-associated microbiota and intestinal barrier function in colonic Crohn's disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2018;315(3):G420-G31.
70. Hirano A, Umeno J, Okamoto Y, et al. Comparison of the microbial community structure between inflamed and non-inflamed sites in patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2018;33(9):1590-1597. doi:10.1111/jgh.14129
71. Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, et al. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104: 13780-13785.
72. Bauset C. Characterization of intestinal microbiota and metabolite-sensing GPCRs in inflammatory bowel disease: Relevance of GPR91 and GPR109A. Tesis doctoral. Universitat de València; 2023. <https://hdl.handle.net/10550/92656>
73. Li S, Xu K, Cheng Y, et al. The role of complex interactions between the intestinal flora and host in regulating intestinal homeostasis and inflammatory bowel disease. *Front Microbiol*. 2023;14:1188455.
74. Ni J, Wu GD, Albenberg L, et al. Gut microbiota and IBD: causation or correlation? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14(10):573-584. doi: 10.1038/nrgastro.2017.88.
75. Bourgonje AR, Vogl T, Segal E, et al. Antibody signatures in inflammatory bowel disease: current developments and future applications. *Trends Mol Med*. 2022;28(8):693-705. doi:10.1016/j.molmed.2022.05.004

76. Hedin CRH, Vavricka SR, Stagg AJ, et al. The Pathogenesis of Extraintestinal Manifestations: Implications for IBD Research, Diagnosis, and Therapy. *J Crohns Colitis*. 2019;13(5):541-554. doi:10.1093/ecco-jcc/jjy191
77. Brazil JC, Louis NA, Parkos CA. The role of polymorphonuclear leukocyte trafficking in the perpetuation of inflammation during inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19: 1556-1565.
78. Cromer WE, Mathis JM, Granger DN, et al. Role of the endothelium in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*. 2011;17(5):578-593. doi: 10.3748/wjg.v17.i5.578.
79. Weber C, Fraemohs L, Dejana E. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(6):467-477. doi: 10.1038/nri2096
80. Hine AM, Loke P. Intestinal Macrophages in Resolving Inflammation. *J Immunol*. 2019;203: 593-599.
81. Scott NA, Lawson MAE, Hodgetts RJ, et al. Macrophage metabolism in the intestine is compartment specific and regulated by the microbiota. *Immunology*. 2022;166(1):138-52.
82. Kmiec Z, Cyman M, Ślebioda TJ. Cells of the innate and adaptive immunity and their interactions in inflammatory bowel disease. *Adv Med Sci*. 2017;62(1):1-16. doi:10.1016/j.advms.2016.09.001
83. Schirbel A, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: Established and evolving considerations on its etiopathogenesis and therapy. *J Dig Dis*. 2010;11(5):266-276.
84. Hunter MM, Wang A, Parhar KS, et al. In vitro-derived alternatively activated macrophages reduce colonic inflammation in mice. *Gastroenterology*. 2010;138(4):1395-1405. doi:10.1053/j.gastro.2009.12.041
85. Na YR, Stakenborg M, Seok SH, et al. Macrophages in intestinal inflammation and resolution: a potential therapeutic target in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16(9):531-43.

86. Zhang K, Guo J, Yan W, et al. Macrophage polarization in inflammatory bowel disease. *Cell Commun Signal*. 2023;21(1):367. doi: 10.1186/s12964-023-01386-9.
87. Hegarty LM, Jones GR, Bain CC. Macrophages in intestinal homeostasis and inflammatory bowel disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2023;20(8):538-553. doi:10.1038/s41575-023-00769-0
88. de Souza HS, Fiocchi C. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016;13(1):13-27. doi: 10.1038/nrgastro.2015.186
89. Friedrich M, Pohin M, Powrie F. Cytokine Networks in the Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease. *Immunity*. 2019;50(4):992-1006. doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.017
90. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*. 1998;91(10):3527-3561.
91. Oshima T, Laroux FS, Coe LL, et al. Interferon-gamma and interleukin-10 reciprocally regulate endothelial junction integrity and barrier function. *Microvasc Res*. 2001;61(1):130-143. doi:10.1006/mvre.2000.2288
92. Binion DG, West GA, Ina K, et al. Enhanced leukocyte binding by intestinal microvascular endothelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1997;112(6):1895-1907. doi: 10.1053/gast.1997.v112.pm9178682
93. Binion DG, West GA, Volk EE, et al. Acquired increase in leucocyte binding by intestinal microvascular endothelium in inflammatory bowel disease. *Lancet*. 1998;352(9142):1742-1746. doi:10.1016/S0140-6736(98)05050-8
94. Alkim C, Alkim H, Koksar AR, et al. Angiogenesis in Inflammatory Bowel Disease. *Int J Inflam*. 2015;2015:970890. doi: 10.1155/2015/970890.
95. Maconi G, Sampietro GM, Russo A, et al. The vascularity of internal fistulae in Crohn's disease: an in vivo power Doppler ultrasonography assessment. *Gut*. 2002;50(4):496-500. doi:10.1136/gut.50.4.496

96. Spalinger J, Patriquin H, Miron MC, et al. Doppler US in patients with crohn disease: vessel density in the diseased bowel reflects disease activity. *Radiology*. 2000;217(3):787-791. doi:10.1148/radiology.217.3.r00dc19787
97. Chidlow JH Jr, Langston W, Greer JJ, et al. Differential angiogenic regulation of experimental colitis. *Am J Pathol*. 2006;169(6):2014-2030. doi: 10.2353/ajpath.2006.051021
98. Danese S, Sans M, de la Motte C, et al. Angiogenesis as a novel component of inflammatory bowel disease pathogenesis. *Gastroenterology*. 2006;130(7):2060-2073. doi:10.1053/j.gastro.2006.03.054
99. Danese S, Papa A, Saibeni S, et al. Inflammation and coagulation in inflammatory bowel disease: The clot thickens. *Am J Gastroenterol*. 2007;102(1):174-186. doi:10.1111/j.1572-0241.2006.00943.x
100. Wakefield AJ, Sankey EA, Dhillon AP, et al. Granulomatous vasculitis in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1991;100(5 Pt 1):1279-1287.
101. Scaldaferri F, Vetrano S, Sans M, et al. VEGF-A links angiogenesis and inflammation in inflammatory bowel disease pathogenesis. *Gastroenterology*. 2009;136(2):585-95.e5. doi: 10.1053/j.gastro.2008.09.064
102. Chidlow JH Jr, Langston W, Greer JJ, et al. Differential angiogenic regulation of experimental colitis. *Am J Pathol*. 2006;169(6):2014-2030. doi: 10.2353/ajpath.2006.051021
103. Lovisa S, Genovese G, Danese S. Role of Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Inflammatory Bowel Disease. *J Crohns Colitis*. 2019;13(5):659-668. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjy201.
104. Seco-Cervera M, Ortiz-Masiá D, Macias-Ceja DC, et al. Resistance to apoptosis in complicated Crohn's disease: Relevance in ileal fibrosis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2024;1870(2):166966. doi: 10.1016/j.bbadis.2023.166966.

