



UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI

HJ23

Hospital Universitari Joan XXIII
ICS Camp de Tarragona



IISPV
INSTITUT
D'INVESTIGACIÓ
SANITÀRIA
PERE VIRGILI



INFLAMMATORY BOWEL
DISEASE RESEARCH GROUP

DETERMINACIÓN DE NIVELES DE SUCCINATO COMO MARCADOR DE ACTIVIDAD EN LA ENFERMEDAD DE CROHN

Olga Soler López

TRABAJO FINAL DE GRADO DE BIOTECNOLOGÍA



Tutor académico: Carolina Serena Perelló, departamento de Bioquímica y Biotecnología,
e-mail: carolina.serena@urv.cat

En cooperación con: Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV) y Hospital
Universitario Joan XXIII (HJ23)

Junio 2023

Olga Soler López

Olga Soler López

Este trabajo final de grado es confidencial.

Se ha llevado a cabo en el grupo de investigación Inflammatory Bowel Disease (IBODI), perteneciente al Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), en el Hospital Universitari Joan XXIII de Tarragona (España), bajo la tutoría y supervisión de la Dra. Carolina Serena Perelló.

Para cualquier consulta sobre este TFG confidencial, diríjase al siguiente correo: carolina.serena@iispv.cat

Esta versión reducida posee el beneplácito del grupo IBODI para su disposición en el repositorio institucional de la URV.

Olga Soler López

Olga Soler López

Yo, Olga Soler López , con DNI 45319063R, soy conocedor de la guía de prevención del plagio en la URV *Prevención, detección y tratamiento del plagio en la docencia: guía para estudiantes* (aprobada en julio 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) y afirmo que este TFG no constituyen ninguna de las conductas consideradas como plagio por la URV.

Tarragona, 6 de junio de 2023

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Olga', followed by a large, stylized flourish or scribble.

Olga Soler López

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a la Dra. Carolina Serena por dejarme formar parte de su grupo de investigación y por tutorizar y supervisar este trabajo. Ha sido un placer aprender de alguien que valora y disfruta tanto la ciencia y la investigación. Espero encontrarme en mi vida laboral tan buenos profesionales como tú.

Por otro lado, gracias a todos los miembros del grupo de investigación IBODI, especialmente a Diandra y a Irene. Gracias por confiar en mí a pesar de que me tiemblen las manos, este trabajo no hubiese sido el mismo sin vuestra ayuda.

Y, por último, no sólo quisiera agradecer, sino dedicar este trabajo a mis padres y a mi hermano. Por vuestro apoyo incondicional y vuestra confianza en mí. Gracias a vosotros sé que puedo llegar a conseguir todo lo que me proponga, incluso con todos los kilómetros que nos separan.

ÍNDICE

Resumen	1
Abreviaciones	2
1. Introducción.....	3
1.1 La enfermedad de Crohn.....	3
1.2 Microbiota intestinal	4
1.3 Succinato, su relación con la microbiota intestinal y las EII	6
2. Hipótesis y objetivos	8
2.1 Hipótesis	8
2.2 Objetivos.....	8
3. Materiales y métodos.....	8
3.1 Cohorte de pacientes	8
3.2 Procesamiento de muestras de sangre.....	11
3.2.1 Determinación de los niveles de succinato circulantes en plasma sanguíneo	11
3.2.2 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)	11
3.3 Extracción RNA, cDNA y qPCR.....	12
3.3.1 Extracción y cuantificación de RNA	12
3.3.2 Obtención cDNA	13
3.3.3 qPCR.....	13
3.4 Análisis estadístico	13
3.5 Estudio bibliográfico de la microbiota.....	14
4. Resultados.....	15
4.3 Estudio bibliográfico de la microbiota.....	16
5. Discusión	18
6. Conclusión.....	19
7. Bibliografía.....	20
8. Autoevaluación.....	25
9. Anexos.....	26

Resumen

Introducción: El succinato, un metabolito producido por la microbiota intestinal y el huésped, se encuentra aumentado en diversas enfermedades con inflamación crónica. En el contexto de las enfermedades inflamatorias intestinales (EII), término que abarca la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU), existe una asociación entre los niveles elevados de este metabolito en el intestino, la actividad de la enfermedad y la disbiosis. Este estudio tiene como objetivo evaluar los niveles de succinato como biomarcador de la actividad en EC y explorar su relación con variables demográficas, clínicas, de biomarcadores, tratamiento, dieta y actividad física.

Hipótesis: Los pacientes con EC tendrán incrementado los niveles circulantes de succinato y estos niveles se relacionarán con la actividad de la enfermedad, parámetros inflamatorios, clínicos y/o demográficos .

Materiales y métodos: Se realizó un estudio observacional transversal que incluyó a pacientes con EC en remisión clínica (n = 5), EC activa (n = 10) y controles sanos (n = 8) emparejados por edad, sexo e índice de masa corporal. Los criterios de remisión para la EC incluyeron un índice de actividad Harvey-Bradshaw <6, proteína C reactiva (PCR) <0.4 mg/dl, calprotectina fecal <250 µg/g e índice de actividad endoscópica SES-EC <6. Se registraron variables demográficas y clínicas, tratamientos, cuestionario de adherencia a la dieta mediterránea, cuestionario de actividad física y muestras de sangre de las cuales se obtuvieron el plasma para estudiar niveles circulantes de succinato y se aislaron células mononucleadas de sangre periférica para estudiar por expresión génica marcadores inflamatorios, antiinflamatorios y metabólicos. Se realizó una búsqueda bibliográfica de las bacterias implicadas en la producción y consumo de succinato para relacionarlo con los hallazgos encontrados en este estudio.

Resultados: Los niveles circulantes de succinato se encuentran significativamente elevados en pacientes con EC activa y en remisión en comparación con los sujetos control. Se encontró una correlación positiva entre los niveles succinato y la expresión de su receptor, *SUCNRI*. Además, mostró correlaciones positivas con marcadores inflamatorios como la calprotectina fecal y la proteína C reactiva. La expresión de *IL10* fue mayor en pacientes con EC en remisión, mientras que el *TNFA* mostró una disminución significativa en pacientes con EC activa. También se encontraron correlaciones entre los niveles de expresión de genes y marcadores clínicos como el índice de Harvey-Bradshaw, la PCR y la calprotectina fecal.

Conclusiones: Los pacientes con EC presentan niveles más altos de succinato, y estos niveles elevados están asociados con la actividad de la EC.

Palabras clave: Enfermedad de Crohn, succinato, microbiota, expresión génica, PBMCs.

Abreviaciones

ABREVIACIÓN	NOMBRE
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
EC	Enfermedad de Crohn
CU	Colitis ulcerosa
IMC	Índice de masa corporal
SES-EC	Índice de actividad endoscópica
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Phosphate Buffered Saline
DSS	Sulfato de dextrano sódico
PCR	Proteína C reactiva
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
<i>SUCNR1</i>	Receptor de succinato 1
<i>NOD2</i>	Dominio de oligomerización de nucleótidos
<i>TLR4</i>	Toll-like receptor 4
<i>IL10</i>	Interleucina 10
<i>TNFA</i>	Factor de necrosis tumoral alpha
<i>SLC13A3</i>	Solute Carrier Family 13 Member 3
<i>MCT1</i>	Transportador de monocarboxilato 1
<i>CCL2</i>	C-C motif chemokine ligand 2
FMT	Trasplante de microbiota fecal
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta

1. Introducción

1.1 La enfermedad de Crohn

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) incluye trastornos crónicos del tracto gastrointestinal. Las patologías más conocidas de la EII son la colitis ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn (EC). La EC se caracteriza por la inflamación de todo el tracto gastrointestinal, desde la boca hasta el ano, y hoy en día no existe un tratamiento efectivo para combatir la enfermedad (Seyedian et al., 2019). Los pacientes con Crohn, padecen síntomas como diarrea, dolor abdominal, sangrado rectal, pérdida de peso y, en casos peores, fístulas y lesiones rectales. Esta situación les afecta disminuyéndoles la calidad de vida y, a largo plazo, aumentando el riesgo de hospitalización, complicaciones y cirugía (Roda et al., 2020).