105. Rieder F, Mukherjee PK, Massey WJ, et al. Fibrosis in IBD: from pathogenesis to therapeutic targets. *Gut*. 2024;73(5):854-866. doi:10.1136/gutjnl-2023-329963
106. Lin SN, Mao R, Qian C, et al. Development of antifibrotic therapy for stricturing Crohn's disease: lessons from randomized trials in other fibrotic diseases. *Physiol Rev*. 2022;102(2):605-652. doi:10.1152/physrev.00005.2021
107. Younesi FS, Miller AE, Barker TH, et al. Fibroblast and myofibroblast activation in normal tissue repair and fibrosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2024;25(8):617-638. doi:10.1038/s41580-024-00716-0
108. Talbott HE, Mascharak S, Griffin M, et al. Wound healing, fibroblast heterogeneity, and fibrosis. *Cell Stem Cell*. 2022;29(8):1161-1180. doi:10.1016/j.stem.2022.07.006
109. Lendahl U, Muhl L, Betsholtz C. Identification, discrimination and heterogeneity of fibroblasts. *Nat Commun*. 2022;13(1):3409. doi:10.1038/s41467-022-30633-9
110. Zhao M, Wang L, Wang M, et al. Targeting fibrosis, mechanisms and clinical trials. *Signal Transduct Target Ther*. 2022;7(1):206. doi:10.1038/s41392-022-01070-3
111. Pariente B, Hu S, Bettenworth D, et al. Treatments for Crohn's Disease-Associated Bowel Damage: A Systematic Review. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2019;17(5):847-856. doi:10.1016/j.cgh.2018.06.043
112. Weiskirchen R, Weiskirchen S, Tacke F. Organ and tissue fibrosis: Molecular signals, cellular mechanisms and translational implications. *Mol Aspects Med*. 2019;65:2-15. doi:10.1016/j.mam.2018.06.003
113. Lawrance IC, Rogler G, Bamias G, et al. Cellular and Molecular Mediators of Intestinal Fibrosis. *J Crohns Colitis*. 2017;11(12):1491-1503. doi:10.1016/j.crohns.2014.09.008.

114. Pohlers D, Brenmoehl J, Löffler I, et al. TGF-beta and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1792(8):746-756. doi: 10.1016/j.bbadis.2009.06.004.
115. Esmaeilzadeh A, Mohammadi V, Elahi R. Transforming growth factor β (TGF- β) pathway in the immunopathogenesis of multiple sclerosis (MS); molecular approaches. *Mol Biol Rep*. 2023;50(7):6121-6131. doi: 10.1007/s11033-023-08419-z.
116. Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J*. 2004;18(7):816-827. doi: 10.1096/fj.03-1273rev.
117. Weiss A, Attisano L. The TGFbeta superfamily signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2013;2(1):47-63. doi: 10.1002/wdev.86.
118. Díez M, Musri MM, Ferrer E, et al. Endothelial progenitor cells undergo an endothelial-to-mesenchymal transition-like process mediated by TGFbetaRI. *Cardiovasc Res*. 2010;88(3):502-511. doi:10.1093/cvr/cvq236
119. Doerr M, Morrison J, Bergeron L, et al. Differential effect of hypoxia on early endothelial-mesenchymal transition response to transforming growth beta isoforms 1 and 2. *Microvasc Res*. 2016;108:48-63. doi: 10.1016/j.mvr.2016.08.001
120. Xie F, Zhang Z, van Dam H, et al. Regulation of TGF- β Superfamily Signaling by SMAD Mono-Ubiquitination. *Cells*. 2014;3(4):981-993. doi: 10.3390/cells3040981
121. Walton KL, Johnson KE, Harrison CA. Targeting TGF- β Mediated SMAD Signaling for the Prevention of Fibrosis. *Front Pharmacol*. 2017;8:461. doi: 10.3389/fphar.2017.00461
122. Monteleone G, Kumberova A, Croft NM, et al. Blocking Smad7 restores TGF-beta1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. *J Clin Invest*. 2001;108(4):601-609. doi:10.1172/JCI12821
123. Batlle R, Andrés E, Gonzalez L, et al. Regulation of tumor angiogenesis and mesenchymal-endothelial transition by p38 α through TGF- β and JNK

- signaling. *Nat Commun.* 2019;10(1):3071. doi: 10.1038/s41467-019-10946-y.
124. Peng Q, Shan D, Cui K, et al. The Role of Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Cardiovascular Disease. *Cells.* 2022;11(11):1834. doi: 10.3390/cells11111834
 125. Egan LJ, de Lecea A, Lehrman ED, et al. Nuclear factor-kappa B activation promotes restitution of wounded intestinal epithelial monolayers. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003;285(5):C1028-C1035. doi: 10.1152/ajpcell.00167.2003
 126. di Mola FF, Friess H, Scheuren A, et al. Transforming growth factor-betas and their signaling receptors are coexpressed in Crohn's disease. *Ann Surg.* 1999;229(1):67-75. doi: 10.1097/00000658-199901000-00009.
 127. Zhao M, Wang L, Wang M, et al. Targeting fibrosis, mechanisms and clinical trials. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;7(1):206. doi: 10.1038/s41392-022-01070-3.
 128. Van Deventer SJ. Tumour necrosis factor and Crohn's disease. *Gut.* 1997;40(4):443-448. doi: 10.1136/gut.40.4.443
 129. Louis E. The immuno-inflammatory reaction in Crohn's disease and ulcerative colitis: characterisation, genetics and clinical application. Focus on TNF alpha. *Acta Gastroenterol Belg.* 2001;64(1):1-5.
 130. Sandborn WJ, Hanauer SB. Antitumor necrosis factor therapy for inflammatory bowel disease: a review of agents, pharmacology, clinical results, and safety. *Inflamm Bowel Dis.* 1999;5(2):119-133. doi: 10.1097/00054725-199905000-00008
 131. Marcos-Ramiro B, García-Weber D, Millán J. TNF-induced endothelial barrier disruption: beyond actin and Rho. *Thromb Haemost.* 2014;112(6):1088-1102. doi:10.1160/TH14-04-0299
 132. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(9):745-756. doi:10.1038/nri1184

133. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol.* 2008;214(2):149-160. doi:10.1002/path.2287
134. Kalliolias GD, Ivashkiv LB. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol.* 2016;12(1):49-62. doi: 10.1038/nrrheum.2015.169
135. Hayden MS, Ghosh S. Regulation of NF- κ B by TNF family cytokines. *Semin Immunol.* 2014;26(3):253-266. doi:10.1016/j.smim.2014.05.004
136. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:225-260. doi: 10.1146/annurev.immunol.16.1.225
137. van Buul JD, Hordijk PL. Signaling in leukocyte transendothelial migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(5):824-833.
138. Dimasi D, Sun WY, Bonder CS. Neutrophil interactions with the vascular endothelium. *Int Immunopharmacol.* 2013;17(4):1167-1175. doi: 10.1016/j.intimp.2013.05.034
139. Zundler S, Becker E, Schulze LL, et al. Immune cell trafficking and retention in inflammatory bowel disease: Mechanistic insights and therapeutic advances. *Gut.* 2019;68(9):1688-1700. doi: 10.1136/gutjnl-2018-317977.
140. Mitroulis I, Alexaki VI, Kourtzelis I, et al. Leukocyte integrins: role in leukocyte recruitment and as therapeutic targets in inflammatory disease. *Pharmacol Ther.* 2015;147:123-135. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.11.008
141. Berton G, Yan SR, Fumagalli L, et al. Neutrophil activation by adhesion: mechanisms and pathophysiological implications. *Int J Clin Lab Res.* 1996;26(3):160-177. doi:10.1007/BF02592978
142. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, et al. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(9):678-689. doi:10.1038/nri2156
143. Cronstein BN, Weissmann G. The adhesion molecules of inflammation. *Arthritis Rheum.* 1993;36(2):147-157. doi:10.1002/art.1780360204

144. Latella G, Di Gregorio J, Flati V, et al. Mechanisms of initiation and progression of intestinal fibrosis in IBD. *Scand J Gastroenterol.* 2015;50(1):53-65. doi:10.3109/00365521.2014.968863
145. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(3):178-196. doi: 10.1038/nrm3758
146. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009;119(6):1420-1428. doi:10.1172/JCI39104
147. Scharl M, Weber A, Fürst A, et al. Potential role for SNAIL family transcription factors in the etiology of Crohn's disease-associated fistulae. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17(9):1907-1916. doi:10.1002/ibd.21555
148. Yang J, Antin P, Berx G, et al. Guidelines and definitions for research on epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020;21(6):341-352. doi:10.1038/s41580-020-0237-9
149. Rieder F, Kessler SP, West GA, et al. Inflammation-induced endothelial-to-mesenchymal transition: a novel mechanism of intestinal fibrosis. *Am J Pathol.* 2011;179(5):2660-2673. doi:10.1016/j.ajpath.2011.07.042
150. Eisenberg LM, Markwald RR. Molecular regulation of atrioventricular valvuloseptal morphogenesis. *Circ Res.* 1995;77(1):1-6. doi: 10.1161/01.res.77.1.1
151. Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med.* 2007;13(8):952-961. doi: 10.1038/nm1613
152. Zeisberg M, Kalluri R. Fibroblasts emerge via epithelial-mesenchymal transition in chronic kidney fibrosis. *Front Biosci.* 2008;13:6991-6998. doi: 10.2741/3204
153. Zeisberg EM, Potenta S, Xie L, et al. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res.* 2007;67(21):10123-10128. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-3127

154. Piera-Velazquez S, Jimenez SA. Endothelial to Mesenchymal Transition: Role in Physiology and in the Pathogenesis of Human Diseases. *Physiol Rev.* 2019;99(2):1281-1324. doi:10.1152/physrev.00021.2018
155. Piera-Velazquez S, Mendoza FA, Jimenez SA. Endothelial to Mesenchymal Transition (EndoMT) in the Pathogenesis of Human Fibrotic Diseases. *J Clin Med.* 2016;5(4):45. doi:10.3390/jcm5040045
156. Saito A. EMT and EndMT: regulated in similar ways?. *J Biochem.* 2013;153(6):493-495. doi:10.1093/jb/mvt032
157. Medici D, Potenta S, Kalluri R. Transforming growth factor- β 2 promotes Snail-mediated endothelial-mesenchymal transition through convergence of Smad-dependent and Smad-independent signalling. *Biochem J.* 2011;437(3):515-520. doi:10.1042/BJ20101500
158. Piera-Velazquez S, Jimenez SA. Molecular mechanisms of endothelial to mesenchymal cell transition (EndoMT) in experimentally induced fibrotic diseases. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2012;5(Suppl 1):S7. doi:10.1186/1755-1536-5-S1-S7
159. Lu X, Gong J, Dennerly PA, Yao H. Endothelial-to-mesenchymal transition: Pathogenesis and therapeutic targets for chronic pulmonary and vascular diseases. *Biochem Pharmacol.* 2019;168:100-107. doi: 10.1016/j.bcp.2019.06.021
160. Hu B, Phan SH. Notch in fibrosis and as a target of anti-fibrotic therapy. *Pharmacol Res.* 2016;108:57-64. doi:10.1016/j.phrs.2016.04.010
161. Zhou B, Lin W, Long Y, et al. Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;7(1):95. doi: 10.1038/s41392-022-00934-y
162. Pu Z, Yang F, Wang L, et al. Advancements of compounds targeting Wnt and Notch signalling pathways in the treatment of inflammatory bowel disease and colon cancer. *J Drug Target.* 2021;29(5):507-519. doi: 10.1080/1061186X.2020.1864741