Existen dos periodos fisiológicos en la EC, periodos de brote (EC activa) que se intercalan con etapas en las que los síntomas están en remisión (EC en remisión).

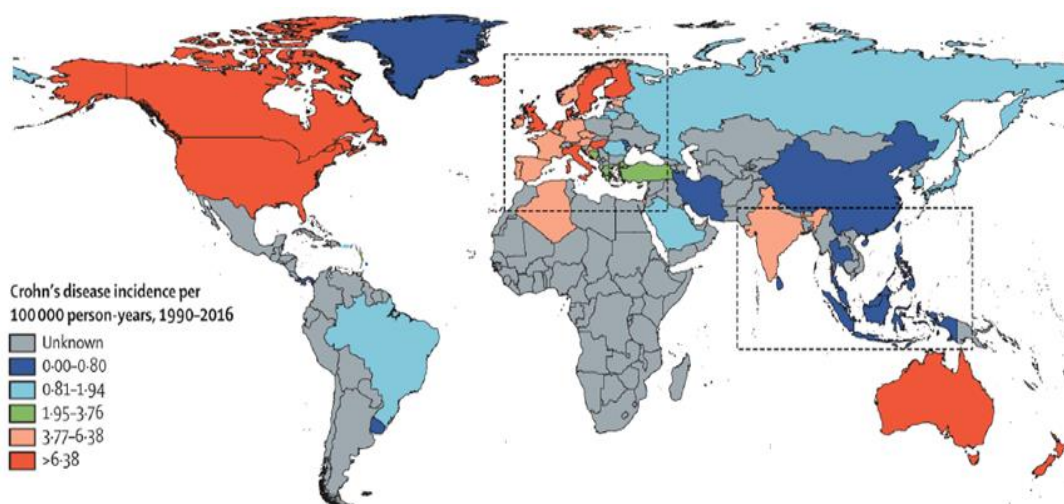


Figura 1. Incidencia de la enfermedad de Crohn mundialmente en 2017 (Ng et al., 2017)

Desde el año 2000, la EII ha aumentado en todo el mundo y ahora afecta hasta 1 de cada 200 personas en países occidentales. Se ha observado una mayor incidencia en judíos askenazíes, poblaciones urbanas y en países del norte. En cuanto a la enfermedad de Crohn, en países occidentales, la incidencia es similar entre hombres y mujeres, mientras que, en Asia, es más común en hombres. La incidencia de EC varía de 0 a 20,2 casos por cada 100.000 personas-año en Norteamérica, y en Asia, la prevalencia de EC también ha aumentado; por ejemplo, en Taiwán aumentó a 3,9 casos por cada 100.000 personas en 2015 y en Hong Kong fue de 18,6 casos por cada 100.000 personas en 2014. Hay pocos

datos sobre la epidemiología de EC en América Latina y África, pero la incidencia y prevalencia son bajas en ambas regiones (Ng et al., 2017; Roda et al., 2020). A nivel europeo, la incidencia de EC varía de 0,3 a 12,7 casos por cada 100.000 personas-año en Europa y, en España, la incidencia es de 4,6 a 18,5 por 100.000 habitantes (Barreiro-de Acosta et al., 2023) (Fig. 1).

Actualmente, a pesar de que la etiología y el desarrollo de la EC aún no se ha comprendido en su totalidad, se conoce que los factores genéticos, inmunológicos, ambientales y la microbiota intestinal suponen un riesgo para la progresión de la enfermedad (De Souza, 2017; Petagna et al., 2020) (Fig 2).

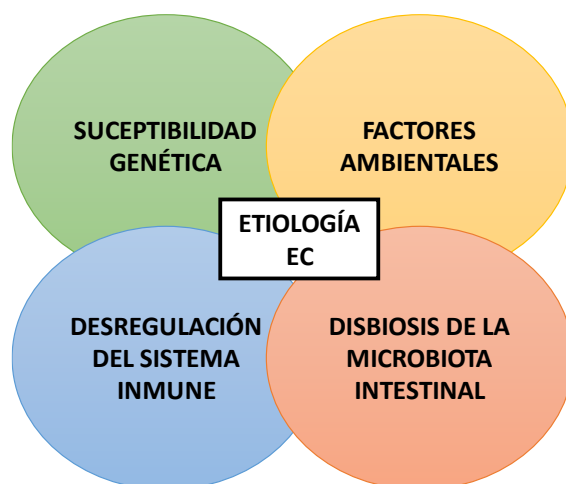


Figura 2. Principales factores desencadenantes de la enfermedad de Crohn. Estos factores son susceptibilidad genética, defectos de la inmunidad innata, factores ambientales (en particular el tabaquismo y la dieta) y alteraciones de la microbiota intestinal. Adaptación (Sadler et al., 2016; Ventham et al., 2016).

1.2 Microbiota intestinal

El microbioma intestinal está compuesto por más de 100 billones de microorganismos, incluyendo bacterias, hongos, virus y protozoos. La mayoría de las bacterias intestinales pertenecen a los filos Firmicutes (~ 20-50%), Bacteroidetes (~ 15-50%), Proteobacterias (<10%) y Actinobacterias (<5%). El número de bacterias varía en el tracto gastrointestinal, siendo el colon el que mayor cantidad y diversidad de especies tiene en comparación con el estómago y el intestino delgado. La microbiota intestinal es esencial para la homeostasis del huésped en aspectos como la nutrición, el desarrollo inmunitario, el metabolismo y la defensa contra patógenos como *Clostridium difficile* o *Escherichia*

coli (Caparrós et al., 2021; Glassner et al., 2020a; Silva et al., 2019). El estilo de vida actual afecta directamente al perfil microbiano del intestino debido a factores como el uso de medicamentos, dietas poco saludables, enfermedades, hospitalizaciones, cirugías, tabaquismo y estrés crónico, entre otros.

En pacientes con EC, las interacciones entre el huésped y la microbiota intestinal son perjudiciales causando cambios relevantes en el curso de la enfermedad. Numerosos estudios han hallado un desequilibrio en la microbiota intestinal de los pacientes con EC en comparación con los individuos control, con una pérdida general de diversidad, un agotamiento de las Firmicutes y un aumento de las Proteobacterias (Buffet-Bataillon et al., 2022; Silva et al., 2019). Además, los pacientes con EC tienden a tener una falta de bacterias beneficiosas las cuales producen sustancias antiinflamatorias como los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) (Caparrós et al., 2021; Zheng et al., 2022). Estos cambios en la microbiota intestinal también están presentes en pacientes pediátricos sin tratamiento previo y en familiares sanos de primer grado de pacientes con EC. Del mismo modo, se ha observado que la microbiota intestinal de pacientes con EC activa es más inestable en comparación con pacientes con EC en remisión o individuos sanos. Una red microbiana bien interconectada está relacionada con una remisión estable en la EC. Por otro lado, una estructura de comunidad microbiana más débil y un aumento en la abundancia de la familia *Enterobacteriaceae* están presentes en casos recurrentes de la enfermedad. (Caparrós et al., 2021).

Finalmente, un aspecto importante que aún no se ha esclarecido es si la disbiosis es una causa o una consecuencia de la inflamación en la EC. Los datos de varios modelos animales sugieren que un microbioma alterado o una respuesta inmunitaria anormal juegan un papel importante en el desarrollo de la inflamación intestinal. La colonización de ratones con microbiota intestinal de pacientes con EII agrava la colitis al alterar las respuestas inmunitarias (Glassner et al., 2020) y la transferencia de bacterias proinflamatorias de ratones enfermos a ratones sanos puede inducir inflamación (Zheng et al., 2022). En humanos, a causa de la disbiosis intestinal, se vieron incrementadas las bacterias del filo Proteobacteria en el tejido adiposo que se encuentra alrededor del intestino en los EC activos, llamado *Creeping fat* (Serena et al., 2020). Por todo ello, se piensa que la inflamación es capaz de interrumpir la estabilidad de la composición microbiana, al igual que el grado de disbiosis disminuye con la disminución de la inflamación (Caparrós et al., 2021).

1.3 Succinato, su relación con la microbiota intestinal y las EII

El succinato es un metabolito clave tanto para el organismo huésped como para su propio microbioma. En el caso del huésped, es un metabolito intermedio del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) o ciclo de Krebs, el cual es una vía esencial en la respiración celular y tiene lugar dentro de las mitocondrias. Por otro lado, para la microbiota intestinal, es un subproducto de la fermentación anaeróbica en el huésped (Connors et al., 2019; Fernández-Veledo & Vendrell, 2019; Lavelle & Sokol, 2020).

La microbiota intestinal descompone diferentes nutrientes presentes en la dieta y derivados del huésped, generando productos finales que el organismo puede absorber, como el acetato, propionato y butirato (AGCC); y aniones orgánicos, como el lactato y el succinato.

Las bacterias del filo Bacteroidetes son las principales responsables de la producción de succinato en el intestino de los mamíferos. No obstante, normalmente se encuentra en concentraciones relativamente bajas en la luz intestinal debido a que se convierte rápidamente en propionato. El succinato es utilizado como un intermediario en la producción de propionato, y esta vía es la principal forma en la que se genera este compuesto. Las bacterias del género *Bacteroides spp.* y *Prevotella spp.*, así como algunas bacterias de la clase *Negativicutes* del filo Firmicutes, están implicadas en esta vía de producción de propionato a partir de succinato. Los AGCC tienen diversos efectos en la fisiología del organismo, pero principalmente desempeñan un papel importante al proporcionar energía a las células del colon, del intestino delgado y del hígado, lo que contribuye a mantener la salud y promover diversas funciones beneficiosas para el organismo como la antiinflamación (Connors et al., 2019; Fernández-Veledo & Vendrell, 2019).

La microbiota intestinal y sus productos metabólicos interactúan con el huésped de muchas maneras diferentes para influir en la homeostasis, la susceptibilidad a patógenos y enfermedades relacionadas con la inflamación, como la EII y la obesidad (Fernández-Veledo & Vendrell, 2019). En ciertas condiciones patológicas, especialmente en áreas de inflamación y estrés metabólico, se ha observado la acumulación de succinato. Numerosos estudios respaldan la idea de que el succinato no es solo un subproducto del metabolismo, sino que desempeña un papel activo y puede tener efectos específicos tanto a nivel de tejidos individuales como a nivel sistémico, actuando como un mediador

proinflamatorio. Las alteraciones en el metabolismo y las relaciones de alimentación cruzada de la microbiota intestinal que interrumpen la fermentación normal, pueden resultar en la acumulación de succinato, como se ha observado en casos donde se dan cambios bruscos en la dieta, consumo de carbohidratos no digeribles y tratamiento con antibióticos (Connors et al., 2019).

Actualmente, en las EII, el metabolismo del succinato y su acumulación en el lumen intestinal es un tema de interés. Varios estudios metabolómicos de la mucosa y de materia fecal en este tipo de pacientes han demostrado que el succinato aumenta en zonas inflamadas en comparación con tejidos sanos. Este aumento se ha comprobado en modelos de ratón de colitis inducida por sulfato de dextrano sódico (DSS), donde se ha observado una correlación con la actividad y la gravedad de la enfermedad (Connors et al., 2019). Por otro lado, hay investigaciones que revelan que el aumento de succinato circulante a nivel sérico también está relacionado con un detrimento de la enfermedad y el desarrollo de fístulas (Ortiz-Masiá et al., 2020). Del mismo modo, se ha detectado una disminución significativa en los niveles de bacterias específicas que consumen succinato y un aumento de bacterias productoras de succinato, empeorando la inflamación. A pesar de ello, aún no se comprende completamente en qué medida la disbiosis y el daño intestinal contribuyen al aumento del succinato en el intestino (Fernández-Veledo & Vendrell, 2019). Por último, cabe destacar que, la disbiosis que generan las EII aumenta la susceptibilidad a la infección por patógenos oportunistas, los cuales compiten por los nutrientes y pueden provocar un aumento de los niveles de succinato si son patógenos productores de este (Connors et al., 2019).

2. Hipótesis y objetivos

2.1 Hipótesis

Estudiar si en pacientes con EC los niveles circulantes de succinato están elevados dependiendo del grado de actividad e investigar si la disbiosis microbiana podría jugar un papel clave en la alteración de estos niveles en los pacientes.

2.2 Objetivos

Los propósitos principales de este estudio son:

- 1) Determinar si el succinato podría ser un biomarcador para predecir la actividad en la EC y si los niveles elevados de este se correlacionan con la disbiosis de la microbiota intestinal. Para ello, se deben evaluar los niveles de succinato circulante como un biomarcador de actividad en una cohorte bien caracterizada de pacientes con EC activa y en remisión y controles (pacientes sin EII).
- 2) Realizar un estudio bibliográfico para valorar la función de la microbiota intestinal específica relacionada con la producción o el consumo del metabolito succinato en dicha cohorte. Esta parte se ha realizado bibliográficamente debido a la falta de tiempo para realizarlo de forma experimental.
- 3) Estudiar si los niveles circulantes de succinato correlacionan con la expresión génica de marcadores inflamatorios, antiinflamatorios y/o metabólicos en células mononucleadas de sangre periférica aisladas de la misma cohorte.

3. Materiales y métodos

3.1 Cohorte de pacientes

En la cohorte del estudio han participado un total de 15 pacientes con EC muy caracterizados en cuanto al estado de la enfermedad. Entre estos pacientes n=10 tienen la EC activa, mientras que n=5 están en remisión. Se considera que la EC está en remisión cuando el índice de Harvey-Bradshaw, un indicador de la actividad de la enfermedad, es menor que 6, cuando la proteína C reactiva no supera los 0.4 mg/dL en ensayo local, con una calprotectina fecal menor de 250µg/g y con un índice de actividad endoscópica (SES-

EC) menor a 6, o menor a 4 si se limita al íleon terminal. En el caso de no cumplirse estos parámetros, la EC se considera que esta activa.

Los sujetos de estudio son pacientes del Servicio de Aparato Digestivo del Hospital Universitario Joan XXIII de Tarragona (HJ23). Los criterios de inclusión fueron: pacientes de entre 18-70 años, diagnosticados de EC según los criterios de consenso ECCO y con el consentimiento informado de participación en el estudio.

Como criterios de exclusión se tuvo en cuenta que los sujetos no padecieran comorbilidades graves, enfermedades sistémicas que provocaran actividad inflamatoria (distinta de la EC), trastornos de la conducta alimentaria, - embarazo y lactancia, una dieta vegetariana o- irregular, signos de infección en el mes anterior al estudio y que no estuvieran en tratamiento antibiótico previo durante los últimos 3 meses.