163. Del Gaudio F, Liu D, Lendahl U. Notch signalling in healthy and diseased vasculature. *Open Biol.* 2022;12(4):220004. doi:10.1098/rsob.220004
164. Beumer J, Clevers H. Cell fate specification and differentiation in the adult mammalian intestine. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2021;22(1):39-53. doi: 10.1038/s41580-020-0278-0
165. Christopoulos PF, Gjølborg TT, Krüger S, et al. Targeting the Notch Signaling Pathway in Chronic Inflammatory Diseases. *Front Immunol.* 2021;12:668207. doi: 10.3389/fimmu.2021.668207
166. Zhu C, Tabas I, Schwabe RF, et al. Maladaptive regeneration - the reawakening of developmental pathways in NASH and fibrosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2021;18(2):131-142. doi:10.1038/s41575-020-00365-6
167. Zhang X, Xu Z, Chen Q, et al. Notch signaling regulates pulmonary fibrosis. *Front Cell Dev Biol.* 2024;12:1450038. doi: 10.3389/fcell.2024.1450038
168. Zhang Q, Wang L, Wang S, et al. Signaling pathways and targeted therapy for myocardial infarction. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;7(1):78. doi: 10.1038/s41392-022-00925-z
169. Herrera J, Henke CA, Bitterman PB. Extracellular matrix as a driver of progressive fibrosis. *J Clin Invest.* 2018;128(1):45-53. doi:10.1172/JCI93557
170. Di X, Gao X, Peng L, et al. Cellular mechanotransduction in health and diseases: from molecular mechanism to therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther.* 2023;8(1):282. doi:10.1038/s41392-023-01501-9
171. Long Y, Niu Y, Liang K, et al. Mechanical communication in fibrosis progression. *Trends Cell Biol.* 2022;32(1):70-90. doi: 10.1016/j.tcb.2021.10.002
172. Aman J, Margadant C. Integrin-Dependent Cell-Matrix Adhesion in Endothelial Health and Disease. *Circ Res.* 2023;132(3):355-378. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.122.322332

173. Pang X, He X, Qiu Z, et al. Targeting integrin pathways: mechanisms and advances in therapy. *Signal Transduct Target Ther.* 2023;8(1):1. doi: 10.1038/s41392-022-01259-6
174. Veerman D, Prakash J. Integrins: key targets in tissue fibrosis and tumor stroma. En: Gullberg D, Eble JA, eds. *Integrins in Health and Disease. Biology of Extracellular Matrix*, vol 13. Cham: Springer; 2023:99-133. https://doi.org/10.1007/978-3-031-23781-2_3
175. Farndale R, Sonnenberg A, DiPersio CM, et al. What does it take to be a collagen receptor?. *Matrix Biol.* 2023;115:128-132. doi: 10.1016/j.matbio.2022.12.004
176. Heino J, Siljamäki E. Integrins $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$: the generalist collagen receptors. En: Gullberg D, Eble JA, eds. *Integrins in Health and Disease. Biology of Extracellular Matrix*, vol 13. Cham: Springer; 2023:3-25. https://doi.org/10.1007/978-3-031-23781-2_1
177. Zeltz C, Kusche-Gullberg M, Heljasvaara R, et al. Novel roles for cooperating collagen receptor families in fibrotic niches. *Curr Opin Cell Biol.* 2023;85:102273. doi:10.1016/j.ceb.2023.102273
178. Gallorini M, Carradori S. Understanding collagen interactions and their targeted regulation by novel drugs. *Expert Opin Drug Discov.* 2021;16(11):1239-1260. doi: 10.1080/17460441.2021.1933426
179. Zeltz C, Gullberg D. $\alpha 11\beta 1$: a mesenchymal collagen-binding integrin with a central role in tissue and tumor fibrosis. En: Gullberg D, Eble JA, eds. *Integrins in Health and Disease. Biology of Extracellular Matrix*, vol 13. Cham: Springer; 2023:235-254 https://doi.org/10.1007/978-3-031-23781-2_7
180. Zeltz C, Lu N, Gullberg D. Integrin $\alpha 11\beta 1$: a major collagen receptor on fibroblastic cells. *Adv Exp Med Biol.* 2014;819:73-83. doi:10.1007/978-94-017-9153-3_5

181. Bourgot I, Primac I, Louis T, et al. Reciprocal Interplay Between Fibrillar Collagens and Collagen-Binding Integrins: Implications in Cancer Progression and Metastasis. *Front Oncol.* 2020;10:1488. doi:10.3389/fonc.2020.01488
182. Zeltz C, Gullberg D. The integrin-collagen connection--a glue for tissue repair? *J Cell Sci.* 2016;129(4):653-664. doi:10.1242/jcs.180992
183. Coelho NM, McCulloch CA. Contribution of collagen adhesion receptors to tissue fibrosis. *Cell Tissue Res.* 2016;365(3):521-538. doi:10.1007/s00441-016-2440-8
184. Gallorini M, Carradori S. Understanding collagen interactions and their targeted regulation by novel drugs. *Expert Opin Drug Discov.* 2021;16(11):1239-1260. doi: 10.1080/17460441.2021.1933426
185. Auguste P, Leitinger B, Liard C, et al. Meeting report - first discoidin domain receptors meeting. *J Cell Sci.* 2020;133(4):jcs243824. doi: 10.1242/jcs.243824
186. Franco C, Britto K, Wong E, et al. Discoidin domain receptor 1 on bone marrow-derived cells promotes macrophage accumulation during atherogenesis. *Circ Res.* 2009;105(11):1141-1148. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.207357
187. Stevenson M, Varghese R, Hebron ML, et al. Inhibition of discoidin domain receptor (DDR)-1 with nilotinib alters CSF miRNAs and is associated with reduced inflammation and vascular fibrosis in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation.* 2023;20(1):116. doi:10.1186/s12974-023-02802-0
188. Flamant M, Placier S, Rodenas A, et al. Discoidin domain receptor 1 null mice are protected against hypertension-induced renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(12):3374-3381. doi: 10.1681/ASN.2006060677
189. Avivi-Green C, Singal M, Vogel WF. Discoidin domain receptor 1-deficient mice are resistant to bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;174(4):420-427. doi: 10.1164/rccm.200603-333OC

190. Mills E, O'Neill LA. Succinate: a metabolic signal in inflammation. *Trends Cell Biol.* 2014;24(5):313-320. doi:10.1016/j.tcb.2013.11.008
191. de Castro Fonseca M, Aguiar CJ, da Rocha Franco JA, et al. GPR91: expanding the frontiers of Krebs cycle intermediates. *Cell Commun Signal.* 2016;14:3. doi:10.1186/s12964-016-0126-1
192. Ariza AC, Deen PM, Robben JH. The succinate receptor as a novel therapeutic target for oxidative and metabolic stress-related conditions. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2012;3:22. doi: 10.3389/fendo.2012.00022
193. Van den Bossche J, O'Neill LA, Menon D. Macrophage Immunometabolism: Where Are We (Going)? *Trends Immunol.* 2017;38(6):395-406. doi: 10.1016/j.it.2017.03.001
194. Connors J, Dawe N, Van Limbergen J. The Role of Succinate in the Regulation of Intestinal Inflammation. *Nutrients.* 2018;11(1):25. doi: 10.3390/nu11010025
195. Dawiskiba T, Deja S, Mulak A, et al. Serum and urine metabolomic fingerprinting in diagnostics of inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol.* 2014;20(1):163-174. doi:10.3748/wjg.v20.i1.163
196. Zhao T, Mu X, You Q. Succinate: An initiator in tumorigenesis and progression. *Oncotarget.* 2017;8(32):53819-53828. doi: 10.18632/oncotarget.17734
197. Toma I, Kang JJ, Sipos A, et al. Succinate receptor GPR91 provides a direct link between high glucose levels and renin release in murine and rabbit kidney. *J Clin Invest.* 2008;118(7):2526-2534. doi:10.1172/JCI33293
198. He W, Miao FJ, Lin DC, et al. Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors. *Nature.* 2004;429(6988):188-193. doi: 10.1038/nature02488
199. Cho EH. Succinate as a Regulator of Hepatic Stellate Cells in Liver Fibrosis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:455. doi: 10.3389/fendo.2018.00455

200. Macaulay IC, Tijssen MR, Thijssen-Timmer DC, et al. Comparative gene expression profiling of in vitro differentiated megakaryocytes and erythroblasts identifies novel activatory and inhibitory platelet membrane proteins. *Blood*. 2007;109(8):3260-3269. doi:10.1182/blood-2006-07-036269
201. McCreath KJ, Espada S, Gálvez BG, et al. Targeted disruption of the SUCNR1 metabolic receptor leads to dichotomous effects on obesity. *Diabetes*. 2015;64(4):1154-1167. doi: 10.2337/db14-0346
202. Kuo CC, Wu JY, Wu KK. Cancer-derived extracellular succinate: a driver of cancer metastasis. *J Biomed Sci*. 2022;29(1):93. doi:10.1186/s12929-022-00878-z
203. Arnold PK, Finley LWS. Regulation and function of the mammalian tricarboxylic acid cycle. *J Biol Chem*. 2023;299(2):102838. doi: 10.1016/j.jbc.2022.102838
204. Gilissen J, Jouret F, Pirotte B, Hanson J. Insight into SUCNR1 (GPR91) structure and function. *Pharmacol Ther*. 2016;159:56-65. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.01.008
205. Geubelle P, Gilissen J, Dilly S, et al. Identification and pharmacological characterization of succinate receptor agonists. *Br J Pharmacol*. 2017;174(9):796-808. doi:10.1111/bph.13738
206. Li X, Xie L, Qu X, et al. GPR91, a critical signaling mechanism in modulating pathophysiologic processes in chronic illnesses. *FASEB J*. 2020;34(10):13091-13105. doi:10.1096/fj.202001037R
207. Huang H, Li G, He Y, et al. Cellular succinate metabolism and signaling in inflammation: implications for therapeutic intervention. *Front Immunol*. 2024;15:1404441. doi: 10.3389/fimmu.2024.1404441
208. Mills EL, O'Neill LA. Reprogramming mitochondrial metabolism in macrophages as an anti-inflammatory signal. *Eur J Immunol*. 2016;46(1):13-21. doi:10.1002/eji.201445427

209. Tannahill GM, Curtis AM, Adamik J, et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature*. 2013;496(7444):238-242. doi:10.1038/nature11986
210. Littlewood-Evans A, Sarret S, Apfel V, et al. GPR91 senses extracellular succinate released from inflammatory macrophages and exacerbates rheumatoid arthritis. *J Exp Med*. 2016;213(9):1655-1662. doi:10.1084/jem.20160061
211. Trauelsen M, Rexen Ulven E, Hjorth SA, et al. Receptor structure-based discovery of non-metabolite agonists for the succinate receptor GPR91. *Mol Metab*. 2017;6(12):1585-1596. doi:10.1016/j.molmet.2017.09.005
212. Li YH, Woo SH, Choi DH, et al. Succinate causes α -SMA production through GPR91 activation in hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;463(4):853-858. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.06.023
213. Saraiva AL, Veras FP, Peres RS, et al. Succinate receptor deficiency attenuates arthritis by reducing dendritic cell traffic and expansion of Th17 cells in the lymph nodes. *FASEB J*. 2018;32(12):6626-6435. doi: 10.1096/fj.201800285
214. Kim S, Hwang J, Xuan J, et al. Global metabolite profiling of synovial fluid for the specific diagnosis of rheumatoid arthritis from other inflammatory arthritis. *PLoS One*. 2014;9(6):e97501. doi:10.1371/journal.pone.0097501
215. Rubić-Schneider T, Carballido-Perrig N, Regairaz C, et al. GPR91 deficiency exacerbates allergic contact dermatitis while reducing arthritic disease in mice. *Allergy*. 2017;72(3):444-452. doi:10.1111/all.13005
216. Keiran N, Ceperuelo-Mallafré V, Calvo E, et al. SUCNR1 controls an anti-inflammatory program in macrophages to regulate the metabolic response to obesity. *Nat Immunol*. 2019;20(5):581-592. doi:10.1038/s41590-019-0372-7