Para completar la cohorte, también participaron sujetos sanos sin EII, llamados grupo control (n= 8), apareados con los pacientes con EC activa y en remisión por edad, sexo e índice de masa corporal (IMC). El estudio estadístico entre los grupos mostró solo diferencias significativas en variables esperadas como niveles circulantes de succinato, adherencia a la dieta mediterránea, nivel de actividad física o PCR, entre otras. Pero el resto de variables clínicas no fueron significativas, por lo que no son variables de confusión. Tanto de estos individuos como de la cohorte de pacientes EC se usaron muestras de sangre y todos sus datos clínicos se muestran en la Tabla 1.

Este estudio sigue los principios establecidos en la Declaración de Helsinki y la guía de la Buena Práctica Clínica, además, está aprobado por el CEIM del HJ23 (referencia CEIM 080/2021). Los datos personales de cada participante, tanto del grupo control como de la cohorte de pacientes, están protegidos de acuerdo con la ley LOPD 15/1999 y el RD 1720/2007 y el tratamiento de dichos datos se realizará según establece la LOPD 15/1999 y el RD 1720/2007.

Tabla 1. Características clínicas, antropométricas y demográficas de los sujetos

	CONTROL	EC INACTIVO	EC ACTIVO
N	8	5	10
Sexo (hombre/mujer)	3/5	2/3	4/6
Edad	45,62 ± 13,73	56,40 ± 10,04	39,20 ± 22,19
IMC	23,87 ± 3,51	27,15 ± 5,78	23,15 ± 3,64

Años de evolución	-	16,80 ± 4,21	5,90 ± 7,32 *
Tabaquismo, n (%)			
Fumador	2 (25)	0	3 (30)
No fumador	3 (37,5)	2 (40)	3 (30)
Ex- fumador	3 (37,5)	3 (60)	4 (40)
Año de diagnóstico, n (%)			
A1	-	0	2 (20)
A2	-	3 (60)	5 (50)
A3	-	2 (40)	3 (30)
Localización, n (%)			
L1	-	0	2 (20)
L2	-	5 (100)	5 (50)
L3	-	0	3 (30)
Comportamiento, n (%)			
B1	-	5 (100)	6 (60)
B1p	-	0	2 (20)
B2	-	0	0
B2p	-	0	0
B3	-	0	1 (10)
B3p	-	0	1 (10)
Índice Harvey-Bradshaw	-	0,40 ± 0,89	5,30 ± 4,11 *
PCR (mg/dL)	-	0,40 ± [0,40 - 0,70]	1,20 ± [0,72 - 1,80] *
Calprotectina fecal (µg/g)	-	28,70 ± [21,90 -37,70]	464,90 ± [215,95 - 667,50] *
SES-EC	-	0,80 ± 1,79	12,50 ± 6,28 *
Adherencia dieta mediterránea	-	9,20 ± 1,92	6,50 ± 1,43 *
Ejercicio físico	-	2,00 ± 0,71	1,60 ± 0,84
Succinato (µM)	43,66 ± 11,35	130,04 ± 44,85 \$	159,50 ± 29,24 \$

Abreviaciones: PCR: Proteína C reactiva; IMC: Índice de masa corporal; SES-EC: Índice de actividad endoscópica.

Edad de diagnóstico: A1 ≤ 16 años; A2 17-40 años; A3 > 40; Localización: L1= Íleon distal; L2= Colon; L3= Ileocolónico; Comportamiento: B1 = Crohn no estenosante, no fistulizante ; B1p = Crohn no estenosante, no fistulizante, con enfermedad perianal; B2= Crohn estenosante; B2p = Crohn estenosante con enfermedad perianal; B3 = Crohn penetrante; B3p = Crohn penetrante con enfermedad perianal.

Los grupos fueron comparados usando el pack "Tableone", el cual, usa el test ANOVA para analizar variables continuas normales, el test Kruskal para analizar variables continuas no normales y el test chisq.test para analizar las variables continuas. *p < 0,05 diferencias significativas entre EC activo y en remisión. \$ p<0,05 diferencias significativas respecto al control.

3.2 Procesamiento de muestras de sangre

Inicialmente, la extracción de sangre del paciente se conservó en frío a una temperatura de 4 °C hasta procesarla. En primer lugar, se centrifugó la sangre 20 minutos a 1200 rpm para separar sus componentes. Por una parte, se obtuvo el plasma y por otra las células sanguíneas. Estas últimas se dividen a su vez en tres tipos: los eritrocitos, los leucocitos y los trombocitos. Los leucocitos se componen a su vez de diferentes grupos celulares y nos referimos a ellas como células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

3.2.1 Determinación de los niveles de succinato circulantes en plasma sanguíneo

Después de centrifugar la muestra de sangre, el plasma se almacenó en eppendorfs para conservarlos en el Biobanco del IISPV a -80 °C. De este plasma se estudiaron los niveles de succinato circulante usando el kit Succinato EnzyChrom™ Kit de ensayo de BioAssay Systems.

3.2.2 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

La obtención de las PBMCs consistió en la separación por densidad de las células sanguíneas (Figura 3). Para ello, tras la centrifugación de la muestra y la consiguiente conservación del plasma, se trabajó con la fracción sanguínea restante. Se añadió a un tubo Leucosep™ de 12 ml con filtro (Ref. 163290) 3 ml de Ficoll-Paque™ PLUS (Ref. 17144002) y se centrifugó 1 minuto a 1200 rpm a temperatura ambiente. Este componente es el que provoca el gradiente de densidad de las PBMCs con respecto al resto de componentes de la sangre. Una vez centrifugado el Ficoll se añadió la fracción sanguínea que contiene las PBMCs con una pipeta Pasteur y se rellenó hasta los 9 ml del tubo con Phosphate Buffered Saline (PBS). Se centrifugó a temperatura ambiente durante 15 min a 800G para separarlo por fases. Una vez separadas, se extrajo con una pipeta Pasteur la capa de monocitos y para depositarla en un tubo Falcon de 15 ml (Figura 3). A este se le añadió PBS hasta alcanzar los 10 ml y se centrifugó a temperatura ambiente durante 10 min a 250G para generar un pellet. Se descartó el sobrenadante y se añadió un 1 ml de PBS para resuspenderlo y trasladarlo a un eppendorf. Se centrifugó el eppendorf a temperatura ambiente durante 10 min a 250G para después descartar el sobrenadante y conservar el pellet resultante a -80°C hasta que se realizó la extracción del RNA.

A partir de las PBMCs se estudiaron las diferencias que existen en la expresión génica entre pacientes con EC activo, EC en remisión y controles a través de PCR a tiempo real (qPCR).

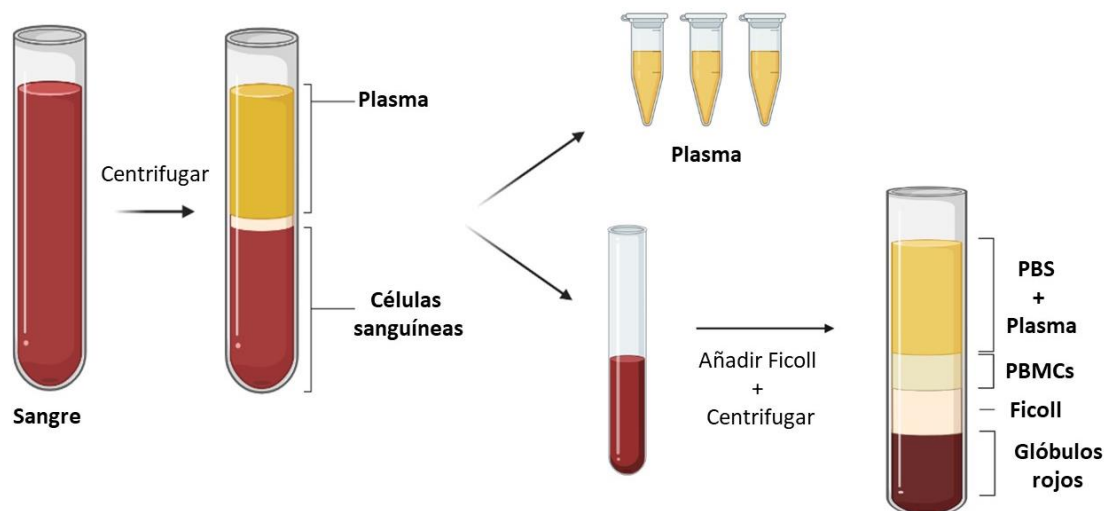


Figura 3. Separación por densidad de los componentes de la sangre.