217. Ariake K, Ohkusa T, Sakurazawa T, et al. Roles of mucosal bacteria and succinic acid in colitis caused by dextran sulfate sodium in mice. *J Med Dent Sci.* 2000;47(4):233-241.
218. Macias-Ceja DC, Ortiz-Masiá D, Salvador P, et al. Succinate receptor mediates intestinal inflammation and fibrosis. *Mucosal Immunol.* 2019;12(1):178-187. doi:10.1038/s41385-018-0087-3
219. Ortiz-Masiá D, Gisbert-Ferrándiz L, Bauset C, et al. Succinate Activates EMT in Intestinal Epithelial Cells through SUCNR1: A Novel Protagonist in Fistula Development. *Cells.* 2020;9(5):1104. doi:10.3390/cells9051104
220. De Pablo C, Orden S, Apostolova N, et al. Abacavir and didanosine induce the interaction between human leukocytes and endothelial cells through Mac-1 upregulation. *AIDS.* 2010;24(9):1259-1266. doi: 10.1097/QAD.0b013e32833a2b02
221. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, et al. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest.* 1973;52(11):2745-2756. doi: 10.1172/JCI107470
222. Ibiza S, Alvarez A, Romero W, et al. Gastrin induces the interaction between human mononuclear leukocytes and endothelial cells through the endothelial expression of P-selectin and VCAM-1. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009;297(6):C1588-C1595. doi: 10.1152/ajpcell.00082.2009
223. Orden S. Estudio comparativo del efecto de diferentes fármacos antirretrovirales sobre la interacción leucocito-endotelio. Tesis doctoral. Universitat de València; 2016. <http://hdl.handle.net/10550/54696>
224. Haffke M, Fehlmann D, Rummel G, et al. Structural basis of species-selective antagonist binding to the succinate receptor. *Nature.* 2019;574(7779):581-585. doi:10.1038/s41586-019-1663-8

225. Rogler G, Hausmann M. Factors Promoting Development of Fibrosis in Crohn's Disease. *Front Med (Lausanne)*. 2017;4:96. doi: 10.3389/fmed.2017.00096
226. De Pablo C, Orden S, Peris JE, et al. Profile of leukocyte-endothelial cell interactions induced in venules and arterioles by nucleoside reverse-transcriptase inhibitors in vivo. *J Infect Dis*. 2013;208(9):1448-1453. doi: 10.1093/infdis/jit340
227. Collado-Díaz V. Estudio de la implicación del receptor P2X7 en los efectos proinflamatorios de Abacavir. Tesis doctoral. Universitat de València; 2018. <http://hdl.handle.net/10550/66938>
228. Hickey MJ, Granger DN, Kubes P. Molecular mechanisms underlying IL-4-induced leukocyte recruitment in vivo: a critical role for the alpha 4 integrin. *J Immunol*. 1999;163(6):3441-3448.
229. Alvarez A, Piqueras L, Bello R, et al. Angiotensin II is involved in nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase inhibition-induced leukocyte-endothelial cell interactions in vivo. *Br J Pharmacol*. 2001;132(3):677-684. doi: 10.1038/sj.bjp.0703867
230. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*. 1981;29(4):577-580. doi:10.1177/29.4.6166661
231. Cai YH, Alvarez A, Alcaide P, et al. Abrogation of functional selectin-ligand expression reduces migration of pathogenic CD8+ T cells into heart. *J Immunol*. 2006;176(11):6568-6575. doi:10.4049/jimmunol.176.11.6568
232. Alvarez A, Cerdá-Nicolás M, Naim Abu Nabah Y, et al. Direct evidence of leukocyte adhesion in arterioles by angiotensin II. *Blood*. 2004;104(2):402-408. doi:10.1182/blood-2003-08-2974
233. Carpentier G, Berndt S, Ferratge S, et al. Angiogenesis Analyzer for ImageJ - A comparative morphometric analysis of "Endothelial Tube Formation

- Assay" and "Fibrin Bead Assay". *Sci Rep.* 2020;10(1):11568. doi: 10.1038/s41598-020-67289-8
234. Krist B, Florczyk U, Pietraszek-Gremplewicz K, et al. The Role of miR-378a in Metabolism, Angiogenesis, and Muscle Biology. *Int J Endocrinol.* 2015;2015:281756. doi: 10.1155/2015/281756
 235. Nagalingam RS, Sundaresan NR, Noor M, et al. Deficiency of cardiomyocyte-specific microRNA-378 contributes to the development of cardiac fibrosis involving a transforming growth factor β (TGF β 1)-dependent paracrine mechanism. *J Biol Chem.* 2017;292(12):5124. doi:10.1074/jbc.A114.580977
 236. Noah TK, Shroyer NF. Notch in the intestine: regulation of homeostasis and pathogenesis. *Annu Rev Physiol.* 2013;75:263-288. doi:10.1146/annurev-physiol-030212-183741
 237. Ortiz-Masiá D, Cosín-Roger J, Calatayud S, et al. M1 Macrophages Activate Notch Signalling in Epithelial Cells: Relevance in Crohn's Disease. *J Crohns Colitis.* 2016;10(5):582-592. doi:10.1093/ecco-jcc/jjw009
 238. Atanga R, Romero AS, Hernandez AJ, et al. Inflammatory macrophages prevent colonic goblet and enteroendocrine cell differentiation through Notch signaling. *bioRxiv.* 2023;2023.06.29.547119. doi: 10.1101/2023.06.29.547119
 239. Ghatak S, Niland S, Schulz JN, et al. Role of Integrins α 1 β 1 and α 2 β 1 in Wound and Tumor Angiogenesis in Mice. *Am J Pathol.* 2016;186(11):3011-3027. doi:10.1016/j.ajpath.2016.06.021
 240. Hatoum OA, Binion DG, Gutterman DD. Paradox of simultaneous intestinal ischaemia and hyperaemia in inflammatory bowel disease. *Eur J Clin Invest.* 2005;35(10):599-609. doi:10.1111/j.1365-2362.2005.01567.x
 241. Hatoum OA, Heidemann J, Binion DG. The intestinal microvasculature as a therapeutic target in inflammatory bowel disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1072:78-97. doi: 10.1196/annals.1326.003