3.3 Extracción RNA, cDNA y qPCR

3.3.1 Extracción y cuantificación de RNA

La extracción y cuantificación de RNA se hizo a partir de las PBMCs.

Para extraer el RNA, se añadió 1 ml de TRIzol™ Reagent (Ref. 15596026) al eppendorf para lisar las células durante 5 minutos. Posteriormente, se añadieron 200 µl de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 15 segundos, pudiendo apreciar un cambio de color. Tras dejarlo 2-3 minutos a temperatura ambiente, la muestra se centrifugó a 12000G durante 15 min a 4°C. En otro eppendorf distinto, se transfirió la fase superior acuosa resultante de la centrifugación y se le añadió 500 µl de isopropanol. Esta se homogenizó y se dejó a temperatura ambiente 10 minutos. Más tarde, se centrifugó a 12000G durante 10 min a 4°C y se deshechó el sobrenadante, sometiendo al pellet dos veces a un paso de lavado, que consistió en añadir 1 ml de etanol al 75% (v/v) y centrifugar a 7500G a 4°C durante 5 minutos. El pellet resultante se dejó secar. Por último, se agregó 30 µl de agua libre de RNasa al precipitado de RNA, se homogenizó y se puso en un Termoblock a 65°C durante 10 min. Una vez pasado ese tiempo, se pusieron las muestra en hielo para generar un contraste térmico, luego, se conservaron a -80°C.

Para la cuantificación de RNA de la muestra, se usó una placa µDrop™ Plate (Ref. N12391) de Thermo Fisher Scientific™. Se colocó en la placa 1 µl de agua libre de RNasa, la cual hizo función de blanco, y 1 µl de cada muestra, homogeneizándolas antes.

Un lector Varioskan LUX multimode microplate reader (Ref. VL0000D0) de Thermo Fisher Scientific TM mostró la absorbancia en 260 nm y 280 nm y la concentración de RNA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) de cada muestra.

3.3.2 Obtención cDNA

Para llevar a cabo la obtención de cDNA se precisó de 1 μg de RNA de cada muestra. Este RNA se sometió a transcripción inversa utilizando el High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor Kit de Applied BiosystemsTM (Ref. 4374966) y el ProFlex 3 x 32 - Well PCR System de Applied BiosystemsTM (Ref. 4484073). Durante el proceso de transcripción inversa, las muestras de RNA se cebaron primero durante 10 minutos a 25°C, después, se procedió a la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) durante 120 minutos a 37°C. Por último, se inactivó la transcriptasa inversa durante 5 minutos a 85°C.

3.3.3 qPCR

Las muestras de cDNA a una concentración de 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$ son empleadas para la qPCR utilizando el ensayo de expresión génica TaqManTM en placas de 96 pocillos de Applied BiosystemsTM (Ref. AB0600) para evaluar el nivel de expresión de los genes seleccionados. Cada placa contenía ensayos predefinidos de genes, que utilizaron sondas TaqManTM como detectores (enumeradas en la Tabla suplementaria 1) obtenidas de Applied BiosystemsTM.

El proceso se llevó a cabo en un QuantStudioTM Pro Real-Time PCR System de Applied BiosystemsTM (Ref. A43055). Los datos obtenidos de cada gen y muestra se analizaron mediante el método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, normalizando los valores de expresión respecto al RNA del 18S como control endógeno.

3.4 Análisis estadístico

Los resultados se analizaron con el programa GraphPad Prism 8.0 y con Rstudio 4.1.1. Las comparativas entre los tres grupos se realizaron mediante el test ANOVA y la comparación dos a dos de estos mediante el test T- student. Los valores $p < 0,05$ se consideraron significativos. También se realizaron estudios de correlación lineal entre dos variables numéricas, graficadas con una línea de correlación, y representaciones en gráficos de barras de variables numéricas y categóricas.

Los paquetes de R utilizados fueron: (T. Wei & Simko, 2021; Wickham, 2016; Wickham et al., 2019, 2022)

3.5 Estudio bibliográfico de la microbiota

Tanto de los pacientes con EC como de los controles se recogieron muestra de heces para el estudio metagenómico y metatranscriptómico de la microbiota intestinal. Estas muestras se conservaron en el Biobanco del IISPV a -80°C . A causa de la falta de tiempo para obtener los resultados del análisis de los datos de la microbiota, pero habiendo participado en la recolección y tratamiento de las muestras, se consideró interesante realizar un estudio bibliográfico de los posibles resultados que se podrán obtener.

En primer lugar, se observó que enfermedades que conllevan un estado inflamatorio como la obesidad, tienen una desregulación de la microbiota intestinal asociada al succinato (Serena et al., 2018). Es por ello que, en enfermedades como la de Crohn, el estudio de este campo también se consideró de utilidad de cara a un mejor entendimiento de esta enfermedad y ofrecer posibles tratamientos al respecto.

Para la búsqueda bibliográfica se utilizaron bases de datos como Pubmed u Elsevier. En primer lugar, se aplicó como filtro de búsqueda, términos como (*intestinal microbiota*) y (*succinate*). Con el resultado de esta búsqueda se encontraron bacterias relativas al metabolismo del succinato, por lo que, se realizó una segunda búsqueda para relacionar las bacterias productoras y consumidoras encontradas con las EII. Toda la información bibliográfica se encuentra representada en la Tabla 2 en la sección de resultados.

4. Resultados

Este apartado del trabajo final de grado es confidencial. En él, se exponen los resultados obtenidos de los niveles circulantes de succinato, las correlaciones con diferentes variables clínicas y demográficas así como la expresión génica de diferentes marcadores en células mononucleadas de sangre periférica obtenidas de los tres grupos de estudio.

En resumen, se ha encontrado que los niveles circulantes de succinato se encuentran significativamente elevados en pacientes con EC activa y en remisión en comparación con los sujetos control. Se encontró una correlación positiva entre los niveles succinato y la expresión de su receptor, *SUCNRI*. Además, también mostró correlaciones positivas con marcadores inflamatorios como la calprotectina fecal y la proteína C reactiva. La expresión de *IL10* fue mayor en pacientes con EC en remisión, mientras que el *TNFA* mostró una disminución significativa en pacientes con EC activa. También se encontraron correlaciones entre los niveles de expresión de genes y marcadores clínicos como el índice de Harvey-Bradshaw, la PCR y la calprotectina fecal.

4.3 Estudio bibliográfico de la microbiota

El estudio bibliográfico para determinar la relación entre niveles de succinato y aumento o disminución de microbiota intestinal productora o consumidora de succinato reveló que la disbiosis que acontece a pacientes con EC, puede ser responsable de la alteración de los niveles circulantes de succinato observada en estos pacientes. Específicamente, se pudo ver en todos los estudios revisados que los pacientes con EC tienen siempre disminuida las bacterias consumidoras de succinato y aumentadas la mayoría de bacterias productoras de succinato (Tabla 2). Estos datos pueden explicar, porque los pacientes con EC tienen aumentados los niveles circulantes de succinato.

Según la bibliografía, hay mayor número de especies productoras de succinato pertenecientes al filo Bacteroidetes, a pesar de ello, también hay bacterias del filo Firmicutes y Proteobacteria. En el caso de las bacterias consumidoras de succinato, la gran mayoría se clasifican solo en el filo Firmicutes.