242. Chidlow JH Jr, Shukla D, Grisham MB, et al. Pathogenic angiogenesis in IBD and experimental colitis: new ideas and therapeutic avenues. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;293(1):G5-G18. doi: 10.1152/ajpgi.00107.2007
243. Danese S. Inflammation and the mucosal microcirculation in inflammatory bowel disease: the ebb and flow. *Curr Opin Gastroenterol.* 2007;23(4):384-389. doi: 10.1097/MOG.0b013e32810c8de3
244. Pousa ID, Maté J, Gisbert JP. Angiogenesis in inflammatory bowel disease. *Eur J Clin Invest.* 2008;38(2):73-81. doi:10.1111/j.1365-2362.2007.01914.x
245. Zhou HY, Sui H, Zhao YJ, et al. The Impact of Inflammatory Immune Reactions of the Vascular Niche on Organ Fibrosis. *Front Pharmacol.* 2021;12:750509. doi:10.3389/fphar.2021.750509
246. Weder B, Schefer F, van Haaften WT, et al. New Therapeutic Approach for Intestinal Fibrosis Through Inhibition of pH-Sensing Receptor GPR4. *Inflamm Bowel Dis.* 2022;28(1):109-125. doi:10.1093/ibd/izab140
247. Tolomeo AM, Castagliuolo I, Piccoli M, et al. Extracellular Vesicles Secreted by Mesenchymal Stromal Cells Exert Opposite Effects to Their Cells of Origin in Murine Sodium Dextran Sulfate-Induced Colitis. *Front Immunol.* 2021;12:627605. doi:10.3389/fimmu.2021.627605
248. Liu Y, Kudo K, Abe Y, et al. Inhibition of transforming growth factor-beta, hypoxia-inducible factor-1alpha and vascular endothelial growth factor reduced late rectal injury induced by irradiation. *J Radiat Res.* 2009;50(3):233-239. doi:10.1269/jrr.08112
249. Duan JL, Ruan B, Yan XC, et al. Endothelial Notch activation reshapes the angiocrine of sinusoidal endothelia to aggravate liver fibrosis and blunt regeneration in mice. *Hepatology.* 2018;68(2):677-690. doi:10.1002/hep.29834

250. Singh V, Sen A, Saini S, et al. MicroRNA Significance in Cancer: An Updated Review on Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Perspectives. *EJIFCC*. 2024;35(4):265-284.
251. Kapplingattu SV, Bhattacharya S, Adlakha YK. MiRNAs as major players in brain health and disease: current knowledge and future perspectives. *Cell Death Discov*. 2025;11(1):7. doi:10.1038/s41420-024-02283-x
252. Taha SR, Karimi M, Mahdavi B, et al. Crosstalk between non-coding RNAs and programmed cell death in colorectal cancer: implications for targeted therapy. *Epigenetics Chromatin*. 2025;18(1):3. doi: 10.1186/s13072-024-00560-8
253. Wang J, Tao X, Liu Z, et al. Noncoding RNAs in sepsis-associated acute liver injury: Roles, mechanisms, and therapeutic applications. *Pharmacol Res*. 2025;212:107596. doi: 10.1016/j.phrs.2025.107596
254. Fasseu M, Tréton X, Guichard C, et al. Identification of restricted subsets of mature microRNA abnormally expressed in inactive colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *PLoS One*. 2010;5(10):e13160. doi:10.1371/journal.pone.0013160
255. Chen LT, Xu SD, Xu H, et al. MicroRNA-378 is associated with non-small cell lung cancer brain metastasis by promoting cell migration, invasion and tumor angiogenesis. *Med Oncol*. 2012;29(3):1673-1680. doi: 10.1007/s12032-011-0083-x
256. Hua Z, Lv Q, Ye W, et al. MiRNA-directed regulation of VEGF and other angiogenic factors under hypoxia. *PLoS One*. 2006;1(1):e116. doi: 10.1371/journal.pone.0000116
257. Megiorni F, Cialfi S, McDowell HP, et al. Deep Sequencing the microRNA profile in rhabdomyosarcoma reveals down-regulation of miR-378 family members. *BMC Cancer*. 2014;14:880. doi:10.1186/1471-2407-14-880

258. Ikeda K, Horie-Inoue K, Ueno T, et al. miR-378a-3p modulates tamoxifen sensitivity in breast cancer MCF-7 cells through targeting GOLT1A. *Sci Rep.* 2015;5:13170. doi:10.1038/srep13170
259. Dubois-Camacho K, Diaz-Jimenez D, De la Fuente M, et al. Inhibition of miR-378a-3p by Inflammation Enhances IL-33 Levels: A Novel Mechanism of Alarmin Modulation in Ulcerative Colitis. *Front Immunol.* 2019;10:2449. doi: 10.3389/fimmu.2019.02449
260. Chen W, Zhao W, Yang A, et al. Integrated analysis of microRNA and gene expression profiles reveals a functional regulatory module associated with liver fibrosis. *Gene.* 2017;636:87-95. doi:10.1016/j.gene.2017.09.027
261. Krzak G, Willis CM, Smith JA, et al. Succinate Receptor 1: An Emerging Regulator of Myeloid Cell Function in Inflammation. *Trends Immunol.* 2021;42(1):45-58. doi:10.1016/j.it.2020.11.004
262. Geng Y, Hansson GK, Holme E. Interferon-gamma and tumor necrosis factor synergize to induce nitric oxide production and inhibit mitochondrial respiration in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1992;71(5):1268-1276. doi:10.1161/01.res.71.5.1268
263. Schulze-Osthoff K, Bakker AC, Vanhaesebroeck B, et al. Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. *J Biol Chem.* 1992;267(8):5317-5323.
264. Jia L, Kelsey SM, Grahn MF, et al. Increased activity and sensitivity of mitochondrial respiratory enzymes to tumor necrosis factor alpha-mediated inhibition is associated with increased cytotoxicity in drug-resistant leukemic cell lines. *Blood.* 1996;87(6):2401-2410.
265. Zell R, Geck P, Werdan K, et al. TNF-alpha and IL-1 alpha inhibit both pyruvate dehydrogenase activity and mitochondrial function in cardiomyocytes: evidence for primary impairment of mitochondrial