Tabla 2. Estudio bibliográfico de la microbiota intestinal relacionada con la producción o consumo de succinato.

ESPECIES	RESULTADO	REFERENCIAS
Productoras de succinato		
<i>Bacteroides fragilis</i>	Aumenta en EII, tanto en CU como en EC.	(Becker et al., 2021; Fremder et al., 2021; Weng et al., 2019)
<i>Bacteroides vulgatus</i>	Aumenta en EII, en modelos de ratón de CU inducida por DSS.	(Connors et al., 2019; Feng et al., 2022; Fremder et al., 2021; Gibiino et al., 2018; Lee et al., 2022; Mills et al., 2022; Ó Cuív et al., 2017)
<i>Lactobacillus intestinalis</i>	Se reduce en modelo de ratón de CU inducida por DSS.	(Osaka et al., 2017)
<i>Bacteroides acidifaciens</i>	Aumenta en modelo de ratón de CU inducida por carragenina.	(Mi et al., 2020)
<i>Parasutterella excrementihominis</i>	Aumenta en EC y en modelos de CU inducida por DSS.	(Feng et al., 2022; Yan et al., 2023)
<i>Parabacteroides distasonis</i>	Aumentas en EII.	(Fernández-Veledo & Vendrell, 2019; Gibiino et al., 2018)

ESPECIES	RESULTADO	REFERENCIAS
Consumidoras de succinato		
<i>Phascolarctobacterium succinatutens</i>	Disminuye en EC y en modelos de CU inducida por DSS.	(Fremder et al., 2021)
<i>Phascolarctobacterium faecium</i>	Disminuye en EC y en modelos de CU inducida por DSS.	(Fremder et al., 2021)

GÉNEROS	RESULTADO	REFERENCIAS
Productoras de succinato		
<i>Parasutterella</i>	Aumenta en modelo de ratón con CU inducida por DSS.	(Li et al., 2022)
<i>Prevotella</i>	Aumenta en EC y CU.	(Gryaznova et al., 2021; Lee et al., 2022)
<i>Lactobacillus</i>	Aumenta en EC y disminuye en modelo de ratón de CU inducida por DSS.	(Lee et al., 2022; Li et al., 2022; Weng et al., 2019)
Consumidoras de succinato		
<i>Phascolarctobacterium</i>	Disminuye en EII, especialmente en EC.	(Connors et al., 2019; Fremder et al., 2021; Y. han Wei et al., 2023)
<i>Clostridium</i>	Disminuye en EC.	(Lee et al., 2022)

FAMILIAS	RESULTADO	REFERENCIAS
Productoras de succinato		
<i>Veillonellaceae</i>	Aumenta en EII, especialmente en EC.	(Y. han Wei et al., 2023; Xun et al., 2018)
<i>Prevotellaceae</i>	Aumenta en EII.	(Y. han Wei et al., 2023)
<i>Bacteroidaceae</i>	Aumenta en EII, en modelos de ratón de CU inducida por DSS.	(Osaka et al., 2017; Y. han Wei et al., 2023)
<i>Enterobacteriaceae</i>	Aumenta en EII, en modelos de CU inducida.	(Osaka et al., 2017)
Consumidoras de succinato		
<i>Clostridaceae</i>	Disminuye en EII.	(Y. han Wei et al., 2023)
<i>Odoribacteraceae</i>	Disminuye en EII.	(Y. han Wei et al., 2023)

5. Discusión

Este apartado del trabajo final de grado es confidencial. En él, se discuten los resultados obtenidos de este estudio, tanto experimentales como bibliográficos:

Se ha visto que los pacientes con EC activa tienen niveles elevados de succinato circulante, lo cual se correlaciona con mayor inflamación y peor pronóstico de la enfermedad. Además, se encontró una relación entre niveles más altos de succinato y menor actividad física en los pacientes. Al mismo tiempo, se observó una disminución de la expresión de genes proinflamatorios en los pacientes activos, lo cual se atribuyó al uso de medicamentos antiinflamatorios.

Por otro lado, la disbiosis microbiana y una dieta rica en grasas aumentan los niveles de succinato, empeorando la enfermedad. Se ha sugerido que regular la dieta y el trasplante de microbiota fecal podrían ser soluciones para restaurar el equilibrio de bacterias y reducir la inflamación.

Finalmente, se han sugerido posibles terapias biotecnológicas a esta problemática.

6. Conclusión

El succinato tiene un rol clave en la fisiopatología de la enfermedad de Crohn. La cohorte de pacientes con EC con la que se ha trabajado muestra niveles elevados de succinato circulante respecto de los pacientes en remisión o de los sujetos sanos, los cuales se han podido relacionar con los dos periodos fisiológicos de la enfermedad y con el empeoramiento de la sintomatología y su calidad de vida. Es relevante destacar que esta desregulación con respecto al succinato puede ser consecuencia de la disbiosis de las bacterias productoras y consumidoras de la microbiota en los enfermos de Crohn, siendo este un campo que requiere más estudio.

7. Bibliografía

- Allen, P. B., Olivera, P., Emery, P., Moulin, D., Jouzeau, J. Y., Netter, P., Danese, S., Feagan, B., Sandborn, W. J. & Peyrin-Biroulet, L. (2017). Review article: moving towards common therapeutic goals in Crohn's disease and rheumatoid arthritis. In *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 45, Issue 8, pp. 1058–1072). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/apt.13995>
- Barreiro-de Acosta, M., Molero, A., Artime, E., Díaz-Cerezo, S., Lizán, L., de Paz, H. D. & Martín-Arranz, M. D. (2023). Epidemiological, Clinical, Patient-Reported and Economic Burden of Inflammatory Bowel Disease (Ulcerative colitis and Crohn's disease) in Spain: A Systematic Review. In *Advances in Therapy*. Adis. <https://doi.org/10.1007/s12325-023-02473-6>
- Becker, H. E. F., Jamin, C., Bervoets, L., Boleij, A., Xu, P., Pierik, M. J., Stassen, F. R. M., Savelkoul, P. H. M., Penders, J. & Jonkers, D. M. A. E. (2021). Higher Prevalence of *Bacteroides fragilis* in Crohn's Disease Exacerbations and Strain-Dependent Increase of Epithelial Resistance. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.598232>
- Bilal, M., Ashraf, S. & Zhao, X. (2022). Dietary Component-Induced Inflammation and Its Amelioration by Prebiotics, Probiotics, and Synbiotics. In *Frontiers in Nutrition* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.931458>
- Buffet-Bataillon, S., Bouguen, G., Fleury, F., Cattoir, V. & Le Cunff, Y. (2022). Gut microbiota analysis for prediction of clinical relapse in Crohn's disease. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-23757-x>
- Caparrós, E., Wiest, R., Scharl, M., Rogler, G., Gutiérrez Casbas, A., Yilmaz, B., Wawrzyniak, M. & Francés, R. (2021). Dysbiotic microbiota interactions in Crohn's disease. In *Gut Microbes* (Vol. 13, Issue 1). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1949096>
- Connors, J., Dawe, N. & Van Limbergen, J. (2019). The role of succinate in the regulation of intestinal inflammation. In *Nutrients* (Vol. 11, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu11010025>
- De Souza, H. S. P. (2017). Etiopathogenesis of inflammatory bowel disease: Today and tomorrow. In *Current Opinion in Gastroenterology* (Vol. 33, Issue 4, pp. 222–229). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000364>
- Elhag, D. A., Kumar, M., Saadaoui, M., Akobeng, A. K., Al-Mudahka, F., Elawad, M. & Al Khodor, S. (2022). Inflammatory Bowel Disease Treatments and Predictive Biomarkers of Therapeutic Response. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 13). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23136966>
- Feng, C., Zhang, W., Zhang, T., He, Q., Kwok, L. Y., Tan, Y. & Zhang, H. (2022). Heat-Killed *Bifidobacterium bifidum* B1628 May Alleviate Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Mice, and the Anti-Inflammatory Effect Is Associated with Gut Microbiota Modulation. *Nutrients*, 14(24). <https://doi.org/10.3390/nu14245233>

- Fernández-Veledo, S. & Vendrell, J. (2019). Gut microbiota-derived succinate: Friend or foe in human metabolic diseases? In *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* (Vol. 20, Issue 4, pp. 439–447). Springer. <https://doi.org/10.1007/s11154-019-09513-z>
- Fremder, M., Kim, S. W., Khamaysi, A., Shimshilashvili, L., Eini-Rider, H., Park, I. S., Hadad, U., Cheon, J. H. & Ohana, E. (2021). A transepithelial pathway delivers succinate to macrophages, thus perpetuating their pro-inflammatory metabolic state. *Cell Reports*, 36(6). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109521>
- Gibiino, G., Lopetuso, L. R., Scaldaferri, F., Rizzatti, G., Binda, C. & Gasbarrini, A. (2018). Exploring Bacteroidetes: Metabolic key points and immunological tricks of our gut commensals. In *Digestive and Liver Disease* (Vol. 50, Issue 7, pp. 635–639). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2018.03.016>
- Glassner, K. L., Abraham, B. P. & Quigley, E. M. M. (2020a). The microbiome and inflammatory bowel disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 145(1), 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.11.003>
- Glassner, K. L., Abraham, B. P. & Quigley, E. M. M. (2020b). The microbiome and inflammatory bowel disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 145(1), 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.11.003>
- Gryaznova, M. V., Solodskikh, S. A., Panevina, A. V., Syromyatnikov, M. Y., Dvoretzkaya, Yu. D., Sviridova, T. N., Popov, E. S. & Popov, V. N. (2021). Study of microbiome changes in patients with ulcerative colitis in the Central European part of Russia. *Heliyon*, 7(3), e06432. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06432>
- Kim, B., Chae, J., Kim, E. H., Yang, H. I., Cheon, J. H., Il Kim, T., Kim, W. H., Jeon, J. Y. & Park, S. J. (2021). Physical activity and quality of life of patients with inflammatory bowel disease. *Medicine (United States)*, 100(27). <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000026290>
- Kofla-Dłubacz, A., Pytrus, T., Akutko, K., Sputa-Grzegorzółka, P., Piotrowska, A. & Dzięgiel, P. (2022). Etiology of IBD—Is It Still a Mystery? In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 20). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms232012445>
- Lavelle, A. & Sokol, H. (2020). Gut microbiota-derived metabolites as key actors in inflammatory bowel disease. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 17, Issue 4, pp. 223–237). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0258-z>
- Lee, J.-E., Kim, K. S., Koh, H., Lee, D.-W. & Kang, N. J. (2022). Diet-Induced Host–Microbe Interactions: Personalized Diet Strategies for Improving Inflammatory Bowel Disease. *Current Developments in Nutrition*, 6(8), 6008009. <https://doi.org/10.1093/cdn/nzac110>
- Li, Q., Chen, G., Zhu, D., Zhang, W., Qi, S., Xue, X., Wang, K. & Wu, L. (2022). Effects of dietary phosphatidylcholine and sphingomyelin on DSS-induced colitis by

- regulating metabolism and gut microbiota in mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 105. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2022.109004>
- Mi, Y., Chin, Y. X., Cao, W. X., Chang, Y. G., Lim, P. E., Xue, C. H. & Tang, Q. J. (2020). Native κ -carrageenan induced-colitis is related to host intestinal microecology. *International Journal of Biological Macromolecules*, 147, 284–294. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.072>
- Mills, R. H., Dulai, P. S., Vázquez-Baeza, Y., Saucedo, C., Daniel, N., Gerner, R. R., Batachari, L. E., Malfavon, M., Zhu, Q., Weldon, K., Humphrey, G., Carrillo-Terrazas, M., Goldasich, L. D. R., Bryant, M. K., Raffatellu, M., Quinn, R. A., Gewirtz, A. T., Chassaing, B., Chu, H., ... Gonzalez, D. J. (2022). Multi-omics analyses of the ulcerative colitis gut microbiome link *Bacteroides vulgatus* proteases with disease severity. *Nature Microbiology*, 7(2), 262–276. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-01050-3>
- Monfort-Ferré, D., Caro, A., Menacho, M., Martí, M., Espina, B., Boronat-Toscano, A., Nuñez-Roa, C., Seco, J., Bautista, M., Espín, E., Megía, A., Vendrell, J., Fernández-Veledo, S. & Serena, C. (2022). The Gut Microbiota Metabolite Succinate Promotes Adipose Tissue Browning in Crohn's Disease. *Journal of Crohn's & Colitis*, 16(10), 1571–1583. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjac069>
- Ng, S. C., Shi, H. Y., Hamidi, N., Underwood, F. E., Tang, W., Benchimol, E. I., Panaccione, R., Ghosh, S., Wu, J. C. Y., Chan, F. K. L., Sung, J. J. Y. & Kaplan, G. G. (2017). Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *The Lancet*, 390(10114), 2769–2778. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32448-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32448-0)
- Ó Cuív, P., de Wouters, T., Giri, R., Mondot, S., Smith, W. J., Blottière, H. M., Begun, J. & Morrison, M. (2017). The gut bacterium and pathobiont *Bacteroides vulgatus* activates NF- κ B in a human gut epithelial cell line in a strain and growth phase dependent manner. *Anaerobe*, 47, 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.06.002>
- Ortiz-Masiá, D., Gisbert-Ferrándiz, L., Bauset, C., Coll, S., Mamie, C., Scharl, M., Esplugues, J. V., Alós, R., Navarro, F., Cosín-Roger, J., Barrachina, M. D. & Calatayud, S. (2020). Succinate Activates EMT in Intestinal Epithelial Cells through SUCNR1: A Novel Protagonist in Fistula Development. *Cells*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/cells9051104>
- Osaka, T., Moriyama, E., Arai, S., Date, Y., Yagi, J., Kikuchi, J. & Tsuneda, S. (2017). Meta-analysis of fecal microbiota and metabolites in experimental colitic mice during the inflammatory and healing phases. *Nutrients*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/nu9121329>
- Petagna, L., Antonelli, A., Ganini, C., Bellato, V., Campanelli, M., Divizia, A., Efrati, C., Franceschilli, M., Guida, A. M., Ingallinella, S., Montagnese, F., Sensi, B., Siragusa, L. & Sica, G. S. (2020). Pathophysiology of Crohn's disease inflammation and recurrence. In *Biology Direct* (Vol. 15, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13062-020-00280-5>