- function. *Mol Cell Biochem.* 1997;177(1-2):61-67. doi: 10.1023/a:1006896832582
266. Roca FJ, Whitworth LJ, Prag HA, et al. Tumor necrosis factor induces pathogenic mitochondrial ROS in tuberculosis through reverse electron transport. *Science.* 2022;376(6600):eabh2841. doi: 10.1126/science.abh2841
 267. Pigott R, Dillon LP, Hemingway IH, et al. Soluble forms of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 are present in the supernatants of cytokine activated cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;187(2):584-589. doi:10.1016/0006-291x(92)91234-h
 268. von Asmuth EJ, Smeets EF, Ginsel LA, et al. Evidence for endocytosis of E-selectin in human endothelial cells. *Eur J Immunol.* 1992;22(10):2519-2526. doi:10.1002/eji.1830221009
 269. Kuijpers TW, Raleigh M, Kavanagh T, et al. Cytokine-activated endothelial cells internalize E-selectin into a lysosomal compartment of vesiculotubular shape. A tubulin-driven process. *J Immunol.* 1994;152(10):5060-5069.
 270. Nakada MT, Tam SH, Woulfe DS, et al. Neutralization of TNF by the antibody cA2 reveals differential regulation of adhesion molecule expression on TNF-activated endothelial cells. *Cell Adhes Commun.* 1998;5(6):491-503. doi:10.3109/15419069809005606
 271. Setiadi H, McEver RP. Clustering endothelial E-selectin in clathrin-coated pits and lipid rafts enhances leukocyte adhesion under flow. *Blood.* 2008;111(4):1989-1998. doi:10.1182/blood-2007-09-113423
 272. Abdullah S, Ghio M, Cotton-Betteridge A, et al. Succinate metabolism and membrane reorganization drives the endotheliopathy and coagulopathy of traumatic hemorrhage. *Sci Adv.* 2023;9(24):eadf6600. doi: 10.1126/sciadv.adf6600



PRODUCCIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. **Coll S**, Ortiz-Masiá D, Seco-Cervera M, Macias-Ceja DC, Cosín-Roger J, Bauset C, Heras-Moran B, Navarro-Vicente F, Barrachina MD, Calatayud S. Notch3 and integrin- α 11 are overexpressed in complicated Crohn's disease patients: role in vascular function. *Artículo en preparación*.
2. **Coll S**, Bauset C, Macias-Ceja DC, Crespo A, Ortiz-Masiá D, Cosín-Roger J, Barrachina MD, Calatayud S. SUCNR1 mediates leukocyte-endothelial cell interactions induced by TNF α . *Artículo en revisión (European Journal of Pharmacology)*.
3. Seco-Cervera M, Ortiz-Masiá D, Macias-Ceja DC, **Coll S**, Gisbert-Ferrándiz L, Cosín-Roger J, Bauset C, Ortega M, Heras-Moran B, Navarro-Vicente F, Millan M, Esplugues JV, Calatayud S, Barrachina MD. Resistance to apoptosis in complicated Crohn's disease: Relevance in ileal fibrosis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2024;1870(2):166966. doi:10.1016/j.bbadis.2023.166966
4. Macias-Ceja DC, **Coll S**, Bauset C, Seco-Cervera M, Gisbert-Ferrándiz L, Navarro F, Cosin-Roger J, Calatayud S, Barrachina MD, Ortiz-Masia D. IFN γ -Treated Macrophages Induce EMT through the WNT Pathway: Relevance in Crohn's Disease. *Biomedicines.* 2022;10(5):1093. doi: 10.3390/biomedicines10051093.
5. Bauset C, Lis-Lopez L, **Coll S**, Gisbert-Ferrándiz L, Macias-Ceja DC, Seco-Cervera M, Navarro F, Esplugues JV, Calatayud S, Ortiz-Masia D, Barrachina MD, Cosín-Roger J. SUCNR1 Mediates the Priming Step of the Inflammasome in Intestinal Epithelial Cells: Relevance in Ulcerative Colitis. *Biomedicines.* 2022;10(3):532. doi: 10.3390/biomedicines10030532.
6. Ortiz-Masiá D, Gisbert-Ferrándiz L, Bauset C, **Coll S**, Mamie C, Scharl M, Esplugues JV, Alós R, Navarro F, Cosín-Roger J, Barrachina MD, Calatayud S. Protagonist in Fistula Development. *Cells.* 2020;9(5):1104. doi: 10.3390/cells9051104.

7. Herrero S, Millán-Leiva A, **Coll S**, González-Martínez RM, Parenti S, González-Cabrera J. Identification of new viral variants specific to the honey bee mite *Varroa destructor*. *Exp Appl Acarol*. 2019;79(2):157-168. doi:10.1007/s10493-019-00425-w
8. Vallecillo-Hernández J, Barrachina MD, Ortiz-Masiá D, **Coll S**, Esplugues JV, Calatayud S, Hernández C. Indomethacin Disrupts Autophagic Flux by Inducing Lysosomal Dysfunction in Gastric Cancer Cells and Increases Their Sensitivity to Cytotoxic Drugs. *Sci Rep*. 2018;8(1):3593. Published 2018 Feb 26. doi:10.1038/s41598-018-21455-1