- Roda, G., Chien Ng, S., Kotze, P. G., Argollo, M., Panaccione, R., Spinelli, A., Kaser, A., Peyrin-Biroulet, L. & Danese, S. (2020). Crohn's disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s41572-020-0156-2>
- Sadler, T., Bhasin, J. M., Xu, Y., Barnholz-Sloan, J., Chen, Y., Ting, A. H. & Stylianou, E. (2016). Genome-wide analysis of DNA methylation and gene expression defines molecular characteristics of Crohn's disease-associated fibrosis. *Clinical Epigenetics*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13148-016-0193-6>
- Serena, C., Ceperuelo-Mallafré, V., Keiran, N., Queipo-Ortuño, M. I., Bernal, R., Gomez-Huelgas, R., Urpi-Sarda, M., Sabater, M., Pérez-Brocal, V., Andrés-Lacueva, C., Moya, A., Tinahones, F. J., Fernández-Real, J. M., Vendrell, J. & Fernández-Veledo, S. (2018). Elevated circulating levels of succinate in human obesity are linked to specific gut microbiota. *ISME Journal*, 12(7), 1642–1657. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0068-2>
- Serena, C., Queipo-Ortuño, M., Millan, M., Sanchez-Alcoholado, L., Caro, A., Espina, B., Menacho, M., Bautista, M., Monfort-Ferré, D., Terrón-Puig, M., Núñez-Roa, C., Maymó-Masip, E., Mar Rodriguez, M., Tinahones, F. J., Espin, E., Martí, M., Fernández-Veledo, S. & Vendrell, J. (2020). Microbial signature in adipose tissue of crohn's disease patients. *Journal of Clinical Medicine*, 9(8), 1–16. <https://doi.org/10.3390/jcm9082448>
- Seyedian, S. S., Nokhostin, F. & Malamir, M. D. (2019). A review of the diagnosis, prevention, and treatment methods of inflammatory bowel disease. In *Journal of medicine and life* (Vol. 12, Issue 2, pp. 113–122). NLM (Medline). <https://doi.org/10.25122/jml-2018-0075>
- Silva, F., Gatica, T. & Pavez, C. (2019). Etiology And Physiopathology Of Inflammatory Bowel Disease. *Revista Medica Clinica Las Condes*, 30(4), 262–272. <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2019.06.004>
- Stephens, M. & von der Weid, P. Y. (2020). Lipopolysaccharides modulate intestinal epithelial permeability and inflammation in a species-specific manner. *Gut Microbes*, 11(3), 421–432. <https://doi.org/10.1080/19490976.2019.1629235>
- Ventham, N. T., Kennedy, N. A., Adams, A. T., Kalla, R., Heath, S., O'Leary, K. R., Drummond, H., Wilson, D. C., Gut, I. G., Nimmo, E. R., Satsangi, J., Lauc, G., Campbell, H., McGovern, D. P. B., Annese, V., Zoldoš, V., Permberton, I. K., Wuhrer, M., Kolarich, D., ... Vatn, M. H. (2016). Integrative epigenome-wide analysis demonstrates that DNA methylation may mediate genetic risk in inflammatory bowel disease. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms13507>
- Wei, T. & Simko, V. (2021). *R package "corrplot": Visualization of a Correlation Matrix (Version 0.92)*.
- Wei, Y. han, Ma, X., Zhao, J. C., Wang, X. Q. & Gao, C. Q. (2023). Succinate metabolism and its regulation of host-microbe interactions. In *Gut Microbes* (Vol. 15, Issue 1). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2190300>

- Weng, Y. J., Gan, H. Y., Li, X., Huang, Y., Li, Z. C., Deng, H. M., Chen, S. Z., Zhou, Y., Wang, L. S., Han, Y. P., Tan, Y. F., Song, Y. J., Du, Z. M., Liu, Y. Y., Wang, Y., Qin, N., Bai, Y., Yang, R. F., Bi, Y. J. & Zhi, F. C. (2019). Correlation of diet, microbiota and metabolite networks in inflammatory bowel disease. *Journal of Digestive Diseases*, 20(9), 447–459. <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12795>
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag.
- Wickham, H., Bryan, J., Kalicinski, M., Valery, K., Leittenne, C., Colbert, B., Hoerl, D. & Miller, E. (2019). *R package 'readxl': Read Excel Files (Version 1.3.1)*.
- Wickham, H., François, R., Henry, L. & Müller, K. (2022). *R package 'dplyr': A Grammar of Data Manipulation (Version 1.0.8)*.
- Xun, Z., Zhang, Q., Xu, T., Chen, N. & Chen, F. (2018). Dysbiosis and ecotypes of the salivary microbiome associated with inflammatory bowel diseases and the assistance in diagnosis of diseases using oral bacterial profiles. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01136>
- Yan, P., Sun, Y., Luo, J., Liu, X., Wu, J. & Miao, Y. (2023). Integrating the serum proteomic and fecal metaproteomic to analyze the impacts of overweight/obesity on IBD: a pilot investigation. *Clinical Proteomics*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12014-023-09396-y>
- Zheng, J., Sun, Q., Zhang, J. & Ng, S. C. (2022). The role of gut microbiome in inflammatory bowel disease diagnosis and prognosis. In *United European Gastroenterology Journal* (Vol. 10, Issue 10, pp. 1091–1102). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/ueg2.12338>

8. Autoevaluación

Durante este trabajo he podido aplicar y reforzar de manera práctica los conocimientos adquiridos durante mis estudios de grado. Además, he tenido la suerte de recibir una valiosa formación al realizar experimentos con muestras de pacientes obtenidas directamente del hospital, lo cual ha sido una gran oportunidad para mí. Sin embargo, no solo he adquirido habilidades en el laboratorio, sino que también he desarrollado diversas aptitudes científicas y profesionales, como el análisis de datos, la comunicación y la capacidad de trabajo en equipo.

Sumado a eso, he estado involucrada de manera activa en un proyecto de investigación biomédica, lo cual me ha dado la ocasión de trabajar en una de las ramas de la Biotecnología que más me motiva para iniciar una carrera profesional como investigadora.

Finalmente, agradezco mucho el haberme introducido a conocer la enfermedad de Crohn y haber colaborado en una mejor comprensión de la etiología de la enfermedad.

Haciendo una valoración global, estoy muy satisfecha, no sólo con los resultados obtenidos en este trabajo, sino también con la oportunidad de trabajar en el grupo de investigación Inflammatory Bowel Disease.

9. Anexos

Tabla suplementaria 1: Sondas TaqMan™ utilizadas en análisis de expresión génica por qPCR.

SONDA	REFERENCIA
<i>SUCNR1</i>	Hs00908230_m1
<i>NOD2</i>	Hs01550753_m1
<i>TLR4</i>	Hs00152939_m1
<i>IL10</i>	Hs00961622_m1
<i>TNF</i>	Hs00174128_m1
<i>SLC13A3</i>	Hs00955744_m1
<i>MCT1</i>	Hs01560299_m1
<i>CCL2</i>	Hs00234140_m1

Ficha de seguimiento del tutor de TFG (Anexo 2)

*Normativa de Treball Fi de Grau Facultat d'Enologia
Aprovada per Junta de Facultat d'Enologia del dia 30 d'octubre de 2014*

ANNEX 2

FITXA DE SEGUIMENT DEL TUTOR/A del TFG

Nom i Cognoms de l'Alumne/a: OLGA SOLER LÓPEZ

Nom i Cognoms del Tutor/a: CAROLINA SERENA PERELLÓ

Data de la entrevista amb l'alumne: 12/04/23; 26/04/23; 17/05/23; 25/05/23

Recomanacions durant el seguiment: en la primera reunió vam parlar sobre la part bibliogràfica del seu TFG, li hem ensenyat a afegir cites amb Mendeley, li vam recomanar escriure frases més curtes.

Observacions:

Ja té part del treball escrit i li recomano que faci un esborrany complet i m'ho enviï per revisar. Les figures estan ben fetes així com la descripció dels resultats.

Observacions Darrera revisió:

El TFG està ben redactat, i amb bona presentació. El treball està gairebé finalitzat i es nota que l'estudiant ha fet un gran treball.

Signatura del Tutor/a

CAROLINA
SERENA
PERELLO -
DNI
39902431F

Firmado
digitalmente por
CAROLINA
SERENA PERELLO
- DNI 39902431F
Fecha: 2023.06.01
12:35:36 +02'00'

Tarragona a 1 de juny 2023

Signatura del Alumne/a

Olga
Soler
López

Firmado
digitalmente
por Olga Soler
López
Fecha:
2023.06.01
13:18:45
+02'00'